

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 151**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2009 E 09788056 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2323686**

54 Título: **Adiponectina para el tratamiento de una neumopatía**

30 Prioridad:

27.08.2008 JP 2008217721

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

29.08.2013

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9, Kanda-Tsukasa-machi 2-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**KOTOSAI, KOUNORI;
KIRIMA, KAZUYOSHI;
KARASUTANI, KEIKO;
OHMOTO, YASUKAZU y
YABUUCHI, YOICHI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 421 151 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

Adiponectina para el tratamiento de una neumopatía.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente para el tratamiento de neumopatías que inhibe el agrandamiento anormal de los espacios de aire alveolares asociado a cambios destructivos de las paredes alveolares causados por daños crónicos en los mismos y/o que inhibe los cambios destructivos de las paredes alveolares.

10

Antecedentes de la técnica

Entre las diversas neumopatías (PD) conocidas se incluyen la bronquitis aguda debido a inflamación aguda causada por virus o bacterias, el asma bronquial causada principalmente por la respuesta inflamatoria del tracto respiratorio debida a eosinófilos, la neumonía intersticial causada por la inflamación del epitelio alveolar, el cáncer de pulmón causado por células de cáncer, y la neumopatía obstructiva crónica (COPD), que es conocida como una enfermedad caracterizada por inflamación pulmonar crónica causada por diversos factores, especialmente el tabaquismo, que conducen a la destrucción de las paredes alveolares y a la hipertrofia de la glándula mucosa bronquial, resultando en falta de aliento, incremento de la tos y del esputo, etc. En particular, una enfermedad anteriormente denominada enfisema con frecuencia complica una enfermedad anteriormente denominada bronquitis crónica en grado variable. Actualmente, la neumopatía obstructiva relacionada con estas dos enfermedades se denomina COPD.

15

20

Se afirma que la COPD se caracteriza por el desarrollo progresivo de limitaciones al flujo de aire (obstrucción de las vías aéreas) (documento no de patente nº 1).

25

Al contrario que la bronquitis crónica, en la que la hipersecreción del tracto respiratorio y la infección no implican limitaciones al flujo de aire, se considera que resulta una limitación irreversible del flujo de aire de lesiones periféricas de las vías respiratorias. Entre dichas neumopatías se incluyen, además de la neumopatía obstructiva crónica anteriormente indicada, que incluye el enfisema y la bronquitis crónica, la fibrosis quística, la bronquiectasia, la tuberculosis, la neumoconiosis y similares.

30

Actualmente, con respecto a la terapia farmacológica de las neumopatías, incluyendo la COPD acompañada de limitaciones irreversibles al flujo de aire, se utilizan fármacos tales como los estimulantes β_2 , los agentes anticolinérgicos y similares, los cuales presentan actividad broncodilatadora de prevención o supresión temporal de los síntomas. Sin embargo, estos fármacos con actividad broncodilatadora no pueden reducir durante un periodo prolongado de tiempo el deterioro de la función pulmonar, la cual es el indicador clínico más importante.

35

Muchos estudios clínicos a gran escala han examinado los efectos de la terapia utilizando, a modo de inhaladores, esteroides que presentan un potente efecto inhibitor de la producción de citocinas; sin embargo, varios documentos han informado de que los esteroides no podían reducir el deterioro de la función pulmonar durante un periodo prolongado de tiempo (ver los documentos no de patente nº 2 a nº 4).

40

Con respecto a los efectos de la terapia de las EP con fármacos que presentan efectos inhibidores de la producción de oxígeno activo, no se han llevado a cabo estudios clínicos fiables.

45

Según un estudio clínico, la N-acetilcisteína, un antioxidante que se considera que presenta un mecanismo de acción similar al de agentes que inhiben la producción de oxígeno activo, puede reducir la frecuencia de la exacerbación aguda de la COPD (documento no de patente nº 5). Sin embargo, ningún documento ha informado de que la N-acetilcisteína muestre un efecto de reducción del deterioro de la función pulmonar durante un periodo de tiempo prolongado.

50

Además, para el tratamiento de las PD, se ha debatido utilizar fármacos que inhiben la actividad de la fosfodiesterasa IV. Sin embargo, se informa de que estos fármacos presentan efectos secundarios adversos, tales como náuseas, vómitos y secreción de ácido gástrico (documento no de patente nº 6).

55

Tal como se ha indicado anteriormente, no se ha desarrollado ningún fármaco que consiga un rendimiento satisfactorio como fármaco para el tratamiento de las neumopatías crónicas, y que reduzca el deterioro irreversible de la función pulmonar, es decir, que inhiba el agrandamiento anormal de los espacios alveolares de aire asociado a los cambios destructivos de las paredes alveolares debido a la lesión crónica de los mismos y/o que inhiba los cambios destructivos de las paredes alveolares.

60

Listado de referencias

Literatura de patentes

- 5 PTL 1: documento WO1996/39429
 PTL 2: documento WO1999/21577
 PTL 3: patente japonesa nº 3018186
 PTL 4: patente japonesa nº 4147220
 PTL 5: patente japonesa no examinada nº 2004-16074

10 Literatura no de patentes

- NPL 1: Pauwell R.A. *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163:1256-1276, 2001.
 NPL 2: Pauwels R.A., Lodahl C.G., Laitinen L.A., Schouten J.P., Postma D.S., Pride N.B. *et al.*, N. Engl. J. Med. 340:1948-1953, 1999.
 NPL 3: Vestbo J., Sorensen T., Lange P., Brix A., Torre P., Viskum K., Lancet 353:1819-1823, 1999.
 NPL 4: Burge P.S., Calverley P.M., Jones P.W., Spencer S., Anderson J.A., Maslen T.K., BMJ 320:1297-1303, 2000.
 NPL 5: C. Stey, J. Steurer, S. Bachmann, T.C. Medici, M.R. Tramer, Eur. Respir. J. 16:253-262, 2000.
 NPL 6: Peter J. Barnes, N. Engl. J. Med. 343(4):269-280, 2000.
 NPL 7: Maeda K. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 221:286-289, 1996.

Sumario de la invención

Problema técnico

25 El objetivo de la presente invención es proporcionar un fármaco altamente seguro que resulte útil para el tratamiento de un paciente con una neumopatía cuya función pulmonar se encuentra irreversiblemente deteriorada.

Solución al problema

30 Se ha preparado un modelo animal que muestra características patógenas clínicamente muy similares a la COPD asociada a deterioro irreversible de la función pulmonar y han llevado a la realización de una exhaustiva investigación con este modelo animal. Como resultado, han encontrado que la adiponectina, la cual es conocida como una proteína secretoria similar al colágeno secretada específicamente por las células adiposas, inhibe el enfisema pulmonar y los trastornos de la función pulmonar causados por el tratamiento con elastasa, y han conseguido producir un nuevo agente terapéutico altamente seguro que muestra un efecto extremadamente alto de tratamiento de las neumopatías asociadas a deterioro irreversible de la función pulmonar, con menos efectos secundarios adversos, tales como náuseas, vómitos y secreción de ácido gástrico. La presente invención se ha llevado a cabo basándose en estos resultados.

40 La presente invención proporciona un agente que contiene adiponectina para la inhibición del agrandamiento de los espacios alveolares de aire y un agente que contiene adiponectina para la inhibición de la destrucción de las paredes alveolares.

45 Ítem 1. Un agente para la inhibición del agrandamiento de los espacios alveolares de aire que comprende adiponectina.

50 Ítem 2. El agente según el Ítem 1, en el que la adiponectina se encuentra contenida en una cantidad efectiva para inhibir el agrandamiento de los espacios alveolares de aire asociado a un cambio destructivo de las paredes alveolares.

Ítem 3. El agente según el Ítem 1 ó 2, en el que la adiponectina se encuentra contenida en una cantidad de 0,01% a 70% en peso.

55 Ítem 4. El agente según cualquiera de los Ítems 1 a 3, para la utilización en el tratamiento del enfisema, la bronquitis crónica, la fibrosis quística, la bronquiectasia, la tuberculosis, la neumoconiosis o la neumopatía obstructiva crónica.

Ítem 5. Un agente para la inhibición de la destrucción de las paredes alveolares que comprende adiponectina.

60 Ítem 6. El agente según el Ítem 5, en el que la adiponectina se encuentra contenida en una cantidad efectiva para inhibir un cambio destructivo de una pared alveolar.

65 Ítem 7. El agente según el Ítem 5 ó 6, en el que la adiponectina se encuentra contenida en una cantidad de 0,01% a 70% en peso.

Ítem 8. El agente según cualquiera de los Ítems 5 a 7, para la utilización en el tratamiento del enfisema, la bronquitis

crónica, la fibrosis quística, la bronquiectasia, la tuberculosis, la neumoconiosis o la neumopatía obstructiva crónica.

El agente para la inhibición del agrandamiento de los espacios alveolares de aire de la presente invención contiene adiponectina en una cantidad efectiva para inhibir el agrandamiento de los espacios alveolares de aire asociados a cambios destructivos de las paredes alveolares, y el agente para la inhibición de la destrucción de las paredes alveolares de la presente invención contiene adiponectina en una cantidad efectiva para inhibir la destrucción de las paredes alveolares.

La adiponectina, que es un principio activo del agente para la inhibición del agrandamiento de los espacios alveolares de aire o el agente para la inhibición de la destrucción de las paredes alveolares de la presente invención, es una proteína similar al colágeno secretada por las células adiposas.

La adiponectina, que es un principio activo del agente para la inhibición del agrandamiento de los espacios alveolares de aire o del agente para la inhibición de la destrucción de las paredes alveolares (en adelante abreviado como "agentes terapéuticos de las neumopatías") de la presente invención es una sustancia fácilmente disponible y bien conocida. La adiponectina disponible comercialmente o la adiponectina preparada mediante el método conocido mostrado en el ejemplo de referencia posteriormente puede utilizarse de manera general en la invención.

Los genes de adiponectina del ser humano y del ratón se dan a conocer en el documento de patente nº 1 como Acrp30 humano y Acrp30 de ratón, y la adiponectina humana se da a conocer como apM1 en el documento no de patente nº 7 y en el documento de patente nº 2. La secuencia de aminoácidos estimada del polipéptido adiponectina utilizado en los agentes terapéuticos de neumopatía de la presente invención a modo de principio activo se describe en el documento de patente nº 2; sin embargo, el documento de patente nº 2 meramente se refiere al efecto inhibidor del polipéptido sobre el crecimiento de las células de músculo liso y a su disponibilidad como agente para la prevención o mejora de la arterioesclerosis, como agente para la prevención o tratamiento de la restenosis posterior a la angioplastia y como agente antiinflamatorio.

Además, el documento de patente nº 3 muestra la utilidad de la adiponectina, que suprime, sin macrófagos ni linfocitos, el crecimiento clonal de células progenitoras monocitoides de la médula relativamente maduras en el estadio de diferenciación, a modo de agente antiinflamatorio y un supresor de la propagación de las células monocitoides. Además, el documento de patente nº 4 enseña que el dominio esférico del lado C-terminal de la adiponectina (correspondiente a las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 114 a nº 239 de la adiponectina humana, y las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 111 a nº 242 de la adiponectina de ratón) presenta el efecto de reducir la expresión del receptor depurador A y puede utilizarse como agente preventivo y terapéutico para la arterioesclerosis. De manera similar, el documento de patente nº 5 se refiere a la disponibilidad del dominio esférico del lado C-terminal de la adiponectina como activador de proteína quinasa activado por AMP.

La adiponectina siguiente se encuentra comercializada por Bio Vendor (Rep. Checa y Eslovaquia, <http://www.biovendor.com/products/proteins>): adiponectina recombinante globular (adiponectina globular humana (*E. coli*)), adiponectina recombinante producida a partir de *E. coli* (adiponectina humana *E. coli* His), adiponectina recombinante producida a partir de célula renales embrionarias humanas (adiponectina humana HEK293 Flag), adiponectina recombinante trimérica producida a partir de célula renales embrionarias humanas (forma trimérica de la adiponectina humana (HEK)), adiponectina de bajo y alto peso molecular producida a partir de células renales embrionarias humanas (adiponectina humana LMW y MMW rica en oligómeros (HEK)) , adiponectina de peso molecular medio y alto producida a partir de células renales embrionarias humanas (adiponectina humana MMW y HMW rica en oligómeros (HEK)), etc.

Un ejemplo específico del polipéptido utilizado en los agentes terapéuticos de neumopatía de la presente invención a modo de principio activo es un polipéptido conocido como "adiponectina", codificada por el producto de PCR y mostrada en los ejemplos descritos a continuación. La secuencia de ADN de longitud completa de la adiponectina humana presenta una longitud de 4.517 pb y la secuencia de ADN codificante de un marco de lectura abierta (ORF) presenta una longitud de 732 pb, tal como se muestra en SEC ID nº 2. La secuencia de aminoácidos codificada por la ORF está compuesta de una secuencia de 244 aminoácidos, tal como se muestra en SEC ID nº 1, y la secuencia génica ha sido registrada como nº de acceso de GenBank NM_004797. Además, la secuencia de ADN de longitud completa de la adiponectina de ratón presenta una longitud de 1.276 pb, tal como se muestra en la SEC ID nº 5, y la secuencia de ADN codificante de ORF presenta una longitud de 741 pb, tal como se muestra en la SEC ID nº 4. La secuencia de aminoácidos codificada por la ORF está compuesta de una secuencia de 247 aminoácidos, tal como se muestra en SEC ID nº 3, y la secuencia génica ha sido registrada como el número de acceso de GenBank AF304466. Además, se ha identificado expresión génica de adiponectina humana y de ratón específica del tejido adiposo.

La homología entre las secuencias de aminoácidos de la adiponectina humana y la adiponectina de ratón es de 83,61% y la homología entre las secuencias de ADN de ORF es de 79,78%. Estos niveles notablemente elevados de homología implican que ambos presentan la misma actividad.

Se ha descubierto que la adiponectina inhibe el agrandamiento anormal de los espacios alveolares de aire asociado

a los cambios destructivos de las paredes alveolares debido a lesiones crónicas, o muestra una mejora de la función pulmonar alcanzada mediante la inhibición de los cambios destructivos de las paredes alveolares, y han concluido que la adiponectina puede utilizarse preferentemente como fármaco.

5 Tal como se ha indicado anteriormente, debido a que la adiponectina puede inhibir el agrandamiento anormal de los espacios alveolares de aire asociados a cambios destructivos de las paredes alveolares debidos a lesiones crónicas, puede utilizarse para el tratamiento de neumopatías tales como el enfisema, la bronquitis crónica, la fibrosis quística, la bronquiectasia, la tuberculosis, la neumoconiosis y la COPD.

10 Documento de patente nº 1: WO1996/39429.
Documento de patente nº 2: WO1999/21577.
Documento no de patente nº 7: Maeda K. *et al.*, B.B.R.C. 221(2):286-289, 1996.

15 A continuación se describen la producción de adiponectina para la utilización como el principio activo de los agentes terapéuticos de neumopatías de la invención y la preparación de agentes terapéuticos de neumopatías que utilizan adiponectina como un principio activo, etc.

20 La designación de aminoácidos, péptidos, secuencias de nucleótidos, ácidos nucleicos, etc., mediante abreviaturas en la presente memoria de conformidad con las reglas de nomenclatura recomendadas por la IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem. 138:9, 1984), "The Guidelines for Drafting of Specifications Etc. Containing Nucleotide Sequence or Amino Acid Sequence Information" (editado por la Oficina de Patentes Japonesa (julio de 1998) y las convenciones en el campo de la técnica relevante.

25 Puede proporcionarse adiponectina en forma de una proteína recombinante mediante las técnicas de ingeniería genética establecidas (por ejemplo Science 224:1431, 1984; Biochem. Biophys. Res. Comm. 130:692, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5990, 1983). En este caso, a modo del gen adiponectina (apM1), puede utilizarse el gen previamente establecido por los presentes inventores (Biochem. Biophys. Res. Commun. 221:286-289, 1996).

30 Alternativamente, puede producirse la adiponectina mediante el método convencional de síntesis química de acuerdo con la información de la secuencia de aminoácidos codificada por dicho gen.

35 La producción de adiponectina mediante una técnica de ingeniería genética puede llevarse a cabo según un método descrito en el Ejemplo de referencia 1 a continuación. Más concretamente, la producción comprende construir un ADN recombinante con el que puede expresarse el gen codificante de la proteína objetiva en una célula huésped, introduciendo el ADN en la célula huésped para obtener un transformante y cultivar el transformante.

40 En la presente memoria, un polinucleótido (molécula de ADN) que comprende no sólo ADN de doble cadena sino también ADN de cadena sencilla, incluyendo cadenas de sentido y cadenas antisentido que las componen y no se encuentra limitado a una longitud del mismo. Por lo tanto, el polinucleótido codificante de la adiponectina incluye ADN de doble cadena que incluye ADN genómico y ADN de cadena sencilla (cadena de sentido) que incluye ADNc y el ADN de cadena sencilla (cadena antisentido) que presenta la secuencia complementaria a la cadena de sentido y fragmentos de ADN sintético de la misma, a menos que se indique lo contrario.

45 El polinucleótido (molécula de ADN) en la presente memoria no se encuentra definida por una región funcional, y puede incluir por lo menos una de entre una región de supresión de la expresión, una región codificante, una secuencia líder, un exón y un intrón.

50 El polinucleótido incluye además ARN y ADN. El polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos determinada y el polinucleótido que comprende la secuencia de ADN determinada incluye fragmentos, homólogos, derivados y mutantes de la misma.

55 Los mutantes del polinucleótido (ADN mutante) incluyen mutantes alélicas naturales, mutantes naturales y mutantes que presentan delección, sustitución, adición e inserción. Sin embargo, dichos mutantes codifican el polipéptido que presenta sustancialmente la misma función que la función del polipéptido codificado por el polinucleótido antes de la mutación.

60 La mutación del polipéptido (modificación de la secuencia de aminoácidos) no es necesario que se produzca de manera natural, por ejemplo por mutación o modificación postraducciona, y puede generarse artificialmente mediante la utilización de la proteína natural (por ejemplo la adiponectina humana). Los mutantes anteriormente indicados del polipéptido incluyen variantes alélicas, homólogos y mutantes naturales que presentan una homología de por lo menos 80%, preferentemente de 95% y más preferentemente una homología de 99% respecto al polipéptido antes de la mutación.

65 La homología del polipéptido o del polinucleótido puede analizarse mediante medición con el programa FASTA (Clustal V., Methods Mol. Biol. 25:307-318, 1994). Como método más preferible y simple para el análisis de homologías, resulta posible ejemplificar el método de la manera siguiente: la secuencia es almacenada en un medio

(por ejemplo un disco flexible, CD-ROM, unidad de disco duro, unidad de disco externo, DVD, etc.) capaz de ser leído por un ordenador, seguido de la búsqueda en la base conocida de datos de secuencias según un procedimiento de búsqueda bien conocido utilizando la secuencia almacenada. Entre los ejemplos específicos de base de datos de secuencias conocidas se incluyen los siguientes:

- 5 - base de datos de ADN de Japón (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>);
- GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/Genebank/Index.html>) y
- 10 - la base de datos de secuencias de ácidos nucleicos del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db.html).

El experto en la materia dispone de muchos algoritmos de búsqueda para el análisis de homologías. Un ejemplo de los mismos incluye un programa denominado BLAST. Existen 5 procedimientos BLAST en este programa. Tres de ellos (BLASTN, BLASTX y TBLASTX) han sido designados para la comprobación de la secuencia de nucleótidos. Los dos restantes han sido designados para la comprobación de la secuencia de la proteína (Coulson, Trends in Biotechnology 12:76-80, 1994; Birren *et al.*, Genome Analysis 1:543-559, 1997).

Además, se encuentran disponibles en la técnica programas adicionales, por ejemplo un programa de alineación de secuencias y un programa para identificar las secuencias separadas a más distancia, para el análisis de la secuencia identificada.

El ADN mutante es silencioso (ningún cambio en un residuo aminoácido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos mutada) o conservador para el aminoácido codificado por ella. Se muestran posteriormente ejemplos de una sustitución conservadora de aminoácidos.

Residuo aminoácido original	Residuo aminoácido sustituido conservadoramente
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln o His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn o Gln
Ile	Leu o Val
Leu	Ile o Val
Lys	Arg, Asn o Glu
Met	Leu o Ile
Phe	Met, Leu o Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp o Phe
Val	Ile o Leu

Generalmente, uno o más codones codificantes de un residuo Cys afectan a un enlace disulfuro del polipéptido particular.

La sustitución del residuo aminoácido que se cree generalmente que afecta a las características de la proteína incluye las siguientes:

- a) la sustitución de un residuo hidrófobo por un residuo hidrófilo, por ejemplo la sustitución de Leu, Ile, Phe, Val o Ala por Ser o Thr,
- b) la sustitución del residuo aminoácido diferente de Cys y Pro por Cys o Pro,
- c) la sustitución del residuo que presenta una cadena lateral eléctricamente positiva, por ejemplo Lys, Arg o His por un residuo eléctricamente negativo, por ejemplo Glu o Asp, y
- d) la sustitución de un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral extremadamente larga, por ejemplo Phe, por un residuo aminoácido que no presenta cadena lateral, por ejemplo Gly.
- e)

La adiponectina comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 o nº 3 o una secuencia de aminoácido que presenta una o más deleciones, inserciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de

aminoácidos SEC ID nº 1 ó nº 3, y presenta una actividad inhibidora del agrandamiento de los espacios alveolares de aire y/o un efecto de mejora de la función pulmonar.

5 La adiponectina puede ser el polipéptido expresado en un sistema de expresión de proteínas utilizando *Escherichia coli* o un sistema de expresión de proteínas utilizando baculovirus (AcNPV) mostrado en los Ejemplos descritos a continuación, mediante tecnología de recombinación génica o el polipéptido obtenido mediante síntesis química.

10 A título de ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de la adiponectina, un posible ejemplo es una de entre SEC ID nº 1 y nº 3. La secuencia de aminoácidos de la adiponectina no se encuentra limitada a una de entre SEC ID nº 1 y nº 3, y pueden ser aquéllas (homólogas) que presentan una determinada homología con la misma. Las homólogas pueden incluir los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos que presentan una o más deleciones, inserciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 o nº 3 y que presentan la actividad inhibidora de agrandamiento de los espacios alveolares de aire y/o la actividad inhibidora de la destrucción de las paredes alveolares, y el efecto de mejora de la función pulmonar (la actividad de inhibición del agrandamiento anormal de los espacios alveolares de aire asociada a cambios destructivos de las paredes alveolares debidos a lesiones crónicas y/o la actividad de inhibición de los cambios destructivos de las paredes alveolares).

20 Concretamente, entre los efectos de mejora de la función pulmonar de la adiponectina se incluyen un efecto de mejora o reducción de una disminución de la capacidad respiratoria de los pulmones o un incremento de la resistencia respiratoria en un tracto respiratorio (especialmente el tracto broncoalveolar) de mamíferos tales como el ser humano.

25 Como células huésped, pueden utilizarse células derivadas de eucariotas y procariotas. Entre las células eucarióticas se incluyen células de vertebrados y células de microorganismos eucarióticos. Como células de vertebrados, con frecuencia se utilizan la línea celular de mono COS (Cell 23:175, 1981), la línea celular de ovarios de hámster chino y la línea celular deficiente en dihidrofolato reductasa correspondiente (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980) y similares, aunque éstas no son opciones limitativas.

30 Como vector de expresión de origen vertebrado, generalmente puede utilizarse un vector que presenta una secuencia de promotor situada cadena arriba del gen que debe expresarse, un sitio de procesamiento de ARN (precursor), un sitio de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción. En caso necesario, el vector puede presentar además un origen de replicación. A título de ejemplo de dicho vector de expresión, puede mencionarse pSV2dhfr que incluye un promotor temprano de SV40 (Mol. Cell. Biol. 1:854, 1981).

35 Como microorganismos eucarióticos generalmente se utilizan levaduras. De ellos pueden utilizarse ventajosamente levaduras del género *Saccharomyces*. Como vector de expresión derivado de un microorganismo eucariótico, tal como una levadura, pAM82 que presenta un promotor del gen de la fosfatasa ácida (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1, 1983).

40 Como huésped procariótico, generalmente se utilizan *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. En el caso de que se utilicen como huéspedes con un vector plásmido capaz de replicarse en el microorganismo huésped, resulta posible utilizar convenientemente un plásmido de expresión obtenido mediante la incorporación de un promotor y una secuencia SD (Shine-Dalgarno) y un codón de inicio (por ejemplo ATG) necesaria para el inicio de la síntesis de proteínas en una posición cadena arriba del gen, de manera que pueda expresarse el gen en dicho vector. A modo de dicho *Escherichia coli* como huésped, generalmente se utiliza *E. coli* K12, y como el vector, generalmente se utiliza pBR322 o su producto de modificación. Sin embargo, éstas no son opciones limitativas sino que pueden utilizarse de manera similar diversas cepas bacterianas y vectores conocidos. Son ejemplos del promotor que pueden utilizarse, el promotor triptófano (trp), el promotor lpp, el promotor lac y el promotor PL/PR.

50 Como el vector para células de insecto, un posible ejemplo de un vector baculovirus (Takara) en el que se ha incorporado ADNc de adiponectina. Concretamente, el producto expresado de la presente invención puede obtenerse mediante la introducción del vector de expresión baculovirus en el que ha sido incorporado el ADNc de adiponectina en las células en cultivo BmN4 o en larvas de gusano de la seda (*Bombyx mori*) utilizando el virus de la polihedrosis nuclear (BmNPV) del gusano de la seda para la expresión, y aislándolo a partir de un medio de cultivo o un líquido corporal de gusano de la seda mediante cromatografía.

55 El producto expresado de la presente invención también puede obtenerse mediante la incorporación del ADNc de la adiponectina en el virus de la polihedrosis nuclear (AcNPV) de *Autographa californica*, expresándolo en células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* o en células Tn5 de *Trichoplusia ni*, y de manera similar purificándolo a partir de un sobrenadante de cultivo mediante cromatografía.

60 La introducción del ADN recombinante resultante en la célula huésped para la transformación puede llevarse a cabo según un método conocido.

65 El transformante resultante puede cultivarse según los métodos estándares, en los que se expresa y se produce

(acumulándola o secretándola) la proteína recombinante objetivo intracelularmente, extracelularmente o sobre la membrana celular. Como medio utilizado para el cultivo puede seleccionarse y utilizarse convenientemente según la célula huésped utilizada uno de entre los diversos medios utilizados comúnmente. El cultivo también puede llevarse a cabo bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de la célula huésped.

5 En caso necesario, la adiponectina obtenida de la manera anteriormente indicada puede aislarse y purificarse mediante diversos procedimientos de separación utilizando las características físicas, químicas y otras de la misma (Biochemical Data Book II, primera edición, 1a impresión, 23 de junio de 1980, páginas 1175-1259, publicado por Tokyo Kagaku Dojin K.K.; Biochemistry 25(25):8274, 1986; Eur. J. Biochem. 163:313, 1987, etc.). Más
10 concretamente, dicho aislamiento y purificación puede conseguirse mediante el tratamiento convencional de reconstitución, el tratamiento con un agente de precipitación de proteínas (precipitación con sales o "salting out"), la centrifugación, el método del choque osmótico, la sonicación, la ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida, tales como la cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), la cromatografía de adsorción, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), etc., y la diálisis, utilizados individualmente o en combinación.

Alternativamente, la adiponectina indicada anteriormente también puede producirse mediante el método general de síntesis química basándose en la información de la secuencia de aminoácidos. El método incluye los métodos convencionales en fase líquida y en fase sólida de síntesis peptídica. Con mayor detalle, cada uno de dichos
20 métodos incluye la técnica denominada de alargamiento en etapas, que comprende condensar los aminoácidos componentes uno después de otro para la extensión de la cadena según la información de la secuencia de aminoácidos y la técnica de condensación de fragmentos, que comprende sintetizar previamente fragmentos peptídicos cada uno de los cuales consiste en varios residuos aminoácidos y acoplarlos entre sí secuencialmente de acuerdo con dicha información.

También puede llevarse a cabo según los métodos estándares un método de condensación utilizado para la síntesis peptídica. Entre los ejemplos de los métodos estándares se incluyen un método de azida, un método de anhídridos ácidos mezclados, un método de DCC, un método de éster activo, un método de oxidación y reducción, un método de DPPA (difenílfosforilazida), un método de DDC + aditivo (1-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinamida, N-hidroxi-5-norbornén-2,3-dicarboximidida) y el método de Woodward.

El solvente que puede utilizarse en dichos métodos puede seleccionarse convenientemente de entre los solventes que es bien conocido que son utilizados en las reacciones de condensación de formación de péptidos. Entre los ejemplos de los mismos se incluyen la N,N-dimetilformamida (DMF), el dimetilsulfóxido (DMSO), la hexafluoramina, el dioxano, el tetrahidrofurano (THF), el acetato de etilo, etc., y mezclas de los mismos.

Tras la reacción de síntesis peptídica anteriormente indicada, el aminoácido no participante en la reacción o el grupo carboxilo en el péptido pueden protegerse en forma de éster de alquilo inferior, tal como éster de metilo, éster de etilo y éster de *tert*-butilo, y éster de aralquilo, tal como éster de bencilo, éster de p-metoxibencilo y éster de p-nitrobencilo, generalmente mediante esterificación.

El grupo hidroxilo en el aminoácido, tal como un residuo tirosina, que presenta un grupo funcional en la cadena lateral puede protegerse con acetilo, bencilo, benciloxicarbonilo, *tert*-butilo o similar, aunque dicha protección no resulta necesariamente indispensable.

Además, el grupo guanidino de un residuo arginina puede protegerse con un grupo protector apropiado, tal como nitro, tosilato, p-metoxibencenosulfonilo, metilén-2-sulfonilo, benciloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo o adamantiloxicarbonilo.

Las reacciones de eliminación de dichos grupos protectores de los aminoácidos o péptidos protegidos o de la proteína final pueden llevarse a cabo según los métodos utilizados comúnmente, tal como un método de reducción catalítica o un método que utilice amonio líquido/metal sodio, ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico o ácido metanosulfónico, y similares.

La adiponectina obtenida de esta manera puede purificarse mediante diversos métodos, tales como métodos que utilizan una resina de intercambio iónico, la cromatografía de partición y la cromatografía en gel, y un método de distribución en contracorriente utilizado comúnmente en el campo de la química de péptidos.

Los agentes terapéuticos de neumatías de la presente invención comprenden adiponectina o una sal farmacológicamente aceptable de la misma a modo de principio activo. La sal incluye aquellos con metales alcalinos, metales alcalino-térreos y amonio, tales como las sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario y amonio. Estas sales pueden producirse mediante métodos bien conocidos de la técnica. La sal anteriormente indicada incluye además sales de adición de ácido que pueden prepararse mediante la reacción de la adiponectina con un ácido orgánico o inorgánico adecuado de la manera conocida *per se*. Son ejemplos de sales de adición de ácido, hidrocloreto, hidrobromuro, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, p-toluenosulfonato (tosilato), citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, sulfonato, glicolato, ascorbato,

bencenosulfonato, napsilato y sales similares.

Los agentes terapéuticos de neumatías de la invención generalmente se proporcionan y se aplican en forma de una preparación farmacéutica que contiene una cantidad farmacológicamente efectiva del principio activo conjuntamente con un portador farmacéutico apropiado.

El portador que puede utilizarse en dichas preparaciones farmacéuticas incluye diversos diluyentes y/o excipientes, tales como rellenos, extensores, ligantes, humectantes, desintegrantes, surfactantes, lubricantes y similares. Estos portadores se utilizan opcionalmente según una forma de dosificación unitaria de la formulación resultante.

Las formas de dosificación unitaria de las preparaciones farmacéuticas pueden seleccionarse de entre diversas formas según el propósito de la terapia. Entre los ejemplos típicos se incluyen formas sólidas tales como comprimidos, píldoras, polvos, polvos finos, gránulos y cápsulas, y formas líquidas tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Estas preparaciones se clasifican, según la vía de administración, en preparaciones orales, preparaciones parenterales, preparaciones transnasales, preparaciones vaginales, supositorios rectales, comprimidos sublinguales, pomadas, y similares, y cada una de ellas puede formularse y moldearse, o procesarse de otro modo, mediante el procedimiento farmacéutico establecido. Además, dichas preparaciones farmacéuticas pueden contener diversos aditivos que pueden formularse en preparaciones farmacéuticas ordinarias, tales como estabilizadores, agentes antibacterianos, tampones, agentes isotonicantes, agentes quelantes, agentes de control del pH y surfactantes.

El estabilizador incluye albúmina de suero humano y L-aminoácidos, sacáridos y derivados de celulosa. Cada uno de ellos puede utilizarse solo o en combinación con un surfactante o similar. En particular, dicha combinación puede contribuir a una estabilidad incrementada del principio activo.

Los L-aminoácidos no se encuentran particularmente limitados y entre ellos se incluyen glicina, cisteína, ácido glutámico, etc.

Los sacáridos no se encuentran particularmente limitados, sino que entre ellos se incluyen monosacáridos tales como glucosa, manosa, galactosa y fructosa; alcoholes de azúcar tales como manitol, inositol y xilitol; disacáridos tales como sacarosa, maltosa y lactosa; y polisacáridos tales como dextrano, hidroxipropil-almidón, condroitín-sulfato y ácido hialurónico, y derivados de los mismos.

Los surfactantes no se encuentran particularmente limitados y pueden utilizarse surfactantes iónicos y no iónicos. Son ejemplos de los surfactantes, alquil-ésteres de polioxietilenglicol-sorbitán, alquil-éteres de polioxietileno, monoacil-ésteres de sorbitán y glicéridos de ácidos grasos.

Los derivados de celulosa no se encuentran particularmente limitados sino que entre ellos se incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etc.

Los sacáridos pueden utilizarse en una cantidad de por lo menos aproximadamente 0,0001 mg y preferentemente en una cantidad comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 10 mg por cada 1 µg del principio activo. Los surfactantes pueden utilizarse en una cantidad de por lo menos aproximadamente 0,00001 mg, y preferentemente en una cantidad comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,0001 mg y aproximadamente 0,01 mg por cada 1 µg del principio activo. La albúmina de suero humano puede utilizarse en una cantidad de por lo menos aproximadamente 0,0001 mg, y preferentemente en una cantidad comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,1 mg por cada 1 µg del principio activo. Los aminoácidos pueden utilizarse en una cantidad comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 10 mg por cada 1 µg del principio activo. Los derivados de celulosa pueden utilizarse en una cantidad de por lo menos aproximadamente 0,00001 mg, y preferentemente en una cantidad comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,1 mg por cada 1 µg del principio activo.

La cantidad del principio activo contenida en las preparaciones farmacéuticas de la presente invención puede seleccionarse convenientemente de entre un intervalo amplio. Resulta adecuado que la cantidad del principio activo se encuentre típicamente comprendida entre aproximadamente 0,00001 y aproximadamente 70% en peso, y preferentemente entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 5% en peso.

El tampón que puede incorporarse opcionalmente en las preparaciones farmacéuticas incluye ácido bórico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ε-aminocaproico, ácido glutámico y las sales correspondientes (por ejemplo sales con metales alcalinos o metales alcalino-térreos, tales como sales de sodio, potasio, calcio y magnesio). Entre los agentes isotonicantes se incluyen cloruro sódico, cloruro potásico, azúcares y glicerina. Entre los agentes quelantes se incluyen edetato sódico y ácido cítrico.

Las preparaciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en forma de una preparación líquida, y además pueden prepararse en una forma de dosificación liofilizada obtenida mediante liofilización de la formulación farmacéutica, que se prepara a una concentración apropiada que se utiliza mediante disolución en solución salina

que contiene tampón.

5 Durante el moldeo de la composición farmacéutica de la invención en forma de comprimido, puede utilizarse como el portador diversos excipientes, tales como lactosa, sacarosa, cloruro sódico, glucosa, urea, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa cristalina, ácido silícico y fosfato potásico; ligantes tales como agua, etanol, propanol, jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa y polivinilpirrolidona; desintegrantes, tales como carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa cálcica, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, almidón seco, alginato sódico, agar en polvo, laminarán en polvo, hidrogenocarbonato sódico y carbonato cálcico; surfactantes, tales como éster de ácido graso de polioxietilén-sorbitán, laurilsulfato sódico y monoglicérido de estearilo; inhibidores de desintegración, tales como sacarosa, estearina, manteca de cacao y aceite hidrogenado; estimulantes de la absorción, tales como base de amonio cuaternario y laurilsulfato sódico; humectantes, tales como glicerina y almidón; adsorbentes, tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita y ácido silícico coloidal; y lubricantes, tales como talco purificado, sal de ácido esteárico, ácido bórico en polvo y polietilenglicol.

15 Además, en caso necesario, los comprimidos obtenidos pueden recubrirse con materiales de recubrimiento convencionales, proporcionando comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos recubiertos de gelatina, comprimidos entéricos, comprimidos recubiertos con película o comprimidos de doble capa o multicapa.

20 Las píldoras pueden prepararse utilizando, como portador, excipientes tales como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceite vegetal hidrogenado, caolín y talco; ligantes tales como goma arábiga en polvo, goma tragacanto en polvo, gelatina y etanol, y desintegrantes tales como laminarán y agar.

25 En general, las cápsulas pueden prepararse mediante la mezcla del principio activo con los portadores anteriormente indicados según un método habitual, con el fin de incluir lo anterior en una cápsula de gelatina dura, una cápsula de gelatina blanda o similar.

30 La preparación líquida para la administración oral incluye soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes y elixires. Cada uno de ellos puede prepararse utilizando un diluyente inerte convencional, por ejemplo un vehículo farmacológicamente aceptable, incluyendo el agua. La preparación líquida puede suplementarse adicionalmente con diversos agentes auxiliares, tales como un agente humectante, un emulsionante y/o un agente de suspensión, y puede prepararse mediante el procedimiento establecido.

35 La preparación líquida para la administración parenteral, por ejemplo una solución, emulsión o suspensión acuosa o no acuosa estéril, puede prepararse mediante la utilización de un diluyente tal como agua, alcohol etílico, propilenglicol, polietilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxilado, ésteres de ácido graso de sorbitán polietoxilados y aceites vegetales tales como el aceite de oliva. La preparación líquida puede suplementarse con un éster orgánico que puede inyectarse o infundirse, tal como oleato de etilo. Dichas preparaciones pueden suplementarse adicionalmente con el solubilizador, tampón, agente humectante, emulsionante, agente de suspensión, conservante, dispersante y otros aditivos.

45 Dichas preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse mediante filtración a través de un filtro bacteriano, la incorporación de un bactericida, el tratamiento con irradiación, el tratamiento térmico o similar. Además, cada una de dichas preparaciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de una composición sólida estéril, que puede disolverse en agua esterilizada o en un medio esterilizable adecuado para la esterilización extemporánea.

50 Pueden prepararse supositorios rectales y preparaciones vaginales mediante la utilización de portadores, tales como polietilenglicol, manteca de cacao, un alcohol superior, un éster de alcohol superior, gelatina y un glicérido semisintético.

Pueden prepararse pomadas, tales como pastas, cremas y geles, mediante la utilización de uno o más diluyentes tales como petrolato blanco, parafina, glicerina, derivados de celulosa, propilenglicol, polietilenglicol, siliconas, bentonita y aceites vegetales tales como el aceite de oliva.

55 Pueden prepararse preparaciones farmacéuticas para la administración transnasal o sublingual utilizando el excipiente o excipientes estándares bien conocidos de la manera convencional.

60 Además, en caso necesario, las preparaciones farmacéuticas de la invención pueden suplementarse con agentes colorantes, conservantes, perfumes, saborizantes, edulcorantes u otras composiciones farmacéuticas.

65 El método para la administración de la preparación farmacéutica no se encuentra limitado, sino que se selecciona según la forma de dosificación, la edad del paciente, el sexo y otras condiciones, y el estado de la enfermedad. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos y cápsulas se administran por vía oral. Las inyecciones se administran intravenosamente solas o en una mezcla con una infusión ordinaria, tal como glucosa y aminoácido, y en caso necesario, se administran solas por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraperitoneal. Los supositorios se administran por vía intrarrectal. Las preparaciones vaginales se

administran en la vagina; las preparaciones nasales se administran en la nariz; las preparaciones sublinguales se administran en la cavidad oral y las pomadas se administran por vía percutánea tópicamente.

5 Para preparar la forma de polvos del principio activo de la presente invención, el ingrediente puede pulverizarse mediante los métodos habituales. Por ejemplo, el principio activo puede pulverizarse utilizando lactosa, almidón o similar, y después agitarse para obtener una mezcla homogénea.

10 De entre los métodos de administración, la administración pulmonar (inhalación) resulta más ventajosa que la administración oral debido a que los alveolos pulmonares son los órganos diana del tratamiento y resulta posible la exposición directa del sitio de tejido alveolar dañado, lo que evita efectos secundarios generalizados.

15 La cantidad de adiponectina contenida en el agente terapéutico de la presente invención no se encuentra limitada y puede seleccionarse convenientemente de entre un amplio intervalo. La adiponectina generalmente se encuentra contenida en una cantidad de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 70% en peso, preferentemente de entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 50% en peso, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 30% en peso en la composición farmacéutica.

20 La cantidad del principio activo contenida en la preparación farmacéutica y la dosis no se encuentran particularmente limitadas, sino que pueden seleccionarse de entre un amplio intervalo según el efecto terapéutico deseado, el método de administración, el periodo de tratamiento y la edad, sexo y otras condiciones del paciente. La dosis habitualmente se selecciona de manera que la concentración sanguínea del principio activo preferentemente sea de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 µg/ml, y más preferentemente de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 µg/ml. Esta preparación puede administrarse de una vez o en unas cuantas dosis divididas cada día.

25 La dosis del agente terapéutico de la invención se selecciona convenientemente según el método de utilización, la edad, sexo y otras condiciones del paciente y la severidad de la enfermedad. La cantidad de adiponectina habitualmente puede ser de entre 0,1 µg y aproximadamente 20 mg.

30 **Efectos ventajosos de la invención**

35 El agente que contiene adiponectina para la inhibición del agrandamiento de los espacios alveolares de aire o el agente que contiene adiponectina para la inhibición de la destrucción de las paredes alveolares de la presente invención presenta un efecto excelente de reducción del deterioro de la función pulmonar, tal como la obstrucción del flujo de aire, y resulta altamente efectivo en el tratamiento de las neumopatías asociadas al deterioro irreversible de la función pulmonar.

40 El agente que contiene adiponectina para la inhibición del agrandamiento de los espacios alveolares de aire o el agente que contiene adiponectina para la inhibición de la destrucción de las paredes alveolares de la presente invención es un fármaco altamente seguro con menos efectos secundarios adversos, tales como náuseas, vómitos, secreción de ácidos gástricos, etc.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 es un gráfico que muestra que la adiponectina presenta una actividad inhibitoria dependiente de la dosis sobre el agrandamiento de los espacios alveolares de aire causado por cambios destructivos progresivos de las paredes alveolares.

50 La figura 2 muestra secciones del tejido que indican cambios destructivos progresivos de las paredes alveolares y la actividad inhibitoria de la adiponectina sobre la destrucción progresiva de las paredes alveolares.

Descripción de las formas de realización

Ejemplo de preparación 1

55 La composición farmacéutica de la presente invención en la formulación inyectable se preparó mediante la adición y mezcla de 100 µg/ml de adiponectina humana (que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1), 0,01 mg/ml de Tween-80 (monooleato de sorbitán polioxietileno (20), polisorbato-80), 15 mg/ml de dextrano-40, 0,1 mg/ml de cisteína y 1,0 mg/ml de HSA (albúmina de suero humano) en tampón de ácido cítrico-citrato sódico 0,01 M (pH 6,0), filtrando la mezcla (utilizando un filtro de membrana de 0,22 µm), y después dispensando bajo condiciones estériles el filtrado en cantidades de 1 ml en viales y sometidos a liofilización. La formulación puede utilizarse mediante la disolución en 1 ml de solución salina.

Ejemplo de preparación 2

65 La composición farmacéutica de la presente invención en la formulación inyectable se preparó mediante la adición

de 10 µg/0,1 ml de adiponectina humana (que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1), 5 mg de ácido cisteico y 1 mg de albúmina de suero humano (HSA) en cada vial en agua destilada para inyección, rellenando cada vial con 1 ml de la solución resultante y liofilizándolos.

5 Ejemplo de preparación 3

La composición farmacéutica de la presente invención en la formulación inyectable se preparó mediante la adición de 0,5 mg de adiponectina, 80 mg de cloruro sódico, 20 mg de manitol, 34,5 mg de fosfato sódico y 45 mg de PEG en 10 ml de agua destilada para inyección, seguido de la filtración aséptica, la dispensación del filtrado en cantidades de 1 ml en viales asépticos y la liofilización de los mismos.

Ejemplo de referencia 1

Producción de una adiponectina humana recombinante

15 (1) Expresión de adiponectina humana en *Escherichia coli*

1) PCR de adiponectina humana

20 El gen de la adiponectina humana y la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo han sido depositados en GenBank bajo los números de acceso NM_004797 y D45371, respectivamente. La región codificante (CDS) se muestra como la secuencia entre el 27º y el 761º de la secuencia de nucleótidos. La secuencia de aminoácidos deducida de la misma se muestra en SEC ID nº 1. En esta secuencia, los residuos 1º a 14º constituyen un péptido de señal y los residuos 15º a 244º representan la adiponectina humana madura.

25 El gen de la adiponectina humana se amplificó mediante PCR utilizando el plásmido donado por Dr. Funahashi, The Second Department of Internal Medicine, Osaka University School of Medicine, a modo de molde.

30 El diseño permitió la amplificación de la secuencia de 693 pb entre el nucleótido 69º y el 761º de la secuencia de nucleótidos de la adiponectina humana con un sitio NdeI en el extremo 5' y un sitio BamHI en el extremo 3'; los cebadores de PCR se produjeron utilizando un sintetizador automático de ADN. Las secuencias de los cebadores de PCR se muestran en SEC ID nº 6 (directo) y nº 7 (inverso).

35 2) Subclonación del gen de la adiponectina humana (*apM1*)

El producto de PCR obtenido en la etapa 1) anterior se subclonó en el vector T pT7 Blue (Novagen) y se confirmó de que no existía ninguna mutación en su secuencia de nucleótidos (pT7-*apM1*).

40 3) Construcción de un vector de expresión

El vector de expresión pET3c (Novagen) se digirió con NdeI y BamHI para recuperar un fragmento de aproximadamente 4.600 pb. Por otra parte, el vector pT7-*apM1* obtenido en la etapa 1) anterior se digirió con NdeI y BamHI, recuperando un fragmento de aproximadamente 700 pb. Estos fragmentos se ligaron y el vector de expresión obtenido de esta manera se denominó pET3c-*apM1*.

45 4) Expresión en *Escherichia coli*

El huésped *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS se transformó con el vector pET3c-*apM1*, construido en la etapa 3) anterior, y se cultivó en 2xT.Y.Amp. (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl). Al entrar el organismo en la etapa logarítmica de crecimiento, se añadió IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) para inducir la producción de una adiponectina humana recombinante (*apM1*). Las células de *E. coli* antes y después de esta inducción con IPTG y el cuerpo de inclusión (la fracción insoluble de *E. coli*) tras dicha inducción con IPTG se muestrearon y se sometieron a SDS-PAGE y transferencia western para confirmar la expresión de la adiponectina humana.

55 5) Resultados y comentario

El producto de expresión en *E. coli*, obtenido de la manera anteriormente indicada, era una proteína de 230 residuos correspondiente a la secuencia ¹⁵Gly a ²⁴⁴Asn, excluyendo la secuencia de señal, de la secuencia de aminoácidos de la adiponectina humana, con la adición de Met derivado del codón de inicio en el extremo N-terminal.

E. coli obtenido mediante el procedimiento anteriormente descrito se analizó mediante SDS-PAGE. Como resultado, pudo confirmarse una banda de aproximadamente 30 kD en las células de *E. coli* y cuerpo de inclusión tras la inducción con IPTG.

65 A continuación, se llevó a cabo una transferencia western utilizando dos tipos de anticuerpos (anticuerpos

policlonales (péptidos sintéticos)). Ambos anticuerpos reaccionaron con dicha banda de aproximadamente 30 kD, mientras que no se detectó reacción en absoluto con el huésped *E. coli*.

5 La banda anterior de aproximadamente 30 kD se extrajo con el fin de investigar la secuencia de sus 10 residuos aminoácidos en el extremo N-terminal. La secuencia era igual a la secuencia esperada, con delección de la Met N-terminal en una población menor.

10 Se puso de manifiesto a partir de los resultados anteriores que la adiponectina humana recombinante se había expresado en forma de una proteína de aproximadamente 30 kD. La mayor parte de la adiponectina humana recombinante expresada se había acumulado intracelularmente en forma de un cuerpo de inclusión.

(2) Purificación de la adiponectina humana recombinante (apM1) a partir de *E. coli*

15 La purificación de la adiponectina humana recombinante de *E. coli* se llevó a cabo mediante el procedimiento en 5 etapas siguientes:

1) Cultivo de *E. coli*

20 Se transformó *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) con el vector de expresión pET3c-apM1 precultivado en 2xT.Y.Amp.Cm (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, cloranfenicol 25 µg/ml y 5 g de NaCl) (37°C, cultivo bajo agitación). Al día siguiente, el cultivo se diluyó con 100 volúmenes de 2xT.Y.Amp y se incubó adicionalmente. Tras 2 a 3 horas de incubación, tras alcanzar la DO550 del líquido de cultivo entre 0,3 y 0,5, se añadió IPTG a una concentración final de 0,4 mM para inducir la producción de adiponectina humana recombinante (apM1). Aproximadamente 3 a 5 horas después de la adición de IPTG, se centrifugó el líquido de cultivo (5.000 rpm, 20 minutos, 4°C) y el sedimento de *E. coli* obtenido de esta manera se conservó bajo congelación.

2) Preparación de un cuerpo de inclusión a partir de *E. coli*

30 El sedimento de *E. coli* se suspendió en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y se trató con lisozima a 37°C durante 1 hora. A continuación, se añadió Triton X-100 (Katayama Kagaku) a una concentración final de 0,2%. Esta solución se sonicó (sonicador Branson, control de salida 5, 30 s) y se centrifugó (12.000 rpm, 30 minutos, 4°C) y se recuperó el sedimento. Este sedimento se suspendió en 25 ml de Triton X-100 al 0,2% suplementado con Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y la suspensión se sonicó (bajo las mismas condiciones que las indicadas anteriormente).

35 La solución resultante se centrifugó y el sedimento se lavó mediante el mismo procedimiento que el indicado anteriormente. El sedimento obtenido de esta manera se consideró que era el cuerpo de inclusión.

3) Replegamiento del cuerpo de inclusión

40 El cuerpo de inclusión se solubilizó con una pequeña cantidad de HCl de guanidina 7 M, Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) y 2ME al 1%. Esta solución se añadió gota a gota a un volumen de 200 veces de urea 2 M, Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), se diluyó y se dejó en reposo a 4°C durante 3 noches.

4) Concentración de la solución replegada

45 La solución después del replegamiento anteriormente indicado se centrifugó (9.000 rpm, 30 minutos, 4°C) y el sobrenadante se concentró a aproximadamente 1/100 mediante ultrafiltración utilizando una membrana Amicon YM-10. Este concentrado se dializó frente a Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) y el dializado se filtró a través de un filtro de 0,45 µm.

50 5) HPLC de intercambio aniónico en DEAE-5PW

La muestra obtenida en la etapa 4) anterior se aisló y se purificó mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPLC) con DEAE-5PW (Tosoh Corporation). Como tampón de partida se utilizó Tris-HCl 20 mM (pH 7,2) y la elución se llevó a cabo con un gradiente de NaCl (NaCl 0→1 M/60 ml) bajo seguimiento de la absorbancia a 280 nm. El eluido se recogió en fracciones de 1 ml y cada fracción se analizó mediante SDS-PAGE.

6) Resultados y comentario

60 Debido a que la adiponectina humana recombinante (apM1) se había expresado en forma un cuerpo de inclusión en *E. coli*, su purificación se llevó a cabo mediante solubilización y replegamiento del cuerpo de inclusión. Como resultado, la adiponectina humana recombinante se solubilizó y se separó en la columna de intercambio aniónico. Las fracciones de picos (fracciones nº 30 a nº 37) se analizaron mediante SDS-PAGE. Como resultado, se observó una banda de aproximadamente 30 kD. En este análisis, se detectó un rastro débil en el fondo, aunque debido a que la mayor parte de la proteína se consideró que era la adiponectina humana recombinante (apM1), se utilizó esta banda de aproximadamente 30 kD (adiponectina humana recombinante) como el antígeno en la inmunización

posterior de conejos y ratones, y el principio activo de los agentes terapéuticos de neumopatías de la invención.

(3) Preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales anti-adiponectina humana

5 1) Preparación del anticuerpo policlonal

La adiponectina humana recombinante, 100 µg/cuerpo, se mezcló con adyuvante completo en una proporción 1:1 y se inmunizaron 5 conejos con la mezcla 8 veces a intervalos de 2 semanas con el fin de obtener un anticuerpo policlonal anti-adiponectina humana (códigos de identificación: OCT9101-OCT9105).

10

2) Preparación del anticuerpo monoclonal

La adiponectina humana recombinante, 20 µg/cuerpo, se mezcló con adyuvante completo en una proporción 1:1 y se inmunizaron ratones con las mezclas 3 veces a intervalos de 2 semanas. A continuación, se llevó a cabo la inmunización final sin el adyuvante 3 días antes de la fusión celular. La fusión celular entre las células de bazo de ratón y las células de mieloma se llevó a cabo mediante el método PEG y el hibridoma se seleccionó en medio HAT.

15

El cribado para una línea celular productora de anticuerpos de la adiponectina humana se llevó a cabo mediante ELISA utilizando la placa inmunológica recubierta con el antígeno (adiponectina humana recombinante) y el hibridoma se clonó mediante el método de la dilución limitante.

20

De la manera anteriormente indicada se obtuvieron 11 líneas de hibridoma productoras de anticuerpo anti-adiponectina humana, denominadas KOCO9101-KOCO9111. Un hibridoma, de entre ellos, se depositó en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japón (NIBH, Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) el 8 de junio de 1998 (fecha del depósito original) (código de identificación asignado por el depositante: KOCO9108) y la petición de conversión al depósito bajo el Tratado de Budapest se presentó el 7 de octubre de 1998. El número de acceso del depósito final es FERM BP-6542.

25

Los hibridomas en forma de clones individuales se administraron respectivamente por vía intraperitoneal en ratones tratados con pristano previamente y se recolectó el líquido ascites (códigos de identificación: ANOC9101-9111).

30

3) Purificación de anticuerpos

Se purificaron el antisuero de conejo (anticuerpo policlonal) y el líquido ascites de ratón (anticuerpo monoclonal) respectivamente utilizando una columna con proteína A.

35

4) Expresión de adiponectina humana en células animales

El ADNc de la adiponectina se extrajo con EcoRI y se insertó en el sitio EcoRI del vector de expresión pCIneo (Promega Corp.). La célula COS-1 (ATCC nº CRL1650) se transfectó con el vector pCIneo-adiponectina humana anteriormente indicado utilizando lipofectamina (Gibco BRL) y el sobrenadante de cultivo y las células se recolectaron tras 72 horas.

40

5) Transferencia western de adiponectina humana

45

En primer lugar, el extracto de tejido adiposo, las células COS-1, el sobrenadante del cultivo de células COS-1, plasma humano sano y la adiponectina humana recombinante se sometieron a 2 ME(+) SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa.

50

Se hizo reaccionar dicha membrana con el anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana (ANOC9104) y después con el anticuerpo marcado con HRP, y la detección se llevó a cabo con ECL (reactivo de detección en transferencia western, Amersham).

55

Como resultado, se detectó una banda de aproximadamente 35 kD para el extracto de tejido adiposo, pCIneo-adiponectina humana/células COS-1 y plasma humano sano, pero no se observó para el sobrenadante del cultivo celular de pCIneo/células COS-1 ó para pCIneo/células COS-1.

60

Con el sobrenadante de cultivo de las células pCIneo-adiponectina humana/COS-1, pudo confirmarse una banda de 35 kD, aunque era de intensidad excesivamente débil para ser fácilmente discernible.

60

Ejemplo de referencia 2

Las células CHO que expresan la adiponectina de ratón de fusión con etiqueta His N-terminal (clon nº 5) se cultivaron a gran escala y se recolectó el sobrenadante resultante. Mediante la utilización de una resina Ni-NTA se purificó la adiponectina etiquetada con His.

65

Ejemplo de referencia 3

El ADN de longitud completa, tal como se muestra en SEC ID nº 5, de la adiponectina de ratón se integró en un vector de expresión y se expresó en *E. coli*, proporcionando una gran cantidad de adiponectina de ratón expresada. El sobrenadante de las células de *E. coli* rotas se aplicó a una columna abierta de DEAE-sefariosa y se llevó a cabo la elución utilizando un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. A continuación, se recogieron las fracciones eluidas y se sometieron a fraccionamiento con sulfato amónico saturado al 30%. El sobrenadante se aplicó a una columna abierta de butilo-Toyopearl y la elución se llevó a cabo con un gradiente de sulfato amónico saturado 30% a 0%. Finalmente, se llevó a cabo la filtración en gel para purificar la adiponectina de ratón.

Ejemplo 1

Mediante la utilización de ratones modelo (C57BL/6J) que habían desarrollado un trastorno pulmonar como resultado del tratamiento con elastasa, se examinó la adiponectina para sus efectos terapéuticos sobre las neumatías obstructivas crónicas caracterizadas por la limitación irreversible del flujo de aire.

Tras la destrucción de las paredes alveolares del ratón modelo mediante la administración intratraqueal de una vez de elastasa, continuó posteriormente la destrucción crónica de las paredes alveolares, expandiendo las lesiones de enfisema (control en la figura 2). Dichos cambios están indicados por la intersección lineal media, que es un índice de evaluación utilizado generalmente (Dunnill M.S., Thorax 17:320-328, 1962). El grado de destrucción de las paredes alveolares se evaluó mediante la medición del tamaño de los alveolos individuales.

De esta manera, en el modelo de ratón, el tratamiento de elastasa provoca la destrucción de las paredes alveolares, resultando de esta manera en la expansión del diámetro alveolar, lo que es equivalente a lesiones de enfisema y el deterioro de la función pulmonar.

La administración intratraqueal de una vez de elastasa en los ratones resultó en la destrucción de las paredes alveolares y en consecuencia en la ruptura de los vasos sanguíneos, causando un sangrado transitorio y la infiltración de neutrófilos en los alveolos; sin embargo, esta inflamación desapareció en tres días. Por lo tanto, en el experimento, puede verificarse que el efecto de la adiponectina no se deriva de la acción inhibitoria de la elastasa.

Se asignaron ratones hembra de 6 o 7 semanas de edad (C57BL/6L, Japan Charles River Co., Ltd.) a 4 grupos (A a D, 6 ratones en cada grupo) basándose en el peso corporal utilizando la aleatorización estratificada (SAS Institute Japan, R8.1), tal como se muestra en la Tabla 1. Cada ratón se sometió a anestesia con pentobarbital.

Tabla 1

Grupo	Tratamiento de elastasa	Sustancia administrada (concentración)	Dosis de adiponectina (mg/ratón) (50 µl)	Número de ratones
A	No realizado	-	-	6
B	Realizado	Solución salina normal	-	6
C	Realizado	Adiponectina (0,02 mg/ml)	0,001	6
D	Realizado	Adiponectina (0,2 mg/ml)	0,01	6

A continuación, utilizando un pulverizador (un producto de Penn Century Inc.), se administraron solución salina normal (solución salina normal de Otsuka, producida por Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) y elastasa de neutrófilos humanos (producida por Elastin Products Co., Inc.) por vía intratraqueal por la laringe en los ratones del Grupo A y en los ratones de los Grupos B a D, respectivamente, en un volumen de 50 µl/ratón. La dosis de elastasa era de 20U/ratón. Pasados tres días de la administración intratraqueal de elastasa, se administró intratraquealmente adiponectina una vez al día durante 18 días en los ratones del Grupo C a una dosis de 0,001 mg/ratón y en los ratones del Grupo D a una dosis de 0,01 mg/ratón. La adiponectina utilizada en la administración se obtuvo mediante la disolución en un solvente (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 0,5 M) de la adiponectina de ratón derivada de células CHO obtenida en el Ejemplo de referencia 2, anteriormente. La adiponectina se diluyó con una cantidad adecuada de solución salina normal hasta una concentración utilizada de 0,2 mg/ml ó 0,02 mg/ml. Las soluciones de cada concentración se dividieron en unidades de dosificación diaria y se liofilizaron a -20°C hasta la fecha de administración. En el momento de la utilización, se descongeló la solución congelada. En el grupo de control de elastasa (Grupo B), se administró solución salina normal en lugar de adiponectina durante el mismo periodo. Se administró por vía intratraqueal adiponectina o solución salina normal por la laringe en un ratón bajo anestesia de isoflurano inhalado en un volumen de 50 µl/ratón utilizando un pulverizador. Tras 18 días de administración intratraqueal continua, se eutanizó cada ratón mediante sangrado por la aorta abdominal bajo anestesia con isoflurano inhalado. Se extirparon los pulmones y se sometieron a fijación mediante perfusión con una solución de

formalina tamponada neutra al 10%. A continuación, el tejido pulmonar fijado se sometió a inclusión en parafina, corte de secciones finas, tinción tricrómica de Masson y tinción con HE en el BioPathology Institute Co., Ltd. Se evaluó el tejido patológicamente mediante la medición de la intersección lineal media, que es un indicador objetivo del daño alveolar.

5 Se calculó la intersección lineal media (L_m) utilizando la fórmula $L_m=NxL/m$, en la que N es el número de líneas transversales, L es la longitud de una línea transversal y m es el número total de paredes alveolares que intersectan con las líneas transversales.

10 Análisis estadístico

Con el fin de examinar las actividades de los fármacos, se llevó a cabo una prueba de Dunnett mediante la comparación del grupo de control de elastasa (Grupo B) con los Grupos C y D. Se llevó a cabo cada análisis con la prueba de dos colas y se fijó el nivel de significancia en 5%. El análisis se llevó a cabo utilizando el software SAS (SAS Institute Japan, R8.1). Se muestran los resultados en la figura 1.

15 La intersección lineal media era de $152,5 \pm 14,7 \mu\text{m}$ en el Grupo B, mientras que era de $115,2 \pm 17,3 \mu\text{m}$ en el Grupo C y de $81,7 \pm 20,4 \mu\text{m}$ en el Grupo D. Se demostraron actividades inhibitoras significativas según la dosis de adiponectina (media \pm S.D., $P<0,05$). En el Grupo A, la intersección lineal era de $73,0 \pm 6,6 \mu\text{m}$.

20 Los resultados revelan que la administración pulmonar continua de adiponectina presenta la actividad dependiente de la dosis de reducir el incremento de la intersección lineal media provocada por el tratamiento de elastasa.

25 Concretamente, se confirmó que la administración continua de adiponectina suprimía el agrandamiento de los espacios alveolares de aire provocados por los cambios destructivos progresivos de las paredes alveolares.

La figura 2 muestra secciones de tejido que indican los cambios destructivos progresivos de las paredes alveolares. Revela que la progresiva destrucción de las paredes alveolares en los grupos que reciben la administración continua de adiponectina (Grupos C y D) evidentemente resulta más inhibida que en el grupo de control (Grupo B) y que esta actividad inhibitora es mayor en el Grupo D.

30 Concretamente, se confirmó que la administración continua de adiponectina suprimió el desarrollo de cambios destructivos de las paredes alveolares.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
- <120> Agente para el tratamiento de una neumopatía
- 5 <130> P09-96
- <150> JP 2008-217721
- <151> 2008-8-27
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.1
- 10 <210> 1
- <211> 244
- <212> PRT
- <213> homo sapiens
- 15 <400> 1

Met	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	His
1				5					10					15	
Asp	Gln	Glu	Thr	Thr	Thr	Gln	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro
			20					25					30		
Lys	Gly	Ala	Cys	Thr	Gly	Trp	Met	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	His	Pro	Gly
		35					40					45			
His	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Pro	Gly	Glu
	50					55					60				
Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Ile
65					70					75					80
Gly	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Pro	Arg	Gly	Phe	Pro	Gly
				85					90					95	
Ile	Gln	Gly	Arg	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Val	Tyr	Arg
			100					105					110		
Ser	Ala	Phe	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Thr	Tyr	Val	Thr	Ile	Pro	Asn	Met
		115					120					125			
Pro	Ile	Arg	Phe	Thr	Lys	Ile	Phe	Tyr	Asn	Gln	Gln	Asn	His	Tyr	Asp
	130					135					140				
Gly	Ser	Thr	Gly	Lys	Phe	His	Cys	Asn	Ile	Pro	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Phe
145					150					155					160
Ala	Tyr	His	Ile	Thr	Val	Tyr	Met	Lys	Asp	Val	Lys	Val	Ser	Leu	Phe
				165					170					175	
Lys	Lys	Asp	Lys	Ala	Met	Leu	Phe	Thr	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Gln	Glu	Asn
			180					185					190		
Asn	Val	Asp	Gln	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	His	Leu	Glu	Val	Gly
		195					200					205			
Asp	Gln	Val	Trp	Leu	Gln	Val	Tyr	Gly	Glu	Gly	Glu	Arg	Asn	Gly	Leu
	210					215					220				
Tyr	Ala	Asp	Asn	Asp	Asn	Asp	Ser	Thr	Phe	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Tyr
225					230					235					240
His	Asp	Thr	Asn												

- <210> 2
- 20 <211> 735
- <212> ADN
- <213> homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 25 <222> (1)...(735)
- <400> 2

atgctgttgc	tgggagctgt	tctactgcta	ttagctctgc	ccgggcatga	ccaggaaacc	60
acgactcaag	ggcccggagt	cctgcttccc	ctgcccgaag	gggcctgcac	aggttggatg	120
gcgggcatcc	cagggcatcc	gggccataat	ggggccccag	gccgtgatgg	cagagatggc	180
acccctgggtg	agaagggtga	gaaaggagat	ccaggtctta	ttggtcctaa	gggagacatc	240
ggtgaaaccg	gagtaccggg	ggctgaagg	ccccgaggct	ttccgggaat	ccaaggcagg	300
aaaggagaac	ctggagaagg	tgccatgta	taccgctcag	cattcagtgt	gggattggag	360
acttacgtta	ctatcccaa	catgccatt	cgctttacca	agatcttcta	caatcagcaa	420
aaccactatg	atggctccac	tggtaaattc	cactgcaaca	ttcctgggct	gtactacttt	480
gcctaccaca	tcacagtcta	tatgaaggat	gtgaagggtc	gcctcttcaa	gaaggacaag	540
gctatgctct	tcacctatga	tcagtaccag	gaaaataatg	tggaccaggc	ctccggctct	600
gtgctcctgc	atctggaggt	gggcgaccaa	gtctggctcc	aggtgtatgg	ggaaggagag	660
cgtaatggac	tctatgctga	taatgacaat	gactccacct	tcacaggctt	tcttctctac	720
catgacacca	actga					735

- 30 <210> 3
- <211> 247

ES 2 421 151 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

Met	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Leu	Pro	Ser	His	
1				5				10					15		
Ala	Glu	Asp	Asp	Val	Thr	Thr	Thr	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro	Ala	Leu	Val
			20					25				30			
Pro	Pro	Pro	Lys	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Trp	Met	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly
		35					40					45			
Ile	Pro	Gly	Ile	His	Val	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly
	50					55					60				
Thr	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro
					70					75					80
Lys	Gly	Glu	Thr	Gly	Asp	Val	Gly	Met	Thr	Gly	Ala	Glu	Gly	Pro	Arg
				85					90					95	
Gly	Phe	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala
			100					105						110	
Tyr	Val	Tyr	Arg	Ser	Ala	Phe	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Thr	Arg	Val	Thr
		115						120				125			
Val	Pro	Asn	Val	Pro	Ile	Arg	Phe	Thr	Lys	Ile	Phe	Tyr	Asn	Gln	Gln
		130				135					140				
Asn	His	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Gly	Lys	Phe	Tyr	Cys	Asn	Ile	Pro	Gly
					150					155					160
Leu	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Tyr	His	Ile	Thr	Trp	Met	Lys	Asp	Val	Lys	Val
				165					170					175	
Ser	Leu	Phe	Lys	Lys	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Phe	Thr	Tyr	Asp	Gln	Tyr
			180					185					190		
Gln	Glu	Lys	Asn	Val	Asp	Gln	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	His	Leu
		195					200					205			
Glu	Val	Gly	Asp	Gln	Val	Trp	Leu	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Gly	Asp	His
	210					215					220				
Asn	Gly	Leu	Tyr	Ala	Asp	Asn	Val	Asn	Asp	Ser	Thr	Phe	Thr	Gly	Phe
					230					235					240
Leu	Leu	Tyr	His	Asp	Thr	Asn									
				245											

5

<210> 4
 <211> 744
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(744)
 <400> 4

10

15

atgctactgt	tgcaagctct	cctgttcctc	ttaatcctgc	ccagtcatgc	cgaagatgac	60
gttactacaa	ctgaagagct	agctcctgct	ttggtccctc	cacccaaggg	aacttgtgca	120
ggttggatgg	cagcatccc	aggacatcct	ggccacaatg	gcacaccagg	ccgtgatggc	180
agagatggca	ctcctggaga	gaagggagag	aaaggagatg	caggtcttct	tggtcctaag	240
ggtgagacag	gagatgttgg	aatgacagga	gctgaagggc	cacggggctt	ccccggaacc	300
cctggcagga	aaggagagcc	tggagaagcc	gcttatgtgt	atcgtcagc	gttcagtgtg	360
gggctggaga	cccgcgtcac	tgttcccaat	gtacccattc	gctttactaa	gatcttctac	420
aaccaacaga	atcattatga	cggcagcact	ggcaagttct	actgcaacat	tccgggactc	480
tactacttct	cttaccacat	cacgggtgtac	atgaaagatg	tgaaggtgag	cctcttcaag	540
aaggacaagg	ccgttctctt	cacctacgac	cagtatcagg	aaaagaatgt	ggaccaggcc	600
tctggctctg	tgctcctcca	tctggagggtg	ggagaccaag	tctggctcca	ggtgatggg	660
gatggggacc	acaatggact	ctatgcagat	aacgtcaacg	actctacatt	tactggcttt	720
cttctctacc	atgataccaa	ctga				744

20

25

<210> 5
 <211> 1276
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (39)...(782)
 <400> 5

ES 2 421 151 T3

```

ctctaaagat tgtcagtgga tctgacgaca ccaaaagggc tcaggatgct actgttgcaa      60
gctctcctgt tctctttaat cctgcccagt catgccgaag atgacgttac tacaactgaa      120
gagctagctc ctgctttggt cctccacccc aagggaaactt gtgcagggtg gatggcaggc      180
atcccaggac atcctggcca caatggcaca ccaggccgtg atggcagaga tggcactcct      240
ggagagaagg gagagaaagg agatgcaggt ctctttggtc ctaaggggtg gacaggagat      300
gttggaatga caggagctga agggccacgg ggcttccccg gaacccttgg caggaaagga      360
gagcctggag aagccgctta tatgtatcgc tcagcgttca gtgtggggct ggagaccgcg      420
gtcactgttc ccaatgtacc cattcgcttt actaagatct tctacaacca acagaatcat      480
tatgacggca gcactggcaa gttctactgc aacattccgg gactctacta cttctcttac      540
cacatcacgg tgtacatgaa agatgtgaag gtgagcctct tcaagaagga caaggccggt      600
ctcttcacct acgaccagta tcaggaaaag aatgtggacc aggcctctgg ctctgtgctc      660
ctccatctgg aggtgggaga ccaagtctgg ctccagggtg atggggatgg ggaccacaat      720
ggactctatg cagataacgt caacgactct acatttactg gctttcttct ctaccatgat      780
accaactgac tgcaactacc catagcccat acaccaggag aatcatggaa cagtcgacac      840
actttcagct tagtttgaga gattgatttt attgcttagt ttgagagtcc tgagtattat      900
ccacacgtgt actcacttgt tcattaaacg actttataaa aaataatttg tgttcctagt      960
ccagaaaaaa aggcactccc tggctccac gactcttaca tggtagcaat aacagaatga      1020
aaatcacatt tggatgggg gcttcacaat attcgcataa ctgtctggaa gtagaccatg      1080
ctatcttctt gctcactgta cacaaatatt gtccacataa accctataat gtaaatatga      1140
aatacagtga ttactcttct cacaggctga gtgtatgaat gtctaaagac ccataagtat      1200
taaagtggta gggataaatt ggaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaaactt tagagcacac      1260
tggcggccgt tactag

```

<210> 6

<211> 29

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido como secuencia de cebador (directo) para la adiponectina

<400> 6

10 aacatatggg gcatgaccag gaaaccacg 29

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido como secuencia de cebador (inverso) para la adiponectina

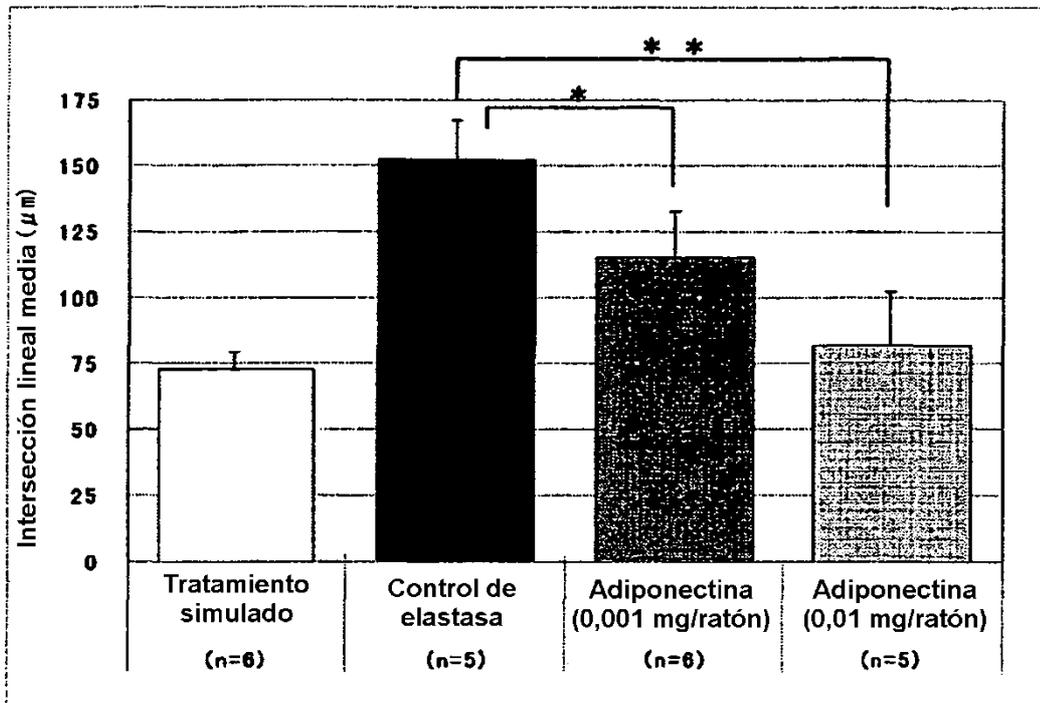
<400> 7

20 aaggatcctc agttgggtgc atggtagag 29

REIVINDICACIONES

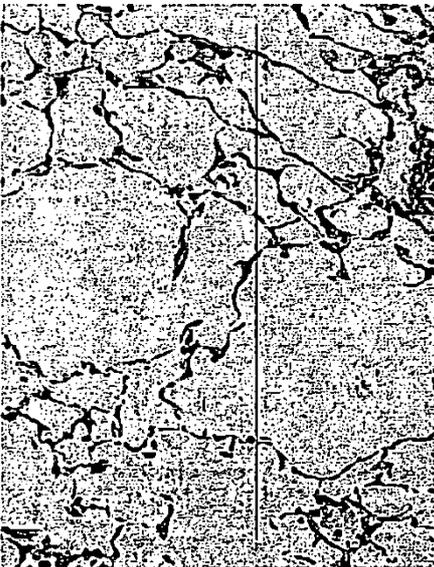
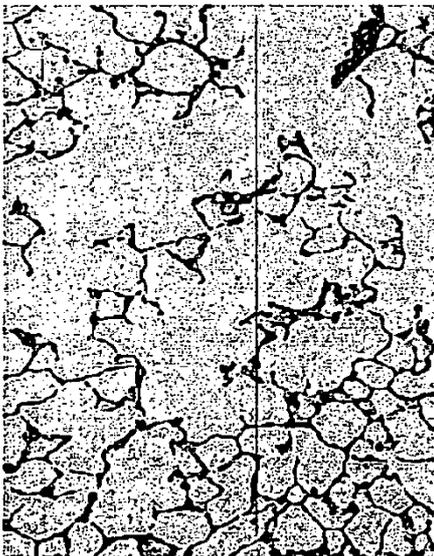
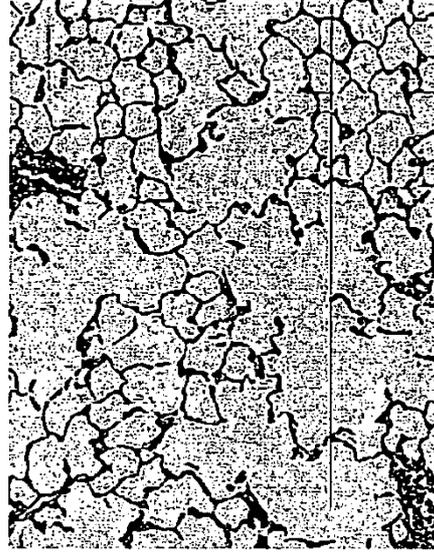
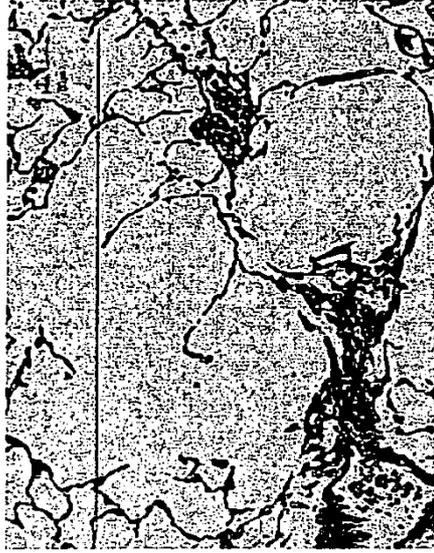
- 5 1. Agente para la utilización para la inhibición del agrandamiento de los espacios alveolares de aire, que comprende adiponectina.
2. Agente para la utilización según la reivindicación 1, en el que la adiponectina se encuentra contenida en una cantidad de 0,01% a 70% en peso.
- 10 3. Agente para la utilización para la inhibición de la destrucción de las paredes alveolares, que comprende adiponectina.
4. Agente para la utilización según la reivindicación 3, en el que la adiponectina se encuentra contenida en una cantidad de 0,01% a 70% en peso.

[Fig. 1]



(Media \pm SD) * : P < 0,05, ** : P < 0,01 (Prueba de Dunnett)

[Fig.2]



Adiponectina 0,01 mg/ratón (50 µ L)

Adiponectina 0,001 mg/ratón (50 µ L)

Tinción tricrómica de Masson
(x 400)