(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 647 472**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2007** **E 15154393 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017** **EP 2918288**

(54) Título: **Anticuerpos contra TGF-BETA para uso en el tratamiento de lactantes con riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar**

(30) Prioridad:

03.10.2006 US 827933 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

(73) Titular/es:

GENZYME CORPORATION (50.0%)
500 Kendall Street
Cambridge, MA 02142, US y
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION (50.0%)

(72) Inventor/es:

STREISAND, JAMES B. y
ROBERTS, JESSE D.

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 647 472 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

Anticuerpos contra TGF-BETA para uso en el tratamiento de lactantes con riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar

Campo técnico

La invención se refiere al uso de antagonistas de TGF-β para tratar lactantes con riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar, incluyendo lactantes prematuros.

Antecedentes

Los lactantes nacidos en una etapa muy temprana del desarrollo sufren habitualmente insuficiencia respiratoria debido a sus pulmones no maduros, su actividad respiratoria primitiva, y a su vulnerabilidad a la infección. La displasia broncopulmonar (BPD), una enfermedad pulmonar crónica en lactantes prematuros, se caracterizó por primera vez hace casi 40 años (Northway, N. Engl. J. Med. 276:357-368 (1967); Jobe et al., Am. J. Resp. Crit. Card. Med. 163:1723-1729 (2001)).

Como se describió inicialmente, BPD fue una afección que ocurría principalmente en lactantes que tenían un tamaño y madurez suficientes para sobrevivir a los estragos de la exposición prolongada a una ventilación de presión positiva y rica en oxígeno. Éstos fueron principalmente lactantes nacidos entre 28 y 32 semanas de gestación y que pesaron entre 1.000 y 1.500 gramos al nacer. Su evolución clínica y patología pulmonar reflejaron las consecuencias de toxicidad por oxígeno pulmonar y sobreexpansión del pulmón graves. Las descripciones patológicas iniciales de BPD señalaron lesión de las vías respiratorias, inflamación, fibrosis intersticial, hiperplasia de células del músculo liso, y metaplasia escamosa en las vías respiratorias distales. La mortalidad entre estos lactantes fue elevada, y la insuficiencia respiratoria dependiente de un ventilador a largo plazo fue habitual entre los supervivientes (Bland, Biol. Neonate 88:181-191 (2005)).

Con el advenimiento de la terapia de tensioactivos, el uso ampliamente extendido de la terapia de esteroides antenatal, y el uso de terapias con ventilador y nutricionales avanzadas, se ha cambiado considerablemente la epidemiología y patofisiología de BPD. Ahora casi dos tercios de lactantes que adquieren BPD pesan menos de 1.000 g y nacen antes de las 28 semanas de gestación (Martinez et al., en Chronic Lung Disease in Early Infancy, p. 21-39; Nueva York, Marcel Dekker (2000); Bancalori et al., Id. en p. 41-64). En contraste con la experiencia pasada, cuando la toxicidad por oxígeno pulmonar y la sobreexpansión del pulmón se consideraban contribuyentes importantes al desarrollo de lesión pulmonar crónica, los lactantes prematuros que desarrollan BPD ahora están expuestos a menores niveles de oxígeno y ventilación mecánica.

Además, la patología pulmonar de estos lactantes extremadamente inmaduros con BPD difiere de la “forma clásica” de BPD. Algunas veces denominada como la “nueva BPD”, la enfermedad principalmente está asociada ahora con desarrollo pulmonar terminal interrumpido. La inspección microscópica de los pulmones de bebés que han muerto por BPD revela una detención parcial a total en el desarrollo del pulmón distal (Husain et al., Hum. Pathol. 29:710-717 (1998)). Esto da como resultado unidades pulmonares periféricas de bebés con BPD que tienen alveologénesis reducida y desarrollo de microvasculatura disminuido y dismórfico.

El desarrollo de los sacos de aire pulmonares es crucial para la supervivencia extrauterina. El desarrollo del pulmón se puede dividir en cinco etapas que se solapan: embriónica temprana (3-7 semanas de gestación), pseudoglandular (5-17 semanas de gestación), canalicular (16-26 semanas de gestación), sacciforme (24-38 semanas de gestación) y alveolar (36 semanas de gestación a 2 años de edad postnatal) (Burri, en Lung Growth and Development, ed. J. McDonald, p. 1-35; Nueva York, Marcel Dekker (1997); Kotecha, Paediatr. Respir. Rev. 1:308-13 (2000); Coalson, Sem. in Neonatology 8:73-81 (2003)). Para lactantes nacidos a las 26 semanas de gestación, las etapas sacciforme y alveolar no están terminadas. Durante la etapa sacciforme, las paredes de los sáculos pulmonares se hacen delgadas, y se forman crestas secundarias en la pared. La expansión tremenda de los posibles espacios de aire respiratorios provoca la formación de sáculos y una disminución notable en la masa de tejido intersticial. El pulmón parece más y más “aereado”, aunque está lleno de fluido que se origina de los pulmones y del fluido amniótico que rodea al feto. Durante la etapa alveolar, la formación alveolar comienza por una extensión y adelgazamiento de las crestas secundarias a medida que maduran en las paredes de los alvéolos. De este modo, la alveologénesis comienza después del nacimiento para la mayoría de los lactantes prematuros.

Aunque los mecanismos que provocan BPD no son completamente conocidos, pruebas indirectas sugieren que BPD resulta de los efectos de citocinas sobre el pulmón en desarrollo (Groneck et al., Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed. 73:F1-3 (1995); Jobe et al., Early Hum. Dev. 53:81-94 (1998); Jobe metal., Curr. Opin. Pediatr. 13:124-129 (2001)). Por ejemplo, se ha observado que las infecciones intrauterinas incrementan los niveles de citocinas en los pulmones de neonatos prematuros, y están asociadas con un mayor riesgo de BPD. Además, la exposición del pulmón prematuro a oxígeno y terapias con ventilador se ha asociado con un incremento en los niveles de citocinas en efluentes pulmonares, y con un mayor riesgo de desarrollar BPD. Además, es posible que haya causas genéticas directas para BPD. Puesto que se piensa que varios genes son críticos para el desarrollo pulmonar terminal (Bourbon et al., Pediatric Research 57:38R-46R (2005)), es posible que las anormalidades en uno o más de ellos podrían inhibir directamente la modulación pulmonar normal y provocar BPD. Además, también es posible que las

anormalidades genéticas puedan incrementar indirectamente la incidencia de BPD, provocando parto prematuro.

Pruebas indirectas limitadas recientes sugieren que TGF-β puede ser una de las numerosas citocinas implicadas en la inhibición del desarrollo pulmonar terminal en BPD. Por ejemplo, se ha identificado TGF-β en las vías respiratorias terminales y efluentes pulmonares de bebés prematuros (Kotecha et al., J. Pediatr. 128:464-469 (1996); Toti et al., Pediatr. Pulmon. 24:22-28 (1997); Lecart et al., Biol. Neonate 77:217-223 (2000); Saito et al., Pediatr. Res. 55:960-965 (2004)), y el nivel de TGF-β1 es el más elevado en bebés prematuros que desarrollaron BPD (Kotecha, 1996) y se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Lecart, 2000). Sin embargo, sigue siendo desconocido si este incremento dado a conocer de los niveles de TGF-β es simplemente una consecuencia de la actividad de otros factores que son principalmente responsables de la enfermedad, o si TGF-β juega un papel más directo en el desarrollo de BPD. Por ejemplo, además de TGF-β, se han identificado hasta ahora aproximadamente 20 genes candidatos que pueden controlar el desarrollo pulmonar terminal. De estos genes, se ha dado a conocer que 13 están modulados en modelos de animales o lactantes con BPD (Bourbon et al., Pediatr. Res. 57:38R-46R (2005)). Usando técnicas de obtención de perfiles de expresión génica, Perkowski y colaboradores dieron a conocer que 385 genes están modulados durante la lesión pulmonar hiperóxica en el ratón adulto (Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 28:682-696 (2003)).

Al menos dos estudios han examinado el efecto de la sobreexpresión ectópica de TGF-β1 en el pulmón en desarrollo. Por ejemplo, Vicencio et al. dieron a conocer que la sobreexpresión de TGF-β1 biológicamente activo en el epitelio pulmonar de ratones neonatos estaba asociada con la inhibición del desarrollo pulmonar terminal (Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 31:650-656 (2004)), y Gauldie et al. dieron a conocer que la infección de pulmones de ratas neonatas con un adenovirus que codifica TGF-β1 afectó a la estructura pulmonar del neonato, incluyendo la producción de áreas moteadas de fibrosis (que no se ven en la nueva BPD). (Am. J. Pathol. 163:2575-2584 (2003)). Sin embargo, no está claro si los cambios observados en este último modelo estaban directamente relacionados con la actividad de TGF-β1, debido a que los pulmones de control expuestos a adenovirus (sin TGF-β) mostraron un marcado edema de las vías respiratorias distales, sugiriendo que el propio vector del adenovirus indujo inflamación. Además, ambos estudios implican expresión ectópica forzada de TGF-β, y por lo tanto no obtienen el modelo de lo que ocurre durante la lesión al pulmón en desarrollo en lactantes prematuros con BPD. De este modo, estos estudios no son de ayuda a la hora de elucidar el papel de TGF-β en BPD.

Al mismo tiempo, otros estudios han sugerido que TGF-β regula sucesos tempranos en el desarrollo pulmonar, incluyendo morfogénesis ramificante (Zhao et al., Am. J. Physiol. 273:L355-362 (1997); Zhao et al., Am. J. Physiol. 21:L412-422 (1999)). Sin embargo, la morfogénesis ramificante del pulmón fetal, que afecta a los números de vías respiratorias proximales conductoras, se termina antes de la etapa sacciforme del desarrollo pulmonar (McMurty, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 282:L341-344 (2002)). De este modo, los defectos en la morfogénesis ramificante están asociados con enfermedades de desarrollo pulmonar temprano, tales como hipoplasia pulmonar y hernia diafragmática congénita, pero no de BPD, una enfermedad de inhibición o interrupción de las fases sacciforme y alveolar del desarrollo pulmonar. Debido a que no se observan anomalías en la morfogénesis ramificante en los pulmones de lactantes con BPD, en los que el número de vías respiratorias proximales conductoras es normal, estos estudios tampoco son de ayuda a la hora de elucidar si TGF-β juega un papel en la patogénesis de BPD.

Finalmente, el efecto de la neutralización de TGF-β sobre el desarrollo pulmonar se ha investigado en ciertos modelos de enfermedades pulmonares pediátricas, pero no en BPD. En estos casos, la actividad de TGF-β se incrementó en el pulmón normal por alteraciones en la unión de TGF-β a la matriz extracelular (Neptune et al., Nat. Genet. 33:407-411 (2003) y Massaro et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 278:L955-60 (2000)) o al suministrar niveles en exceso a pulmones fetales que crecen en cultivo (Zhang et al., E-PASS2006 59:5166.6 (2006)). No se investigó si la neutralización de TGF-β en exceso producido en el pulmón lesionado en desarrollo inhibió el desarrollo de BPD. Debido a diferencias en la etiología, patología y evolución de la enfermedad, estas investigaciones en las que se neutralizó TGF-β no han contribuido a nuestra comprensión del papel de TGF-β en BPD. Véanse, por ejemplo, Neptune et al., Nat. Genet. 33:407-411 (2003) y Massaro et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 278:L955-60 (2000), que dieron a conocer el papel de la señalización anormal de TGF-β en modelos de ratón de la enfermedad de Marfan; y Zhang et al., E-PASS2006 59:5166.6 (2006), que dieron a conocer el papel de TGF-β en ratones hipóxicos que son modelos de cardiopatía congénita o de vasculopatías pulmonares asociadas con la vida en altitudes elevadas.

Finalmente, Warburton et al., Am J Physiol. 276 (Lung Cell. Mol. Physiol. 10): L697-L704, 1999, discutieron la embriología molecular del pulmón: entonces, ahora, y en el futuro, mientras que Sunday et al. (J Clin Invest. 1998; 102(3): 584-594) estudiaron si el péptido similar a bombesina media la lesión pulmonar en un modelo de displasia broncopulmonar de babuino.

En resumen, aunque algunos estudios han sugerido que TGF-β es capaz de afectar al desarrollo pulmonar terminal, otros han sugerido que TGF-β juega un papel en una etapa mucho más temprana, durante la morfogénesis ramificante, y ningún estudio ha abordado nunca directamente si TGF-β juega un papel etiológico en la modulación del desarrollo pulmonar terminal en el pulmón lesionado de un lactante prematuro con riesgo de desarrollar BPD, o

si la neutralización de TGF-β tendría algún impacto sobre la evolución de la enfermedad en tales lactantes.

BPD es una causa extremadamente importante de morbimortalidad de lactantes. Detrás del asma, BPD es la enfermedad más costosa de los pacientes pediátricos. La disponibilidad de la terapia de tensioactivos y otros avances en el tratamiento han mejorado la supervivencia neonatal sin reducción asociada en las tasas de BPD. Por lo tanto, existe una necesidad importante de métodos mejorados para tratar lactantes prematuros con riesgo de desarrollar BPD.

Sumario

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento y demostración de que la administración de un anticuerpo anti-TGF-β durante el período perinatal protege al pulmón lesionado en desarrollo frente a la inhibición de alveologénesis y vasculogénesis en un modelo de ratón hiperóxico de displasia broncopulmonar. La presente descripción proporciona métodos para tratar lactantes que están en riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar (BPD), incluyendo lactantes prematuros.

La presente descripción proporciona métodos para tratar un lactante administrando un antagonista de TGF-β durante el período perinatal, incluyendo el período prenatal y/o el período postnatal. Para la administración durante el período prenatal, el antagonista de TGF-β se puede administrar directamente al lactante en el útero, o indirectamente mediante administración a la madre.

En un caso, los métodos de la presente descripción implican tratar lactantes prematuros con riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar, en los que la edad del lactante es alrededor de 24 semanas de gestación a alrededor de 6 meses después del nacimiento. En un caso, el lactante a tratar es un lactante prematuro nacido a alrededor de 32 semanas de gestación o más joven. En un caso, el lactante a tratar es un lactante prematuro nacido a alrededor de 28 semanas de gestación o más joven. En un caso, el peso del lactante en el momento del nacimiento es alrededor de 1500 gramos o menos. En otro caso, el peso del lactante en el momento del nacimiento es alrededor de 1000 gramos o menos.

En otro caso, los métodos de la presente descripción implican tratar neonatos nacidos prematuramente y lactantes con lesión pulmonar y displasia broncopulmonar, en el que la edad del lactante es alrededor de 6 meses después del nacimiento, con agentes neutralizantes de TGF-β para disminuir la gravedad de la enfermedad.

En algunos casos, el antagonista de TGF-β es un antagonista directo de TGF-β, tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF-β, o un anticuerpo anti-receptor de TGF-β, o un receptor de TGF-β soluble. En casos específicos, el antagonista de TGF-β es una forma humana o humanizada del anticuerpo anti-TGF-β 1D11. En casos no limitantes, el anticuerpo de TGF-β es un antagonista pan-específico humano, tal como PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, como se describe en la solicitud PCT WO 06/086469.

El antagonista de TGF-β se puede administrar sistémicamente, incluyendo intramuscularmente, intravenosamente, o subcutáneamente. El antagonista de TGF-β también se puede administrar directamente al pulmón en una forma en aerosol, incluyendo vía un inhalador o un nebulizador, como gotitas o en forma de polvo, o con portadores tensioactivos.

En algunos casos, el antagonista de TGF-β se puede usar para fabricar un medicamento para tratar displasia broncopulmonar. Además, en algunos casos, el medicamento puede incluir un antagonista de TGF-β y otro agente terapéutico, incluyendo, por ejemplo, un esteroide, vitamina A, una formulación nutricional rica en calorías, un diurético, y/o un broncodilatador.

En otros casos, el antagonista de TGF-β puede incrementar la alveologénesis en los pulmones en desarrollo de un lactante. En algunos casos, la alveologénesis y/o vasculogénesis incrementadas puede ser en los pulmones periféricos. En algunos casos, el antagonista de TGF-β se puede administrar para disminuir la longitud media de la cuerda de los pulmones de lactantes en al menos alrededor de 10%, en al menos alrededor de 20%, en al menos alrededor de 30%, o al menos alrededor de 40%. En otros casos, el antagonista de TGF-β se puede administrar para disminuir la densidad del volumen alveolar en al menos alrededor de 20%, en al menos alrededor de 30%, en al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, o al menos alrededor de 60%. Además, en un caso, el antagonista de TGF-β se puede administrar para incrementar la densidad del tabique secundario en al menos alrededor de 20%, en al menos alrededor de 30%, en al menos alrededor de 40%, o al menos alrededor de 50%.

En algunos casos, el antagonista de TGF-β se puede administrar para producir una estructura pulmonar más normal. Por ejemplo, en un caso, el antagonista de TGF-β se puede administrar para disminuir la densidad del volumen de elastina. Además, en otros casos, el antagonista de TGF-β se puede administrar para incrementar la vasculogénesis en pulmones en desarrollo de un lactante. Por ejemplo, en un caso, el antagonista de TGF-β se puede administrar para incrementar la expresión de elastina y/o αSMA en tejido de pulmones periféricos.

En otro caso, el antagonista de TGF-β se puede administrar para tratar o prevenir lesión debido a suplementación de

oxígeno. Por ejemplo, en un caso, el antagonista de TGF-β se puede administrar antes, o conjuntamente con, suplementación de oxígeno para prevenir o tratar el desarrollo pulmonar anormal debido a exposición crónica a oxígeno y/o sobreinflado pulmonar. En un caso, el antagonista de TGF-β se puede administrar en el útero o poco después del nacimiento del lactante, y la terapia de oxígeno se puede administrar después del nacimiento. Además, en otro caso, el antagonista de TGF-β se puede administrar para alentar el crecimiento normal del lactante después del nacimiento.

En base a la descripción contenida aquí, la presente invención proporciona un receptor de TGF-β soluble o un anticuerpo anti-receptor de TGF-β, que es un antagonista de TGF-β, para uso en el tratamiento de displasia broncopulmonar incrementando la alveologénesis y/o vasculogénesis pulmonar en un lactante.

La presente invención proporciona además un receptor de TGF-β soluble o un anticuerpo anti-receptor de TGF-β, que es un antagonista de TGF-β, para uso en el tratamiento de la inhibición de alveologénesis y/o vasculogénesis que está asociada con una lesión pulmonar en un lactante, en el que el tratamiento comprende administrar el receptor de TGF-β soluble o el anticuerpo anti-receptor de TGF-βal lactante y proporcionar suplementación de oxígeno al lactante después del nacimiento.

La presente invención todavía proporciona además el uso de un receptor de TGF-β soluble o un anticuerpo anti-receptor de TGF-β, en la fabricación de un medicamento para tratar displasia broncopulmonar incrementando alveologénesis y/o vasculogénesis pulmonar en un lactante.

Otras realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones anejas.

Descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1D son fotomicrografías, que muestran que isoformas de TGF-β se expresan en el pulmón en desarrollo de cría de ratón. Se detectó inmunorreactividad a TGF-β diferencial (tinción oscura) en el epitelio bronquial (Figura 1A; flecha), bronquiolos terminales y respiratorios (Figura 1B; TB y RB, respectivamente), y en las vías respiratorias terminales (Figura 1C y Figura 1D) de pulmones de crías de ratón de 10 días. Además, parece que hay inmunorreactividad a TGF-β1 más abundante en las paredes de la vía respiratoria terminal en comparación con TGF-β2 y TGF-β3. Todos los paneles se contratiñeron con hematoxilina. Barra de escala negra: 50 μm; barra de escala blanca: 100 μm; barra de escala sombreada con líneas cruzadas: 30 μm.

Las Figuras 2A-2F son fotomicrografías, que muestran que un anticuerpo neutralizante de TGF-β detecta expresión de TGF-β en el pulmón de crías de ratón de 10 días. En las Figuras 2A-2C, se detectó inmunorreactividad a TGF-β (tinción oscura) en pulmones de crías de ratón de 10 días usando 1D11, un anticuerpo monoclonal anti-TGF-β pan-específico. En las Figuras 2D-2F, los pulmones se incubaron con suero no inmune en lugar de 1 D11. Como se muestra en la Figura 2A, se identificó inmunorreactividad a TGF-β en las células en las paredes de grandes vías respiratorias (*) y vasos (**) y en la matriz extracelular (flecha). También se identificó inmunorreactividad a TGF-β en las vías respiratorias distales del pulmón de cría (Figuras 2B y 2C). Todos los paneles se contratiñeron con hematoxilina. Barras de escala en negro: 20 μm; barras de escala blancas: 50 μm.

Las Figuras 3A-3D son fotomicrografías, que muestran que el tratamiento con anticuerpos anti-TGF-β disminuye la señalización de TGF-β en el pulmón lesionado de neonato. SE usó inmunohistoquímica para detectar p-Smad2 (tinción oscura) en los pulmones de crías de 10 días tratadas con: PBS y aire (Figura 3A), PBS y 85% de O_2 (Figura 3B), 1 D11 y aire (Figura 3C), y 1 D11 y 85% O_2 (Figura 3D). En comparación con pulmones expuestos a aire, los tratados con PBS y expuestos a 85% de O_2 durante 10 días tuvieron p-Smad2 más abundantes detectadas en los núcleos de células de las vías respiratorias distales (las flechas indican inmunorreactividad a p-Smad2 nuclear representativa). Por el contrario, los pulmones expuestos a O_2 tratados con 1D11 tuvieron un menor número de núcleos con reactividad de p-Smad2 que aquellos tratados con PBS y expuestos a O_2. Los pulmones expuestos a O_2 tratados con 1 D11 también tuvieron un número similar de núcleos teñidos con p-Smad2 a los pulmones tratados con PBS y 1 D11 y expuestos a aire. Todos los paneles se contratiñeron con hematoxilina. Barra de escala: 50 μm.

Las Figuras 4A-4D son fotomicrografías, que muestran que la exposición al anticuerpo anti-TGF-β estaba asociada con desarrollo mejorado de las vías respiratorias distales en el pulmón lesionado de neonato. Se usó azul de toluidina para teñir secciones de pulmones de crías de 10 días tratadas con: PBS y aire (Figura 4A), PBS y 85% de O_2 (Figura 4B), 1D11 y aire (Figura 4C), y 1 D11 y 85% O_2 (Figura 4D). El tratamiento con PBS y exposición a 85% de O_2 estaba asociado con mayor área de espacio de aire distal y menores números de tabiques secundarios (flechas) en comparación con pulmones de crías expuestas a aire. El tratamiento con 1 D11 mejoró el desarrollo de las vías respiratorias distales en pulmones de crías expuestas a O_2; parece que hay una formación más alveolar en estos pulmones. Barras de escala: 200 μm.

Las Figuras 5A-5C son representaciones gráficas de experimentos, que muestran que, en el pulmón

lesionado, el tratamiento con anticuerpo anti-TGF-β mejoró índices cuantitativos objetivos del desarrollo alveolar. En el pulmón de ratón tratado con PBS, la exposición crónica a 85% de oxígeno estaba asociada en el pulmón periférico con un incremento en la longitud media de la cuerda (Lm) (Figura 5A) y la densidad del volumen del espacio aéreo (%AVD) (Figura 5B), que son inversamente proporcionales a desarrollo de pulmón periférico y al área superficial de las vías respiratorias, y con una disminución de la densidad del tabique secundario en el pulmón en desarrollo (Figura 5C). El tratamiento con 1D11 inhibió el incremento anormal de Lm y %AVD, y mejoró la densidad de tabiques secundarios en pulmones crónicamente expuestos a niveles elevados de O_2. N = 12 cada grupo; * P < 0,05.

Las Figuras 6A-6C son fotomicrografías, que muestran que la expresión de elastina se mejoró en el pulmón lesionado de neonato tratado con anticuerpos anti-TGF-β. Se muestra la tinción de elastina de Miller (negra) de los pulmones periféricos de crías de ratón de 10 días para animales tratados con: PBS y aire (Figura 6A), PBS y 85% de O_2 (Figura 6B), y 1D11 y 85% O_2 (Figura 6C). La elastina se expresó en la periferia de pulmones de crías de control, en los que se observaron niveles elevados en las puntas de tabiques secundarios (flechas). La exposición crónica a un nivel elevado de O_2 estaba asociada con una disminución en la localización de elastina en los tabiques, y a un incremento de su asociación con la pared de los sáculos (punta de flecha; Figura 6B). El tratamiento con anticuerpos anti-TGF-β estaba asociado con deposición mejorada de elastina en las puntas de tabiques alveolares. Barra de escala en negro: 100 μm; barra de escala en blanco: 20 μm.

La Figura 7A es una fotomicrografía y la Figura 7B es una representación gráfica de experimentos que demuestran que el tratamiento del pulmón lesionado en desarrollo con anticuerpo anti-TGF-β mejoró el % de densidad de volumen de elastina en el parénquima de pulmón periférico (%EVD), que es un índice cuantitativo objetivo de desarrollo de la matriz extracelular. En el pulmón de ratón tratado con PBS, la exposición crónica a 85% de oxígeno estaba asociada con deposición anormal de elastina, como se refleja por un incremento en %EVD. El tratamiento con 1 D11 inhibió el incremento anormal en el %EVD, mejorando la organización de elastina en el pulmón periférico. N = 4 cada grupo. *P < 0,05.

Las Figuras 8A-8C son fotomicrografías, que muestran que se produce una notable mejora en el patrón de células endoteliales microvasculares pulmonares en pulmones lesionados tratados con anticuerpos anti-TGF-β. Se muestra la tinción con lectina de *Griffonia simplicifolia* de α-D-galactósidos de células endoteliales en los pulmones periféricos de pulmones de crías de ratón de 10 días para animales tratados con: PBS y aire (Figura 8A), PBS y 85% de O_2 (Figura 8B), y 1 D11 y 85% O_2 (Figura 8C). Las paredes de los tabiques de pulmones de cría expuestos a 85% de O_2 eran más gruesas y tuvieron un patrón tortuoso de tinción de células endoteliales. Por el contrario, los pulmones tratados con 1 D11 y niveles elevados de oxígeno tuvieron un patrón más organizado de células endoteliales. Todos los paneles se contratiñeron con hematoxilina. Barra de escala en negro: 10 μm; barra de escala en blanco: 20 μm.

Las Figuras 9A-9B son representaciones gráficas de experimentos, que muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-TGF-β mejoró los índices cuantitativos objetivos del desarrollo microvascular pulmonar en el pulmón lesionado. El % de densidad de volumen fluorescente (%FVD) (Figura 9A) de células endoteliales y SMC (Figura 9B) en el pulmón periférico se examinó usando pulmones de crías que se hicieron reaccionar con lectina y un anticuerpo αSMA, respectivamente. La lesión del pulmón en desarrollo estaba asociada con un incremento en lectina y una disminución en %FVD de αSMA. Por el contrario, la exposición a anticuerpos neutralizantes de TGF-β mejoró la densidad de volumen de estos marcadores de células microvasculares pulmonares. N = 7 cada grupo; *, P < 0,05.

Las Figuras 10A-10C muestran normalización de las células de miofibroblastos microvasculares pulmonares en el pulmón lesionado de neonato tratado con anticuerpos anti-TGF-β. Se muestra la inmunorreactividad a αSMA (tinción oscura) en células de los pulmones periféricos de pulmones de crías de ratón de 10 días tratados con: PBS y aire (Figura 10A), PBS y 85% de O_2 (Figura 10B), y 1 D11 y 85% O_2 (Figura 10C). En comparación con pulmones de crías de ratón que respiraron aire, los expuestos a niveles elevados de O_2 tienen menos inmunorreactividad a αSMA en la periferia del pulmón. Los pulmones de crías tratadas con 1 D11 y niveles elevados de oxígeno parecen tener más inmunorreactividad a αSMA en las paredes de las vías respiratorias distales. Todos los paneles se contratiñeron con azul de toluidina. Barra de escala en negro: 100 μm; barra de escala en blanco: 20 μm.

Descripción detallada

La presente descripción proporciona métodos para tratar lactantes, incluyendo lactantes prematuros con riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar (BPD), o ya han desarrollado BPD, en al menos un punto durante el período perinatal, incluyendo el período prenatal y el período postnatal, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGF-β al lactante en el período perinatal, incluyendo el período prenatal y el período postnatal. Como se usa aquí, el término “lactante” incluye seres humanos a aproximadamente 24 semanas de gestación, ya sea en el útero o después del nacimiento, hasta alrededor de 6 meses después del nacimiento.

Displasia broncopulmonar

El diagnóstico clínico de BPD se realiza en cualquier lactante nacido prematuramente que, a las 36 semanas de gestación, tiene enfermedad pulmonar que requiere oxígeno suplementario continuo o continuo de vez en cuando y que ha tenido una radiografía anormal de tórax. Como se usa aquí, “BPD” también incluye todas las definiciones de diagnóstico clínico alternativas, tales como un diagnóstico en lactantes mayores de cuatro semanas desde el nacimiento que han tenido enfermedad pulmonar persistente que requiere oxígeno suplementario continuo de vez en cuando y que han tenido radiografías anormales del tórax. BPD también se denomina algunas veces en la bibliografía y por cuidadores pediátricos como “neumopatía crónica” (Jobe et al., Early Hum. Devel. 53:81-94 (1998)).

Debido a que BPD no se diagnostica clínicamente en lactantes nacidos prematuramente hasta cierto tiempo después del nacimiento, por ejemplo 36 semanas de gestación, las terapias para tratar lactantes en riesgo se administran típicamente antes de que se diagnostique formalmente la enfermedad. En algunos métodos, se usan terapias para tratar lactantes que han sido diagnosticados con BPD para disminuir la gravedad de la enfermedad. Según los métodos de la presente descripción, se usan antagonistas de TGF-β para tratar lactantes durante el período perinatal. Como se usa aquí, el “período perinatal” en seres humanos para tratamiento usando los métodos de la presente descripción incluye tanto el período prenatal (es decir, antes del nacimiento) así como el período postnatal (es decir, después del nacimiento), y comienza desde alrededor de 24 semanas de gestación y continúa hasta alrededor de 6 meses después del nacimiento. Para la administración durante el período prenatal, el antagonista de TGF-β se puede administrar directamente al feto en el útero, o indirectamente mediante administración a la madre.

En ciertos métodos de la presente descripción, el antagonista de TGF-β se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar un lactante en riesgo de desarrollar BPD, y reducir, minimizar o prevenir de ese modo el desarrollo de BPD en el lactante. Como se usa aquí, el término “tratar” se usa para querer decir actuar sobre para reducir, minimizar o prevenir las secuelas pulmonares y signos y síntomas clínicos que están asociados con BPD. Los lactantes que se pueden tratar con los métodos de la invención incluyen cualesquiera lactantes en riesgo de desarrollar BPD. Los lactantes en riesgo de desarrollar BPD incluyen lactantes prematuros, lactantes en riesgo de parto prematuro, y cualesquiera otros lactantes en riesgo de desarrollar BPD por otras razones.

La edad de los lactantes a tratar con los métodos de la presente descripción son desde alrededor de 24 semanas de gestación hasta alrededor de 6 meses después del nacimiento. El número de semanas de gestación (es decir, edad gestacional) se puede determinar usando cualquiera de un número de métodos convencionales. Por ejemplo, la edad gestacional se puede calcular desde el primer día de la última menstruación.

En una realización, el lactante es un lactante prematuro. Como se usa aquí, un lactante prematuro es cualquier lactante nacido antes de 37 semanas de gestación; la expresión “parto antes de término” o “parto prematuro” se refiere a cualquier parto que se produce antes de 37 semanas de gestación. De este modo, en una realización, el lactante en riesgo a tratar es un lactante prematuro (nacido antes de 37 semanas de gestación) cuya edad es al menos 24 semanas de gestación.

Casi dos tercios de lactantes que adquieren BPD pesan menos de 1.000 gramos y tienen menos de 28 semanas de gestación en el momento de nacer. En consecuencia, en una realización, los lactantes a tratar con los antagonistas de TGF-β se pueden identificar por su peso y/o edad en el momento de nacer. En una realización, el lactante a tratar es un lactante prematuro nacido a alrededor de 32 semanas de gestación o más joven. En una realización, el lactante a tratar es un lactante prematuro nacido a alrededor de 28 semanas de gestación o más joven. En una realización, el lactante a tratar pesa alrededor de 1500 gramos o menos en el momento de nacer. En otra realización, el lactante pesa alrededor de 1000 gramos o menos en el momento de nacer.

Los lactantes en riesgo de desarrollar BPD también incluyen lactantes todavía por nacer (es decir, fetos) en riesgo de parto prematuro (y por lo tanto en riesgo de BPD). Tales lactantes se tratan durante el período prenatal, ya sea mediante administración a la madre o administración directa al feto en el útero. Cualquier mujer embarazada a alrededor de 23 o más semanas de gestación con membranas clínicamente intactas y que tenga uno o más factores de riesgo para el parto antes de término o marcadores del parto antes de término puede ser un candidato para el tratamiento.

Se sabe que un gran número de factores están asociados con el riesgo de parto antes de término. Estos factores incluyen, pero no se limitan a, gestaciones de múltiples fetos; cuello uterino incompetente, anomalías uterinas; polihidramnios, nuliparidad; ruptura previa antes de término de membranas o alumbramiento antes de término; preeclampsia; hemorragia vaginal asociada con placenta previa; poco cuidado o ningún cuidado antenatal; y síntomas tales como dolor abdominal, lumbalgia, paso de moco cervical y contracciones.

Además de estos factores de riesgo, se ha identificado un número de marcadores del parto antes de término. Como se usa aquí, un marcador del parto antes de término es un marcador que, cuando está presente en o más allá de un nivel umbral, indica un mayor riesgo de parto antes de término. Los ejemplos de marcadores del parto antes de término incluyen, pero no se limitan a, antígenos restringidos fetales tales como fibronectina fetal y estradiol

(Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 2004/0266025), proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (un marcador para la probabilidad de ruptura de la membrana); véase la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 2004/0053838), y MMP-8 y MMP-9 (Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 2004/0029176). Los métodos para detectar el nivel de marcadores del parto antes de término son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 2004/0266025.

Aunque BPD se observa mayoritariamente entre bebés prematuros, también puede ocurrir en bebés de término completo que tienen problemas respiratorios durante los primeros días de vida. En consecuencia, los métodos de la presente descripción se pueden usar igualmente para tratar estos lactantes.

Antagonistas de TGF-β

TGF-β es un dímero enlazado por disulfuro que se sintetiza como una preproproteína de alrededor de 400 aminoácidos (aa) que se escinde antes de la secreción para producir TGF-β maduro. El fragmento de escisión N-terminal, conocido como el "péptido asociado a latencia" (LAP), puede permanecer unido no covalentemente al dímero, inactivando de ese modo TGF-β. TGF-β, aislado in vivo, se encuentra predominantemente en esta forma inactiva, "latente", es decir, asociada con LAP. El complejo de TGF-β latente se puede activar de varias maneras, por ejemplo mediante la unión a un receptor de la superficie celular denominado el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes/factor II de crecimiento similar a la insulina. La unión se produce a través de restos de manosa-6-fosfato unidos a sitios de glicosilación en LAP. Al unirse al receptor, se libera TGF-β en su forma madura. TGF-β activo, maduro, es libre entonces de unirse a su receptor y ejercer sus funciones biológicas. El dominio de unión a TGF-β principal en el receptor de TGF-β tipo II se ha cartografiado a una secuencia de 19 aminoácidos (Demetriou et al., J. Biol. Chem. 271:12755 (1996)).

El término "TGF-β", como se usa aquí, se refiere a una cualquiera o más isoformas de TGF-β de mamífero. Igualmente, la expresión "receptor de TGF-β", excepto que se indique de otro modo, se refiere a cualquier receptor que se une a al menos una isoforma de TGF-β de mamífero. Actualmente, hay cinco isoformas conocidas de TGF-β (TGF-β1 a TGF-β5), todas las cuales son homólogas entre sí (60-80% de identidad), forman homodímeros de alrededor de 25 kDa, y actúan sobre receptores de TGF-β comunes (TβR-I, TβR-II, Tβ R-IIB, y TβR-III). TGF-β1, TGF-β2, y TGF-β3 se encuentran en las mamas. Los aspectos estructurales y funcionales de TGF-β, así como receptores de TGF-β, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Cytokine Reference, eds. Oppenheim et al., Academic Press, San Diego, CA, 2001). TGF-β está notablemente conservado entre especies. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de TGF-β1s maduros de rata y de ser humano son casi idénticas. De este modo, se espera que los antagonistas de TGF-β tengan una reactividad cruzada entre especies elevada.

La expresión "antagonista de TGF-β" y sus cognados tales como "inhibidor", "neutralizante", y "reductor" se refieren a un compuesto (o su propiedad, según sea apropiado), u otra molécula, que actúa como un antagonista de la actividad biológica de TGF-β. Un antagonista de TGF-β, por ejemplo, se puede unir a y neutralizar la actividad de TGF-β; disminuir los niveles de expresión de TGF-β; afectar a la estabilidad o conversión de la molécula precursora a la forma madura activa; interferir con la unión de TGF-β a uno o más receptores; o puede interferir con la señalización intracelular de un receptor de TGF-β. La expresión "antagonista directo de TGF-β" se refiere generalmente a cualquier compuesto que disminuya directamente la actividad biológica de TGF-β. Una molécula "disminuye directamente" la actividad biológica de TGF-β si disminuye la actividad al interactuar con un gen de TGF-β, un transcrito de TGF-β, un ligando de TGF-β, o un receptor de TGF-β.

Los métodos para evaluar la actividad biológica de TGF-β, incluyendo la actividad neutralizante de antagonistas de TGF-β, son conocidos en la técnica. Ejemplos de algunos de los bioensayos in vitro más frecuentemente usados incluyen los siguientes:

(1) inducción de formación de colonias de células NRK en agar blando en presencia de EGF (Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5339-5343 (1981));

(2) inducción de diferenciación de células mesenquimatosas primitivas para expresar un fenotipo cartilaginoso (Seyedin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2267-2271 (1985));

(3) inhibición del crecimiento de células epiteliales de pulmón de visón Mv1 Lu (Danielpour et al. (1989) J. Cell. Physiol., 138:79-86) y células de riñón de mono BBC-1 (Holley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5989-5992 (1980));

(4) inhibición de la mitogénesis de timocitos de ratón C3H/HeJ (Wrann et al. (1987) EMBO J., 6:1633-1636);

(5) inhibición de la diferenciación de células de mioblastos L6 de rata (Florini et al., J. Biol. Chem. 261:16509-16513 (1986));

(6) medida de la producción de fibronectina (Wrana et al., Cell 71:1003-1014 (1992));

(7) inducción del promotor del inhibidor 1 activador de plasminógeno (PAI-1) fusionado a un gen informador de luciferasa (Abe et al. (1994) Anal. Biochem., 216:276-284);

(8) medida de los niveles de PAI-1 en tejido pulmonar o el suero o plasma;

(9) ensayo inmunosorbente ligado a enzima de tipo sándwich (Danielpour et al., Growth Factors 2:61-71 (1989)); y

(10) ensayos celulares descritos en Singh et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 13(24):4355-4359 (2003)).

Los ejemplos de métodos que se pueden usar para evaluar la actividad de TGF-β in vivo incluyen la evaluación de fosforilación y/o localización nuclear de SMAD2.

Los ejemplos de antagonistas de TGF-β que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra una o más isoformas de TGF-β (patente U.S. nº 5.571.714; documentos WO 97/13844; y WO 00/66631; WO 05/097832; WO 05/101149; WO 06/086469); receptores de TGF-β dominantes negativos y solubles o anticuerpos dirigidos contra receptores de TGF-β (Flavell et al., Nat. Rev. Immunol. 2:46-53 (2002); patente U.S. nº 5.693.607; patente U.S. nº 6.001.969; patente U.S. nº 6.008.011; patente U.S. nº 6.010.872; documentos WO 92/00330; WO 93/09228; WO 95/10610; y WO 98/48024; LAP (documento WO 91/08291); TGF-β asociado a LAP (documento WO 94/0981.2); glicoproteínas/proteoglicanos de unión a TGF-β tales como fetuína (patente U.S. nº 5.821.227); decorina, betaglicano, fibromodulina, lumicano, y endoglina (patente U.S. nº 5.583.103; patente U.S. nº 5.654.270; patente U.S. nº 5.705.609; patente U.S. nº 5.726.149; patente U.S. nº 5.824.655; patente U.S. nº 5.830.847; patente U.S. nº 6.015.693; documentos WO 91/04748; WO 91/10727; WO 93/09800; y WO 94/10187); manosa-6-fosfato o manosa-1-fosfato (patente U.S. nº 5.520.926); prolactina (documento WO 97/40848); factor II de crecimiento similar a la insulina (documento WO 98/17304); extractos de plantas, hongos y bacterias (documentos EU 813875; JP 8119984; y patente U.S. nº 5.693.610); oligonucleótidos antisentido (patente U.S. nº 5.683.988; patente U.S. nº 5.772.995; patente U.S. nº 5.821.234; patente U.S. nº 5.869.462; y WO 94/25588); y cualesquiera mutantes, fragmentos, o derivados de las moléculas identificadas anteriormente que retienen la capacidad para inhibir la actividad biológica de TGF-β. Numerosos antagonistas de TGF-β de tipo pequeña molécula que pueden ser útiles también son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos en los documentos WO 02/62753; WO 02/62776; WO 02/62787; WO 02/62793; WO 02/62794; WO 02/66462; WO 02/94833; WO 03/87304; WO 03/97615; WO 03/97639; WO 04/10929; WO 04/21989; WO 04/22054; WO 04/24159; WO 04/26302; WO 04/26871; patente U.S. nº 6.184.226; WO 04/16606; WO 04/47818; WO 04/48381; WO 04/48382; WO 04/48930; WO 04/50659; WO 04/56352; WO 04/72033; WO 04/87056 WO 05/10049; WO 05/032481; WO 05/065691; WO 05/92894; WO 06/026305; WO 06/026306; y WO 06/052568.

En algunos casos, el antagonista de TGF-β es un antagonista directo de TGF-β, por ejemplo un anticuerpo que bloquea la unión de TGF-β a su receptor.

El término “anticuerpo”, como se usa aquí, se refiere a una inmunoglobulina o una parte de la misma, y engloba cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno independientemente de la fuente, método de producción, y otras características. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, humanizados, humanos, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, e injertados con CDR. La expresión “dominio de unión a antígeno” se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a o es complementaria a una parte de o a todo un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo se puede unir solamente a una parte particular del antígeno. El “epítopo” o “determinante antigénico” es una porción de una molécula de antígeno que es responsable de interacciones específicas con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un dominio de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera del anticuerpo (V_L) y una región variable de cadena pesada del anticuerpo (V_H). Un dominio de unión a antígeno se puede proporcionar mediante uno o más dominios variables del anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fd que consiste en un dominio V_H, un fragmento de anticuerpo Fv que consiste en un dominio V_H y un dominio V_L, o un fragmento de anticuerpo scFv que consiste en un dominio V_H y un dominio V_L unidos mediante un ligador). La expresión “anticuerpo anti-TGF-β”, o “anticuerpo contra al menos una isoforma de TGF-β”, se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítopo de TGF-β. Las expresiones “anticuerpo contra el receptor de TGF-β” y “anticuerpo contra un receptor de TGF-β” se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítopo de un receptor de TGF-β (por ejemplo, tipo I, tipo II, o tipo III).

Los anticuerpos útiles en los métodos de la presente descripción se unen específicamente a al menos una isoforma de TGF-β o al dominio extracelular de al menos un receptor de TGF-β. Las expresiones “interacción específica”, o “se une específicamente”, o sus cognados, como se usan aquí, significan que dos moléculas forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una afinidad elevada y una capacidad baja a moderada. La unión no específica tiene habitualmente una baja afinidad con una capacidad moderada a elevada. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K_a es mayor que 10^6 M^{-1}, o preferiblemente mayor que 10^8 M^{-1}.

En algunas otros casos, el anticuerpo anti-TGF-β se une específicamente a al menos una isoforma de TGF-β seleccionada del grupo que consiste en TGF-β1, TGF-β2, y TGF-β3. En todavía otros casos, el anticuerpo anti-TGF-β se une específicamente a al menos: (a) TGF-β1, TGF-β2, y TGF-β3 ("anticuerpo pan-neutralizante"); (b) TGF-β1 y TGF-β2; (c) TGF-β1 y TGF-β3; o (d) TGF-β2 y TGF-β3. En diversos casos, la constante de afinidad K_a del anticuerpo anti-TGF-β para al menos una isoforma de TGF-β, a la que se une específicamente, es preferiblemente mayor que 10^6 M^{-1}, 10^7 M^{-1}, 10^8 M^{-1}, 10^9 M^{-1}, 10^{10} M^{-1}, 10^{11} M^{-1}, o 10^{12} M^{-1}. También se contemplan para uso en seres humanos las formas y derivados humanizados y completamente humanos de anticuerpos no humanos que neutralizan una o más isoformas de TGF-β de mamífero. La producción de tales anticuerpos está dentro de la pericia normal de un experto (véase, por ejemplo, Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 2ª ed., Oxford University Press (1995)). En casos ilustrativos no limitantes, el anticuerpo anti-TGF-β es el anticuerpo monoclonal murino 1D11 producido por el hibridoma 1D11.16 (depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, 20110, United States of America, número de designación de depósito ATCC HB 9849, así descrito en las patentes U.S. nos 5.571.714; 5.772.998; y 5.783.185). La secuencia de la región variable de cadena pesada de 1D11 está disponible bajo el número de acceso AAB46787. De este modo, en casos relacionados, el anticuerpo anti-TGF-β es un derivado de 1D11, por ejemplo un anticuerpo que comprende secuencias de CDR idénticas a las CDRs de cadena pesada en AAB46787, tal como un anticuerpo humanizado. En casos adicionales, el anticuerpo anti-TGF-β es un anticuerpo humano aislado de una librería de presentación de fagos que usa selección guiada a partir de 1D11.

En casos no limitantes, el anticuerpo anti-TGF-β es un anticuerpo pan-específico humano tal como PET1073G12, PET1074B9, o PET1287A10, como se describe en la solicitud PCT WO 06/086469.

Métodos de administración

Usando las enseñanzas proporcionadas aquí y la abundancia de información en la técnica con respecto a las características, incluyendo potencias y afinidades, de diversos antagonistas de TGF-β, un médico experto puede determinar fácilmente las dosis exactas y regímenes para cualquier antagonista de TGF-β dado. Por ejemplo, cuando el antagonista de TGF-β es un anticuerpo, se puede administrar a una dosis seleccionada para proporcionar la misma potencia neutralizante que el anticuerpo 1D11 a una dosis de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. De forma similar, una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-receptor de TGF-β, un receptor de TGF-β soluble, u otro antagonista de TGF-β se puede seleccionar en un intervalo que daría potencias neutralizantes comparables. En general, se pueden administrar mayores dosis a la madre para lograr dosificaciones eficaces del antagonista de TGF-β en el feto; se pueden administrar menores dosis del antagonista de TGF-β para el suministro directo a los pulmones del feto o lactante.

La "administración" no está limitada a ninguna formulación, sistema de suministro, o ruta particular, y puede incluir, por ejemplo, parenteral (incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intramedular, intraarticular, intramuscular, o intraperitoneal), rectal, tópica, transdérmica, u oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones, o comprimidos). La administración a un individuo puede ocurrir en una única dosis, dosis de bolo, o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una variedad de composiciones farmacéuticas que contengan formas de sales fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica. Las formas de sales fisiológicamente aceptables y las técnicas de formulación farmacéutica estándar y excipientes son conocidas (véanse, por ejemplo, Physicians' Desk Reference® 2003, 57ª ed., Medical Economics Company, 2002; y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, eds. Gennado et al., 20ª ed, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000).

En una realización, la administración de composiciones que comprenden un antagonista de TGF-β puede ser vía una ruta pulmonar, incluyendo en forma de un inhalante como un aerosol en polvo o líquido. Las formulaciones aerosolizadas pueden ser gotitas o partículas de polvo menores que 10 μm de diámetro. Por ejemplo, el antagonista se puede solubilizar en una emulsión hidrófoba/hidrófila micronizada. Tales inhalantes se pueden administrar mediante nebulizador, inhalador, rutas intratraqueales, rutas intraorales o intranasales. Los aerosoles para el suministro de agentes terapéuticos al aparato respiratorio, incluyendo partículas aerodinámicamente ligeras, se describen en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 2005/0244341.

La administración de un antagonista a un lactante también puede ir acompañada de medios de terapia génica, en la que una secuencia de ácido nucleico que codifica el antagonista se administra al paciente in vivo o a células in vitro, que entonces se introducen en un paciente, y el antagonista (por ejemplo, ARN antisentido, ARNnp, receptor de TGF-β soluble) se expresa a partir de una secuencia apropiada de un vector de ácido nucleico. Se describen métodos para el suministro mediante terapia génica de antagonistas de TGF-β (véanse, por ejemplo, Fakhrai et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 93:2909-2914 (1996)) y U.S. 5.824.655. La administración de un antagonista de TGF-β se efectúa mediante transferencia génica usando un vector que comprende ADNc que codifica el antagonista, por ejemplo ADNc que codifica el dominio extracelular del receptor de TGF-β tipo II (rsTGFBIIR) o tipo III (rsTGFBIIIR), como se describe, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 2003/0180301.

El antagonista de TGF-β se puede administrar al lactante en combinación con cualesquiera otros agentes o terapias que se usan actualmente o que se usarán para tratar lactantes prematuros en riesgo de o diagnosticados con BPD.

Un estado pobre de vitamina A durante el primer mes de vida incrementa significativamente el riesgo de desarrollar BPD. Los estudios también han encontrado que la dexametasona puede incrementar los niveles plasmáticos de vitamina A; lo que puede ayudar a desenganchar a los lactantes de la terapia de oxígeno, previniendo de ese modo BPD.

Las medicaciones broncodilatadoras se usan a menudo para abrir las vías respiratorias de los pulmones relajando los músculos alrededor de las vías respiratorias. Las medicaciones antiinflamatorias se usan para reducir el hinchamiento de las vías respiratorias en bebés más gravemente enfermos, cuyas sibilancias y disneas son difíciles de controlar ocasionalmente con broncodilatadores solamente. En consecuencia, los tratamientos para BPD que se pueden usar en combinación con los métodos de la invención incluyen tensioactivo, terapia de oxígeno, terapia de ventilador, esteroides, vitamina A, óxido nítrico inhalado, formulaciones nutricionales ricas en calorías, alimentación intravenosa, antibióticos, restricción de fluidos y diuréticos para disminuir la acumulación de agua en los pulmones, y terapia física para mejorar el rendimiento muscular y ayudar a los pulmones a expeler el moco.

Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas. Los Ejemplos no limitan de ningún modo la invención.

Ejemplos

Diseño experimental. En los días 17 y 19 embriónicos, ratones C57BL/6 preñados fechados en el tiempo (Charles River) se trataron con inyecciones i.p. de 0,5 ml de PBS pH 7,4 con o sin 10 mg/kg de 1 D11 (Genzyme), un anticuerpo IgG_1 anti-TGF-β pan-específico, o una proteína de mieloma de isotipo coincidente sin antígeno conocido (MOPC21; Sigma-Aldrich). En las 12 horas de nacimiento, las crías de parejas de madres tratadas de forma similar se reunieron y se dividieron al azar en dos camadas que se trataron subsiguientemente de forma continua, con sus madres, con aire o con 85% de oxígeno durante 10 días. Cada 24 horas, las madres lactantes de camadas emparejadas se intercambiaron entre los niveles de exposición a O_2 para disminuir los efectos de la respiración de niveles elevados de O_2. Se mezclaron oxígeno de grado médico y gases nitrogenados (Airgas) usando caudalímetros separadamente regulados y calibrados. Las mezclas de gases se introdujeron en una cámara de exposición acrílica de 680 l. Un compartimento estanco permitió el intercambio de las madres y la renovación de alimento, agua, y cama sin cambiar el nivel de exposición a oxígeno de las crías. El caudal de gas reciente en la cámara de exposición superó el consumo calculado de oxígeno de los ratones en ella en > 10 veces (Bartlett et al., Respir. Physiol. 29:193-200 (1997)). El nivel de oxígeno se midió usando métodos paramagnéticos (Servomex modelo 572). Este método de exposición produjo una atmósfera gaseosa con niveles estables de oxígeno con humedad relativa y temperatura en la cámara de exposición que no superaron 60% y 70ºC, respectivamente. Todos los protocolos fueron aprobados por el Subcomité para los Estudios con Animales de Investigación del Hospital General de Massachusetts.

Preparación de tejidos. Para obtener pulmones y corazones para el análisis, las crías se pesaron y se sacrificaron mediante inyección i.p. de 200 mg/kg de pentobarbital sódico. Se realizó una toracotomía para permitir que los pulmones colapsasen, la tráquea se identificó mediante una incisión transversal en el cuello, y se aseguró en la tráquea un tubo de polietileno de 0,61 mm de O.D. (PE10; Harvard Apparatus). Los pulmones se inflaron con 3% de paraformaldehído y 0,1% de glutaraldehído en PBS a una presión de H_2O de 22 cm durante 30 minutos, seguido de la ligación de las vías respiratorias mientras que los pulmones estaban distendidos. Los cuerpos de las crías se sumergieron en fijador durante 3 días a 4ºC. Los corazones y pulmones se disecaron de los cuerpos y se almacenaron a 4ºC en PBS para el análisis posterior. Para obtener tejido pulmonar para la criosección, las tráqueas se canularon, y los pulmones se distendieron suavemente con Medio de Congelación Tisular (TFM; Triangle Biochemical Sciences) y sacarosa al 20% en PBS (diluido 1:1 en vol.) y se retiraron. Subsiguientemente, los pulmones se cubrieron con TFM, se congelaron en isopentano (mantenido en hielo seco), y se almacenaron a -80ºC hasta el uso.

Detección de TGF-β tisular. La inmunorreactividad a la isoforma de TGF-β se detectó en pulmones de crías usando inmunohistoquímica. Tras recuperar el antígeno con citrato ácido, las secciones pulmonares se bloquearon y se expusieron a anticuerpos de conejo anti-TGF-β1 (Santa Cruz, sc-146), TGF-β2, (sc-90), y TGF-β3 (sc-82), y a suero de conejo preinmune (control). Después del lavado exhaustivo, las secciones se expusieron a anticuerpo anti-conejo biotinilado, complejos de avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs) y diaminobencidina (DAB; Vector labs) antes de contrateñirlas con hematoxilina. TGF-β pulmonar también se detectó usando un anticuerpo anti-TGF-β pan-específico e inmunohistoquímica indirecta (Graham et al., Biol. Reprod. 46:561-572 (1992)) y un kit comercialmente disponible optimizado para el uso de anticuerpos murinos en tejidos de ratón (kit de inmunodetección M.O.M.; Vector Labs). Secciones pulmonares, 6 μm de grosor, embebidas en parafina, se trataron con xileno, disoluciones de alcohol graduado, y se hidrataron en PBST (PBS que contiene 0,1% de Tween 20). Después de incubar en reactivo de bloqueo, el tejido se expuso a 1 D11 (diluido en disolución de bloqueo) toda la noche a 4ºC. Después de lavar el tejido con PBST, se incubó con un anticuerpo antirratón biotinilado, se lavó con PBST, y se expuso a complejos de avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs) y diaminobencidina (DAB; Vector labs) antes de contrateñir con hematoxilina.

Análisis de señalización de TGF-β. Se detectó fosfo-SMAD 2 (p-Smad2) nuclear en los pulmones usando inmunohistoquímica indirecta. Se colocaron secciones congeladas de pulmones, 6 μm de grosor, en portaobjetos de

vidrio Superfrost Plus™ (Fisher Scientific), se fijaron con 4% de paraformaldehído en PBS durante 2 minutos, y se permeabilizaron con metanol al 100% durante 10 minutos. Después de bloquear con 5% de suero de cabra en PBST durante 1 hora, las secciones se expusieron a anti-pSmad2 de conejo (Cell Signaling) diluido en tampón de bloqueo toda la noche a 4ºC. Tras lavar las secciones con PBST, se incubaron con un anticuerpo anti-conejo biotinilado, se lavaron con PBST, y se expusieron a complejos de avidina-biotina-peroxidasa y a DAB antes de contrateñir con hematoxilina.

Análisis estereológico de la estructura pulmonar. La patofisiología pulmonar se caracterizó determinando el volumen pulmonar, Lm (la interceptación lineal media o longitud de la cuerda), y %AVD (% de densidad de volumen de espacio aéreo). Los volúmenes pulmonares se determinaron usando el principio de Arquímedes tras la fijación de los pulmones por inflado. Los pulmones en desarrollo lesionados tienen interrumpida la alveolarización y permanecen en una etapa de desarrollo semejante a la sacciforme, con las vías respiratorias distales con mayores diámetros. Estos cambios se cuantifican usando métodos estereológicos y determinando Lm (Massaro et al., Am. J. Physiol. 250:R51-55 (1986); Tomkeieff, Nature 155:24 (1945)), %AVD (Weibel, Stereological methods. London: Academic Press (1979)), y la densidad del tabique secundario (Pierce et al. Am J Physiol. 272: L452-60 (1997)). Lm es inversamente proporcional al área de la superficie interna del pulmón (Thurlbeck, Am. Rev. Respir. Dis. 95:752-764 (1967); Thurlbeck, Am. Rev. Respir. Dis. 95:765-773 (1967)). La densidad del tabique secundario se correlaciona directamente con el desarrollo alveolar.

Se embebieron pulmones de crías fijados por inflado en metacrilato de metilo, y para los estudios estructurales se usaron secciones de 2 μm de grosor teñidas con azul de toluidina del pulmón izquierdo. Mientras se obtienen y se procesan los datos de las imágenes pulmonares, el observador desconoce el grupo de tratamiento y las exposiciones del pulmón. Usando un enfoque de muestreo sistemático (similar al enfoque de Tschanz y Burri, Exp. Lung Res. 28:457-471 (2002)), cuatro campos de 0,60 mm^2 de secciones transversales orientadas al azar de los pulmones izquierdos que excluyeron grandes estructuras vasculares y de las vías respiratorias se digitalizaron para la determinación de Lm; dentro de estos campos, se capturaron cuatro secciones de 0,15 mm^2 para la determinación de %AVD. Usando una macro escrita por el usuario e ImageJ (Rasband, ImageJ, Bethesda, MD (1997-2004)), las imágenes se filtraron y se segmentaron usando métodos descritos previamente (Tschanz et al., 2002). Para determinar Lm, las imágenes se invirtieron y se fusionaron usando una operación AND lógica en forma de bits conteniendo una imagen líneas horizontales separadas 90 μm. Las cuerdas resultantes se ordenaron; las cuerdas < 8 μm y > 250 μm se descartaron para eliminar aquellas asociadas con capilares pulmonares y vías respiratorias conductoras procedentes de los datos (Soutiere et al., Respir. Physiol. Neurobiol 140:283-291 (2004)). Lm se determinó dividiendo la suma de las cuerdas resultantes entre el número de interceptaciones. El %AVD del espacio aéreo distal se determinó usando métodos de recuento de puntos estándar (Weibel, 1979). La densidad del tabique secundario se determinó de forma objetiva mediante recuento.

Tinción de los pulmones para determinar proteínas de la matriz extracelular. La elastina y el colágeno pulmonares se determinaron usando secciones pulmonares de 6 μm de grosor embebidas en parafina. La tinción de elastina se llevó a cabo siguiendo el tratamiento con 0,5% de permanganato potásico y 1% de ácido oxálico, usando tinción de elastina de Miller (Miller, Stain Techno. 28:148-149 (1971)). La tinción de colágeno se llevó a cabo usando 0,1% de rojo Sirio en ácido pícrico saturado (Walsh et al., Anal. Biochem. 203:187-190 (1992)). El % de densidad de volumen de elastina en el parénquima se determinó usando un método estándar (Pierce et al. Am J Physiol. 272: L452-60 (1997)).

Evaluación del desarrollo vascular. Se usó tinción de lectina para identificar la microvasculatura pulmonar en la pared de las vías respiratorias distales. Se ha observado que las lectinas de *Griffania* (Bandeir*aea*) *simplicifolia* se unen a α-D-galactósidos (Hayes et al., J. Biol. Chem. 249:1904-1914 (1974)) en células endoteliales (Mattsson et al, Pancreatology 2:155-162 (2002)), e identifican preferentemente la microvasculatura pulmonar (King et al., Microvasc. Res. 67:139-151 2004)). Secciones pulmonares de 6 μm de grosor embebidas en parafina se bloquearon e incubaron toda la noche con una isoforma IB4 biotinilada de lectina de *G. simplicifolia* (Molecular Probes). Después de lavar con disolución salina tamponada con Tris que contiene 0,1% de Tween 20 (TBST), la lectina unida se detectó usando fosfatasa alcalina complejada con avidina-biotina y sustrato Vector Red (Vector Laboratories), y las secciones se contratiñeron con azul de toluidina. Para la inmunohistoquímica, se usó un anticuerpo anti-αSMA monoclonal murino (1A4; Sigma) para identificar células del músculo liso usando secciones pulmonares de 6 μm de grosor embebidas en parafina, como se describió previamente (Roberts et al., Circ. Res. 87:140-145(2000)).

La densidad de área de las células microvasculares pulmonares en los pulmones de crías de ratón se analizó usando métodos descritos por Weibel (1979). Se usaron secciones de pulmones que se hicieron reaccionar con lectina biotinilada y anticuerpo anti-αSMA y sustrato Vector Red, como se describe anteriormente, para detallar los compartimentos endotelial y de SMC de la microvasculatura, respectivamente. Usando el método de muestreo sistemático detallado anteriormente, se obtuvieron imágenes epifluorescentes del pulmón periférico, evitando la pleura y grandes estructuras de las vías respiratorias y vasculares. Tras usar procedimientos de filtración y segmentación, se determinó el % de densidad de volumen fluorescente (%FVD) dividiendo el número de píxeles correspondientes a los píxeles fluorescentes entre el número total en la imagen. En el análisis se usó el %FVD de la mediana de tres imágenes por sección de pulmón de cría.

El efecto de respirar crónicamente 85% de O_2 o aire sobre hipertrofia ventricular derecha para 14 crías de ratón se evaluó determinando la relación de Fulton (Fulton et al., Br. Heart J. 14:413-420 (1952)). Tras la fijación en 3% de paraformaldehído y 0,1% de glutaraldehído en PBS durante 3 días, los corazones se almacenaron en PBS a 4ºC. Se retiró la aurícula y los grandes vasos, y la pared libre ventricular derecha se disecó de la ventrícula izquierda y el tabique interventricular. Después de secar la PBS en exceso del tejido, el ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo (con tabique) se pesaron separadamente usando una escala protegida.

Métodos estadísticos. El tamaño de muestra para el análisis estereológico se determinó usando métodos descritos por Pocock (Pocock, p. 123-141 en Clinical trials: A practical approach, Nueva York: John Wiley & Sons (1983)). Se estudiaron seis pulmones por grupo para detectar una posible disminución de Lm en 10%, usando el anticuerpo de control isotípico con un α de 0,05 y una potencia de 0,9. Estudios preliminares indicaron que el tratamiento con 1D11 disminuyó la Lm de ratones tratados con PBS que respiraron 85% de O_2 desde 68,0 hasta 62,3 μm, con una SD reunida de 4,2. Puesto que estos datos indicaron que se requerirían 11,4 pulmones de cría por grupo para demostrar un efecto saludable de 1 D11 con un α de 0,05 y una potencia de 0,90, se estudiaron 12 pulmones de cría por tratamiento y grupo de exposición. Los pesos de las crías en camadas emparejadas se analizaron usando un diseño de bloque completo aleatorizado (Snedecor et al., p. 255-273 en Statistical Methods, Ames, Iowa: Iowa State University Press (1980)). Los datos se presentan como media ± SD, y se compararon usando un modelo factorial de ANOVA. Cuando se detectaron diferencias significativas, se usó una prueba de Sheffe a posteriori. La significancia se determinó a $P < 0,05$.

Ejemplo 1: Expresión de TGF-β en el pulmón en desarrollo y la modulación de la señalización de TGF-β con anticuerpos anti-TGF-β

Aunque se observa que los niveles de ARN de TGF-β1 y de TGF-β2 aumentan en el pulmón de rata postnatal (Zhao et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 278:L1231-1239 (2000)), el patrón de expresión de la isoforma de TGF-β en la periferia del pulmón en desarrollo es en gran medida desconocido. Como se muestra en la Figura 1, la inmunorreactividad a TGF-β1-3 se detecta en los pulmones de crías de ratón de 10 días. Se observan niveles similares de las isoformas de TGF-β en las grandes vías respiratorias conductoras y en los bronquiolos terminales y respiratorios. Aunque parece que TGF-β1 tiene la inmunorreactividad más elevada en el pulmón periférico, igualmente se detecta en él TGF-β y TGF-β3. Debido a que es deseable determinar si la inhibición de la actividad de TGF-β en el pulmón distal en desarrollo inhibe los efectos de la lesión pulmonar sobre el desarrollo alveolar, se ensayó en primer lugar si un anticuerpo neutralizante de TGF-β pan-específico reconoce TGF-β en el pulmón periférico. 1D11 es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma generado a partir de los esplenocitos de ratones Balb/c inmunizados con TGF-β2 bovino nativo (Dasch et al., J. Immunol. 142:1536-1541 (1989)). 1D11 neutraliza TGF-β1-3 *in vitro* (Dasch, 1989; Ruzek et al., Immunopharmacol. Immunotoxicol. 25:235-257 (2003)) e identifica TGF-β en placenta humana y tejidos deciduales (Graham et al., Biol. Reprod. 46:561-572 (1992)). Como se muestra en la Figura 2, 1D11 detectó TGF-β en el pulmón de ratones de 10 días. En particular, se observó inmunorreactividad a TGF-β en las paredes de las vías respiratorias grandes y pequeñas y vasos sanguíneos. La intensa inmunorreactividad a TGF-β extracelular también se asoció con la matriz extracelular (flecha).

Aunque la exposición antenatal a anticuerpos neutralizantes de TGF-β puede inhibir la señalización de TGF-β en ratones con anomalías en la matriz extracelular (Neptune et al., 2003), se desconoce si este enfoque puede modular un incremento anticipado en la señalización de TGF-β en el pulmón lesionado en desarrollo. Puesto que el aumento de la señalización de TGF-β está asociado con un incremento en la fosforilación y localización nuclear de Smad2 ó 3 (Nakao et al., Embo J. 16:5353-62 (1997)), se usó inmunohistoquímica para evaluar si la lesión pulmonar hiperóxica está asociada con un incremento en la compartimentalización nuclear de Smad2 fosforilada (p-Smad2) en el pulmón de cría de ratón. Usando este método, se llevaron a cabo estudios adicionales para determinar si el incremento en la señalización de TGF-β se podría modificar mediante tratamiento con anticuerpos anti-TGF-β. Como se muestra en la Figura 3, en comparación con pulmones de cría tratados con PBS y expuestos a aire, el nivel de p-Smad2 nuclear está aumentado en aquellos tratados con PBS y expuestos crónicamente a 85% de O_2. De forma importante, el tratamiento con 1 D11 estuvo asociado con una disminución en la localización nuclear de p-Smad2 en los pulmones de crías expuestos a niveles elevados de oxígeno. Estas observaciones indican que la lesión pulmonar hiperóxica incrementa la señalización de TGF-β, y que la actividad excesiva de TGF-β se puede atenuar con anticuerpos neutralizantes de TGF-β. También es interesante señalar que algunas de las células pulmonares en pulmones expuestos al aire y tratados con PBS tienen p-Smad2 nuclear. Esto sugiere que TGF-β tiene cierta actividad basal en el pulmón postnatal y puede jugar un papel en la regulación del desarrollo normal del pulmón terminal.

Ejemplo 2: La alveologénesis mejora en el pulmón lesionado de neonato mediante tratamiento con anticuerpo anti-TGF-β

La inhalación crónica de niveles elevados de oxígeno por roedores neonatos provoca lesión pulmonar e inhibe el desarrollo pulmonar terminal de una manera similar a la observada en lactantes con BPD (Bonikos et al., Lab Invest. 32:619-635 (1975); Frank et al., J. Appl. Physiol. 45:699-704 (1978); Pappas et al., Lab Invest. 48:735-748 (1983); Bonikos, Am. J. Pathol. 85:623-650 (1976); Warner et al., Am. J. Physiol. 275:L110-117 (1998)). Por lo tanto, el modelo de cría de ratón hiperóxico de lesión pulmonar se usó para estudiar si el tratamiento con anticuerpos

neutralizantes de TGF-β mejora el desarrollo alveolar. Se usó la exposición de crías de ratón neonatas a 85% de O_2 continuo durante 10 días debido a que se observó en estudios preliminares que este nivel de exposición provoca reducción de alveologénesis pulmonar mientras permite una tasa de supervivencia > 80%. Como se muestra en la Figura 4, la exposición crónica a 85% de O_2 estaba asociada con una disminución en el desarrollo del pulmón terminal. Las vías respiratorias distales del pulmón de cría lesionado mostraron una estructura intersticial menos compleja y menores tabiques secundarios y alvéolos (flechas) en comparación con los pulmones de crías de control que respiran aire. Este incremento en el área del espacio aéreo distal resultó probablemente de una disminución en el tejido intersticial debido a que el volumen pulmonar global de los pulmones expuestos a 85% de O_2 no fue diferente del de los expuestos a aire (volumen del pulmón, μl/g de peso corporal: PBS y 85% de O_2 62 ± 8 frente a PBS y aire: 60 ± 5. P > 0,05).

De forma importante, la exposición a anticuerpo anti-TGF-β mejoró el desarrollo pulmonar terminal en el pulmón lesionado de neonato puesto que condujo a un nivel de tabicación del pulmón periférico y un área de espacio aéreo que es próximo al observado en los pulmones de control tratados con PBS y que respiran aire. Además, la exposición a 1D11 no pareció estar asociada con toxicidad del pulmón. En los pulmones tratados con 1 D11 y expuestos a aire, no hubo ningún nivel importante de infiltración de células inflamatorias en las vías respiratorias distales. Estas observaciones sugieren que la atenuación de la señalización anormal de TGF-β mejora el desarrollo pulmonar distal en el pulmón lesionado de ratón neonato.

El efecto de 1 D11 sobre Lm y %AVD se examinó en pulmones de crías expuestos a 85% de O_2 para determinar si el tratamiento con anticuerpos anti-TGF-β mejora la alveologénesis en el pulmón lesionado de neonato. La disminución en la alveologénesis en el pulmón lesionado de neonato se ha asociado con una reducción del área superficial pulmonar interna y con un incremento en el área del espacio aéreo alveolar, que se puede cuantificar mediante métodos estereológicos (Weibel, 1979; Bolender et al., Am. J. Physiol. 265:L521-548 (1993)). Por ejemplo, Lm es inversamente proporcional al área superficial del pulmón interno, y %AVD se correlaciona de forma inversa con el área del espacio aéreo alveolar. Otros han dado a conocer que la lesión pulmonar hiperóxica incrementa Lm y %AVD en el pulmón de ratón y rata en desarrollo (Shaffer et al., Pediatr. Res. 21:14-20 (1987); Boros et al., Am. J. Physiol. 272:L433-441 (1997); Warner et al., Am. J. Physiol. 275:L110-117 (1998)).

Como se muestra en las Figuras 5A-5C, respirar crónicamente 85% de O_2 estaba asociado con un incremento de 30% en Lm (PBS-aire 50,7 ± 3,4 μm frente a PBS-O_2 67,3 ± 3,7 μm), un incremento de ~20% en %AVD (PBS-aire 55,6 ± 3,7% frente a PBS-O_2 67,8 ± 4,0%) y una disminución en la densidad del tabique secundario, en comparación con exposición a aire. De forma importante, en comparación con este cambio asociado con exposición a PBS y O_2, el tratamiento de pulmones que respiran O_s con 1 D11 estaba asociado con una disminución de 30% en Lm (1D11-O_2 62,3 ± 4,4 μm), con una disminución de 51% %AVD (1D11-O_2 61,6 ± 4,2%), y con una mejora (incremento de 38%) en la densidad del tabique secundario. Estos datos indican que TGF-β tiene un papel importante a la hora de mediar el efecto de lesión sobre el desarrollo del pulmón terminal. De forma interesante, el tratamiento con anticuerpo anti-TGF-β solo también estaba asociado con una disminución modesta en Lm y %AVD. Puesto que la señalización basal de TGF-β observada en los pulmones de control pareció estar también modulada por la exposición a 1D11, estos últimos datos indican que TGF-β regula la velocidad de alveolarización postnatal en el pulmón de neonato.

Se llevaron a cabo estudios adicionales para investigar si el efecto protector de 1D11 fue debido a este isotipo, IgG_1. Por lo tanto, usando métodos estereológicos, se estudió si IgG_1 protege o no el pulmón de ratón neonato hiperóxico frente a la inhibición de la alveologénesis. La exposición antenatal a MOPC21, un anticuerpo monoclonal de control emparejado al isotipo IgG de 1D11 sin un antígeno conocido, no atenuó la inhibición de alveologénesis inducida por exposición crónica a 85% de O_2. No se observó diferencia en Lm y %AVD en los pulmones de animales expuestos a 85% de O_2 y tratados con MOPC21 o PBS (Lm: MOPC21-O_2 70,4 ± 7,1 μm frente a PBS-O_2 68,0 ± 3,7 μm; %AVD: MOPC21-O_2 69,4 ± 2,6% frente a PBS-O_2 68,9 ± 4,5%, ambos P > 0,05). Estos datos están de acuerdo con otros informes de que IgG no específico no protege el pulmón de neonato frente a la inhibición de alveologénesis inducida por hiperoxia (Padela et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 172:907-914 (2005)).

Ejemplo 3: La organización de elastina del tabique alveolar mejora mediante el tratamiento anti-TGFβ en el pulmón lesionado de neonato

La elastina es un componente importante de la pared alveolar y de la vasculatura del pulmón, y su biosíntesis y ensamblaje extracelular es crítica para el desarrollo normal del pulmón. En los pulmones de lactantes con BPD, como en ratones neonatos con lesión pulmonar (Veness-Meehan et al., Pediatr. Res. 48:434-444 (2002)), la organización normal de elastina en las puntas de las crestas secundarias está interrumpida, y en su lugar se observa elastina en las paredes de las vías respiratorias distales. Debido a que TGF-β regula la expresión y degradación de proteínas de la ECM en células mesenquimatosas (Leask et al., Faseb J. 18:816-827 (2004)) y en el pulmón (Kucich et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 17:10-16 (1997); Parks et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 17:1-2 (1997)), se examinó el efecto del tratamiento con 1D11 sobre la deposición de proteínas de la matriz extracelular. Como se muestra en la Figura 6, la respiración crónicamente de niveles elevados de O_2 se asoció con expresión alterada de elastina en los tabiques secundarios. El patrón típico de expresión de elastina observado en crías tratadas con PBS y que respiran aire (flechas) fue más desordenado y extendido a lo largo de la pared del tabique (punta de flecha).

Como se muestra en las Figs. 7A y 7B, el patrón desordenado de expresión de elastina estaba asociado con un incremento en el %EVD. De forma importante, el tratamiento con 1D11 estaba asociado con un patrón mejorado de deposición de elastina en las crestas secundarias de pulmones tratados con oxígeno, y con un %EVD que fue normal. Estos datos indican que TGF-β tiene un papel importante a la hora de mediar la expresión anormal de elastina en lesión pulmonar hiperóxica. Además, también indica que el tratamiento con un anticuerpo anti-TGF-β puede proteger el pulmón lesionado del neonato frente a la formación desordenada de elastina. En esta etapa temprana en la lesión pulmonar, no se observó ningún cambio en la distribución de colágeno en los pulmones de crías de ratón expuestos a oxígeno (datos no mostrados).

Ejemplo 4: El tratamiento con un anticuerpo anti-TGF-β mejora el desarrollo microvascular pulmonar en el pulmón hiperóxico en desarrollo

En el ratón y rata en desarrollo, la exposición a niveles elevados de oxígeno altera el desarrollo microvascular pulmonar normal (Roberts et al., Pediatr. Res. 17:368-375 (1983)); D'Angio et al., Front. Biosci. 7:d1609-1623 (2002)). Se ha dado a conocer que TGF-β juega un papel en la regulación de la diferenciación de células que forman vasos sanguíneos (Roberts et al., Am. Rev. Respir. Dis. 140:1126-1128 (1989)). Por lo tanto, se realizó un estudio para determinar si un anticuerpo anti-TGF-β puede mejorar el desarrollo microvascular pulmonar anormal observado en el pulmón de cría neonata lesionado por O_2. Como se muestra en la Figura 8, la exposición crónica a 85% de O_2 estaba asociada con ensamblaje microvascular pulmonar dismórfico. El patrón de tinción de células endoteliales microvasculares pulmonares con lectina fue más difuso y menos ordenado que el observado en el pulmón de control expuesto a aire. Esto también estaba asociado con un incremento en la densidad de volumen de células teñidas con lectina en la periferia de los pulmones lesionados de crías; el %FVD para lectina se incrementó en aproximadamente 4 veces en los pulmones de crías expuestos a 85% de O_2 durante 10 días (Figura 9). Además, el tratamiento con 1D11 estaba asociado con un patrón similar de ordenación de células endoteliales en las vías respiratorias distales de pulmones tratados con 85% de O_2. Además, la exposición a 1D11 estaba asociada con una reducción de casi 50% en %FVD de lectina en pulmones expuestos a un nivel elevado de O_2. Estos datos indican que TGF-β interrumpe el desarrollo microvascular pulmonar normal en el pulmón lesionado de neonato, y que la neutralización del TGF-β con anticuerpos puede atenuar el desarrollo vascular pulmonar anormal.

Puesto que las células del músculo liso (SMC) influyen en el desarrollo microvascular pulmonar, se realizó un examen para determinar si la atenuación de la señalización anormal de TGF-β en el pulmón lesionado de neonato con anticuerpo neutralizante de TGF-β estaba asociada con una distribución mejorada de miofibroblastos. Como se muestra en la Figura 10, la lesión pulmonar hiperóxica estaba asociada con una disminución en miofibroblastos identificados por αSMA en las paredes del pulmón distal. El %FVD de αSMA disminuyó en casi 70% en los pulmones de crías expuestos crónicamente a 85% de O_2 (Figura 9). Por el contrario, el tratamiento con anticuerpos anti-TGF-β incrementó la cantidad de inmunorreactividad a αSMA y el %FVD en el pulmón lesionado. Estos datos indican que la neutralización de TGF-β tuvo un efecto saludable sobre la microvasculatura pulmonar lesionada del neonato. En este modelo, la inmunohistoquímica con anticuerpos anti-αSMA no reveló un incremento en la muscularización de arterias pulmonares en pulmones de crías expuestos a 85% de O_2 durante 10 días (datos no mostrados). Además, la masa ventricular derecha de las crías que respiran crónicamente niveles elevados de oxígeno no aumentó (RV:LV+S: PBS-aire 0,32 ± 0,04; PBS-85% O_2 0,25 ± 0,05, $P > 0,05$).

Ejemplo 5: Crecimiento somático y tratamiento con anticuerpos anti-TGF-β

La lesión pulmonar hiperóxica en el neonato está asociada con disminución del crecimiento somático. Debido a que el tratamiento con anticuerpo anti-TGF-β estaba asociado con alveologénesis y vasculogénesis mejoradas del pulmón periférico, se realizó un estudio para determinar si el tratamiento con 1D11 tiene un efecto saludable sobre el crecimiento de crías expuestas a 85% de O_2. La exposición de crías de ratón neonatas a niveles elevados de oxígeno estaba asociada con una disminución de casi 30% en el peso en comparación con crías de control que respiran aire (peso corporal a los 10 días de edad: PBS-aire: 5,26 ± 1,18 g, PBS-85% O_2: 3,74 ± 1,0 g; n = 10-15, $P < 0,05$). El peso de crías tratadas con 1D11 y expuestas a 85% de O_2 (4,62 ± 0,85 g) no fue significativamente diferente del peso de los controles que respiran aire.

En los ejemplos anteriores, la exposición a un anticuerpo anti-TGF-β pan-específico promovió el desarrollo pulmonar en crías de ratón con lesión pulmonar. Se observó que la inhalación continua de niveles elevados de O_2 disminuye la alveologénesis y altera la vasculogénesis durante la etapa terminal crítica del desarrollo del pulmón, como se dio a conocer previamente (Roberts et al., Pediatr. Res. 17:368-375 (1983); Warner et al., Am. J. Physiol. 275:L110-117 (1998); D'Angio et al., Front. Biosci. 7:d1609-1623 (2002)). Esto produjo hallazgos patológicos en la cría de ratón hiperóxica que son similares a los observados en seres humanos neonatos con BPD. De forma importante, la exposición a un anticuerpo anti-TGF-β, comenzando en el período antenatal, mejoró el desarrollo alveolar, la deposición de elastina, y la estructura microvascular en los pulmones lesionados de crías neonatas.

Los resultados de estos estudios demuestran por primera vez que las terapias anti-TGF-β pueden proteger el pulmón lesionado de neonato frente a la inhibición de la alveologénesis y vasculogénesis, y sirve como un tratamiento para BPD.

La memoria descriptiva se entiende más detalladamente a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva. Las realizaciones en la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de realizaciones de la invención, y no se deberían de interpretar para limitar el alcance de la invención. La cita de cualesquiera referencias aquí no es una admisión de que tales referencias son técnica anterior a la presente invención.

Excepto que se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, etc., usados en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, se han de interpretar como opcionalmente modificados en todos los casos por el término “alrededor de”. En consecuencia, excepto que se indique de otro modo lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener por la presente invención. Excepto que se indique de otro modo, la expresión “al menos” que precede a una serie de elementos se ha de entender que se refiere a cada elemento en la serie. También se describen aquí casos E1 a E25.

E 1. Un método para tratar un lactante con riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGF-β al lactante.

E 2. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β se administra al lactante durante el periodo prenatal.

E 3. El método de E 2, en el que el antagonista de TGF-β se administra al lactante mediante administración a la madre antes del nacimiento del lactante.

E 4. El método de E 2, en el que el antagonista de TGF-β se administra directamente al lactante en el útero.

E 5. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β se administra al lactante durante el periodo postnatal.

E 6. El método de E 1, en el que la edad del lactante es alrededor de 24 semanas de gestación a alrededor de 6 meses después del nacimiento.

E 7. El método de E 1, en el que el lactante es un lactante prematuro nacido a una edad de alrededor de 24 a alrededor de 32 semanas de gestación.

E 8. El método de E 1, en el que el peso del lactante en el nacimiento es alrededor de 1500 gramos o menos.

E 9. El método de E 1, en el que el peso del lactante en el nacimiento es alrededor de 1000 gramos o menos.

E 10. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-TGF-β, un anticuerpo anti-receptor de TGF-β, y un receptor de TGF-β soluble.

E 11. El método de E 10, en el que el anticuerpo es una forma humana o humanizada del anticuerpo monoclonal 1 D11.

E 12. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β es un anticuerpo monoclonal administrado a una dosis que tiene una potencia equivalente a la potencia del anticuerpo 1D11 a una dosis de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal.

E 13. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β es un anticuerpo monoclonal administrado a una dosis que tiene una potencia equivalente a la potencia del anticuerpo 1 D11 a una dosis de peso corporal.

E 14. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado pan-específico.

E 15. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β se administra intramuscularmente, intravenosamente, o subcutáneamente.

E 16. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β se inhala en una forma aerosolizada.

E 17. El método de E 16, en el que el antagonista de TGF-β se administra mediante un nebulizador o un inhalador.

E 18. El método de E 16, en el que dicha forma aerosolizada comprende gotitas menores que 10 μm de diámetro, comprendiendo dichas gotitas el antagonista de TGF-β en un vehículo líquido farmacológicamente aceptable adecuado.

E 19. El método de E 1, en el que el antagonista de TGF-β se inhala en forma de polvo que comprende partículas menores de 10 μm de diámetro.

E 20. El método de E 1, que comprende además administrar al lactante al menos un agente o terapia adicional seleccionado del grupo que consiste en tensioactivo, terapia con oxígeno, terapia con ventilador, un esteroide, vitamina A, óxido nítrico inhalado, formulación nutricional rica en calorías, un diurético, y un broncodilatador.

E 21. Uso de un antagonista de TGF-β para tratar displasia broncopulmonar en un lactante que lo necesite.

E 22. El uso de E 21, en el que el antagonista de TGF-β se usa para mejorar displasia broncopulmonar en un lactante que ha sido diagnosticado con la enfermedad.

E 23. Uso de un antagonista de TGF-β en la fabricación de un medicamento para tratar displasia broncopulmonar en un lactante que lo necesite.

E 24. Un método para tratar lesión pulmonar en un lactante, que comprende:

administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista TGF-β al lactante; y

proporcionar suplementación de oxígeno al lactante tras el nacimiento.

E 25. El método de E 24, en el que el antagonista de TGF-β se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-TGF-β, un anticuerpo anti-receptor de TGF-β, y un receptor de TGF-β soluble.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de TGF-β para uso en el tratamiento de displasia broncopulmonar incrementando alveologénesis y/o vasculogénesis pulmonar en un lactante, en el que el antagonista de TGF-β es un receptor de TGF-β soluble o un anticuerpo anti-receptor de TGF-β.

2. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista de TGF-β es un receptor de TGF-β dominante negativo o un receptor de TGF-β soluble expresado a partir de una secuencia de vector de ácido nucleico administrada al paciente.

3. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, para administración durante el período prenatal.

4. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 3, para administración a la madre antes del nacimiento del lactante.

5. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 3, para administración directamente al lactante en el útero.

6. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, para la administración al lactante durante el período postnatal.

7. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, para el tratamiento de un lactante que tiene de 24 semanas de gestación a 6 meses después de nacer.

8. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, para el tratamiento de un lactante prematuro nacido a una edad de 24 a 32 semanas de gestación.

9. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el peso del lactante al nacer es 1500 g o menos, opcionalmente 1000 g o menos.

10. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, para administración intramuscularmente, intravenosamente o subcutáneamente.

11. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, para inhalación en forma de polvo que comprende partículas menores que 10 μm de diámetro, o en una forma aerosolizada, opcionalmente para la administración mediante un nebulizador o un inhalador.

12. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 11, en el que dicha forma aerosolizada comprende gotitas menores que 10 μm de diámetro, comprendiendo dichas gotitas el antagonista de TGF-β en un vehículo líquido farmacológicamente aceptable adecuado.

13. El antagonista de TGF-β para uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, para administración con un agente o terapia adicional seleccionado de tensioactivo, terapia de oxígeno, terapia con ventilador, un esteroide, vitamina A, óxido nítrico inhalado, formulación nutricional rica en calorías, un diurético y un broncodilatador.

14. Un antagonista de TGF-β para uso en el tratamiento de la inhibición de alveologénesis y/o vasculogénesis que está asociada con una lesión pulmonar en un lactante, en el que el tratamiento comprende administrar el antagonista de TGF-β al lactante y proporcionar suplementación de oxígeno al lactante después del nacimiento, en el que el antagonista de TGF-β es un receptor de TGF-β soluble o un anticuerpo anti-receptor de TGF-β.

15. Uso de un antagonista de TGF-β en la fabricación de un medicamento para tratar displasia broncopulmonar incrementando la alveologénesis y/o vasculogénesis pulmonar en un lactante, en el que el antagonista de TGF-β es un receptor de TGF-β soluble o un anticuerpo anti-receptor de TGF-β.

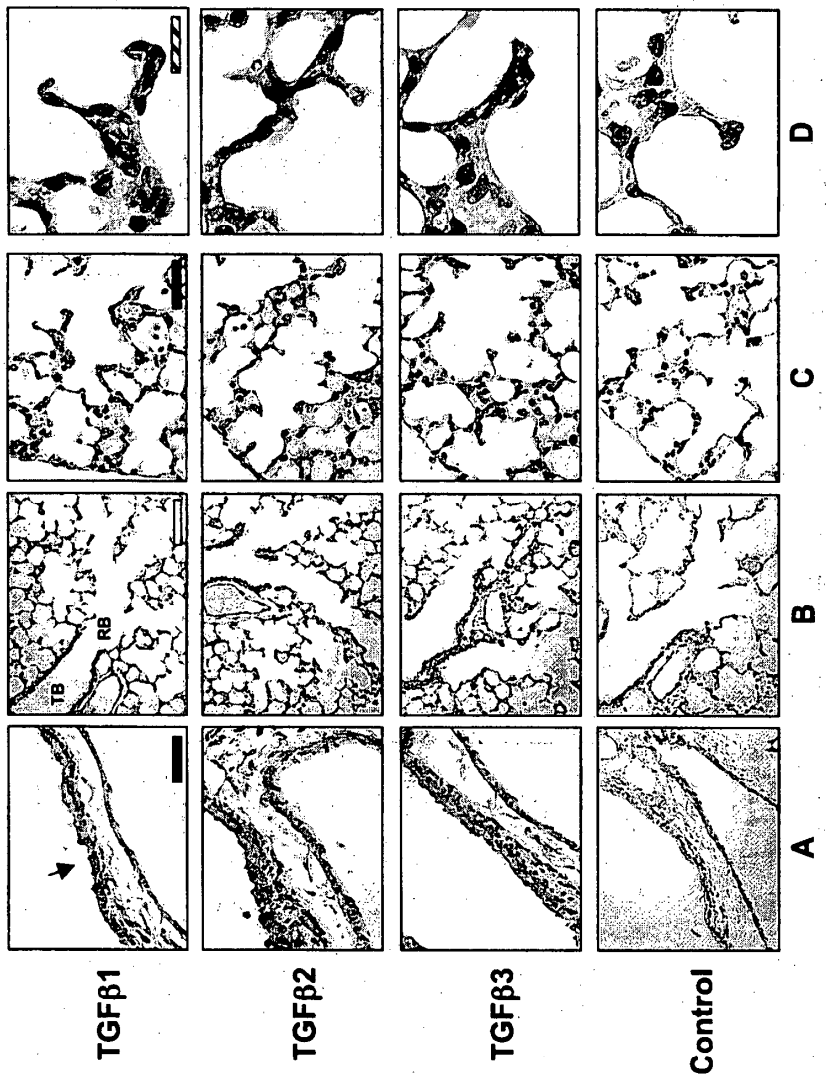

Fig 1

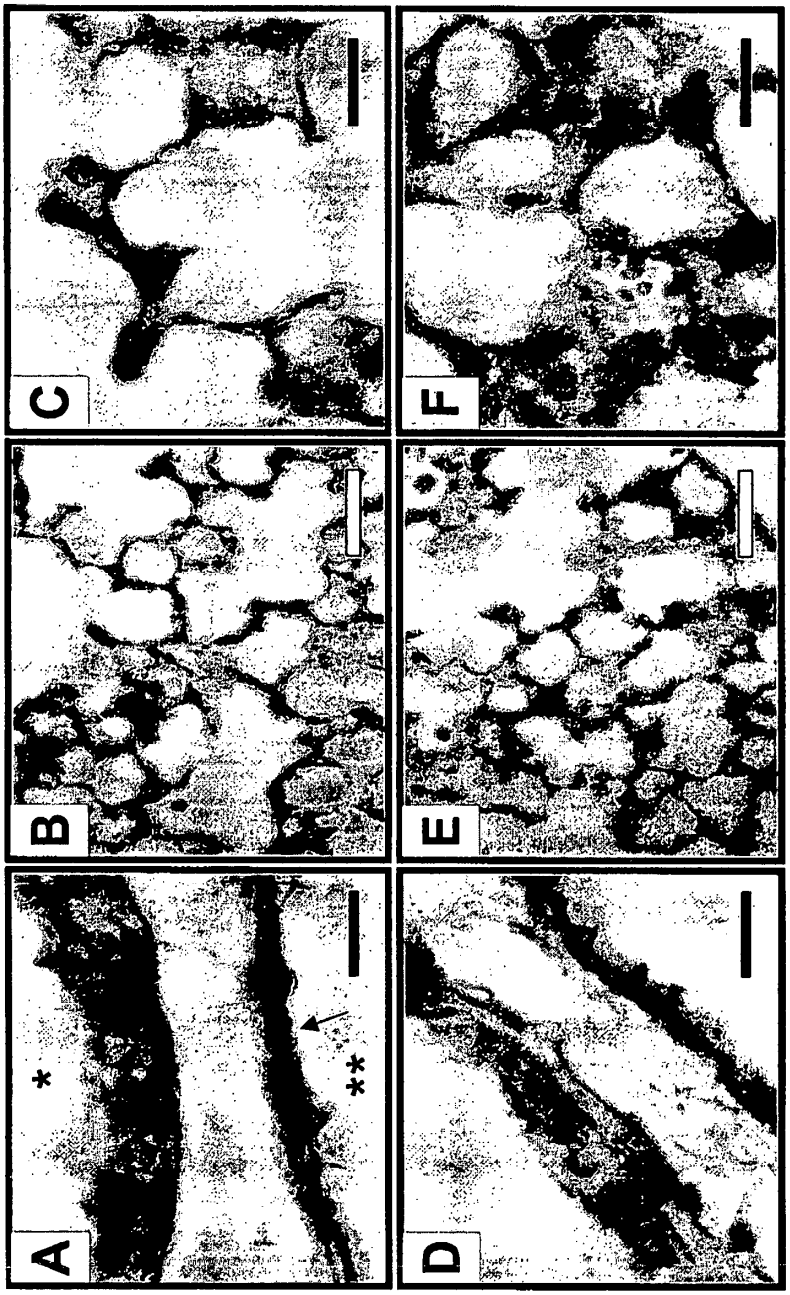

Fig 2

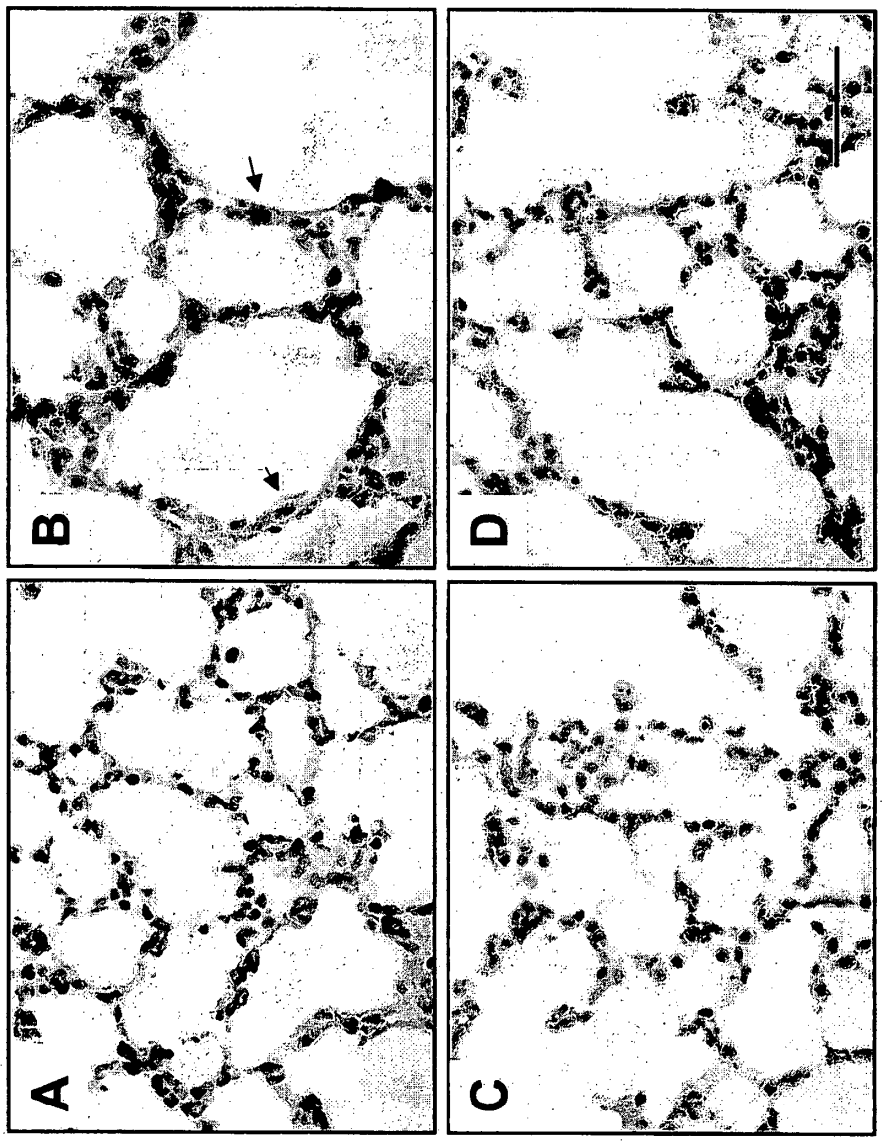

Fig 3

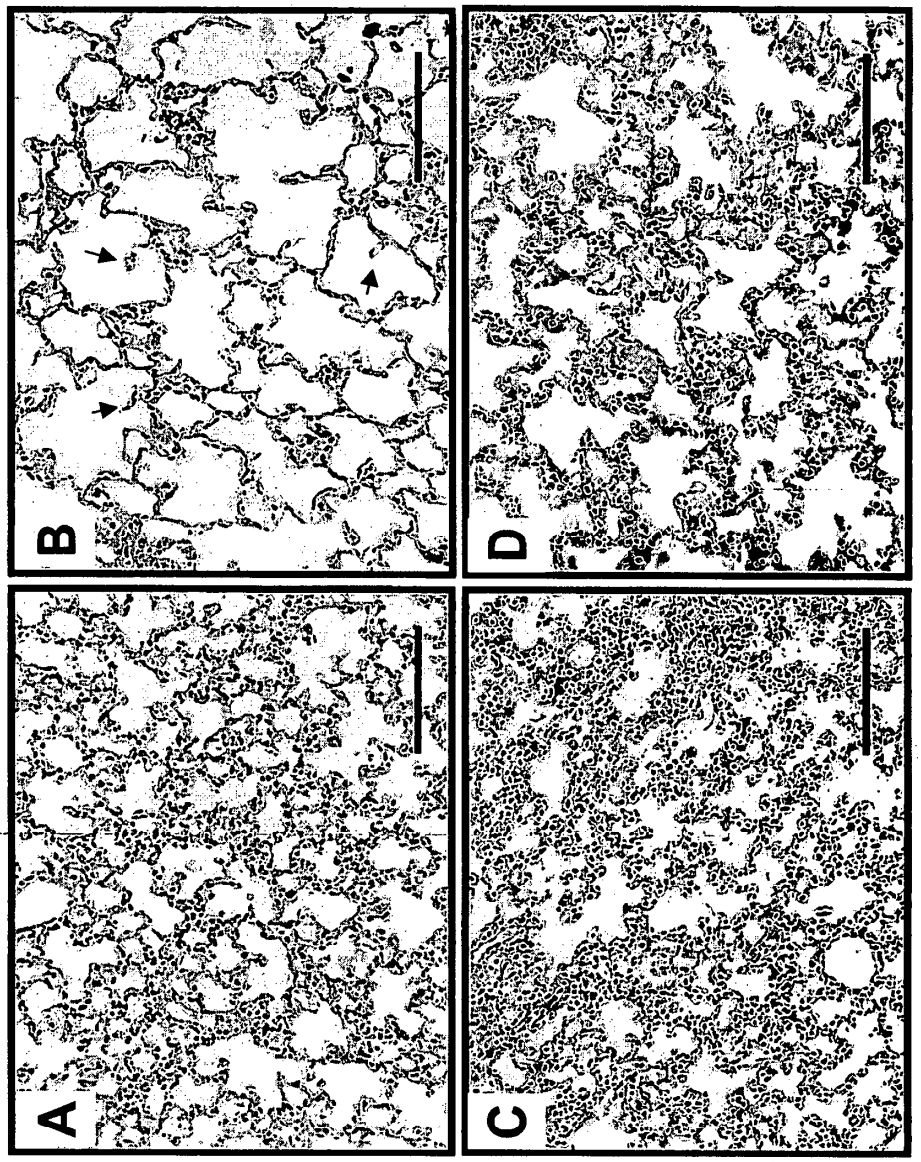

Fig 4

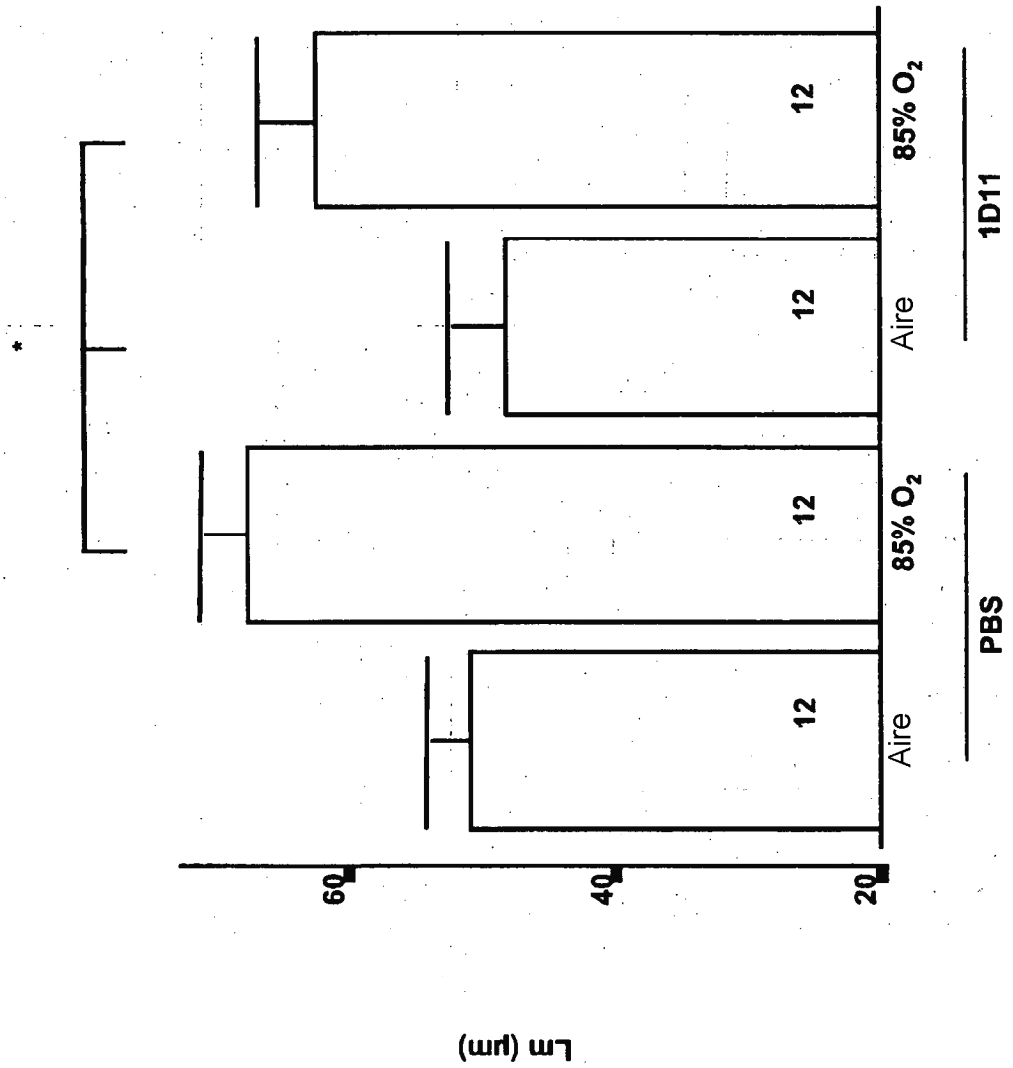

Fig 5A

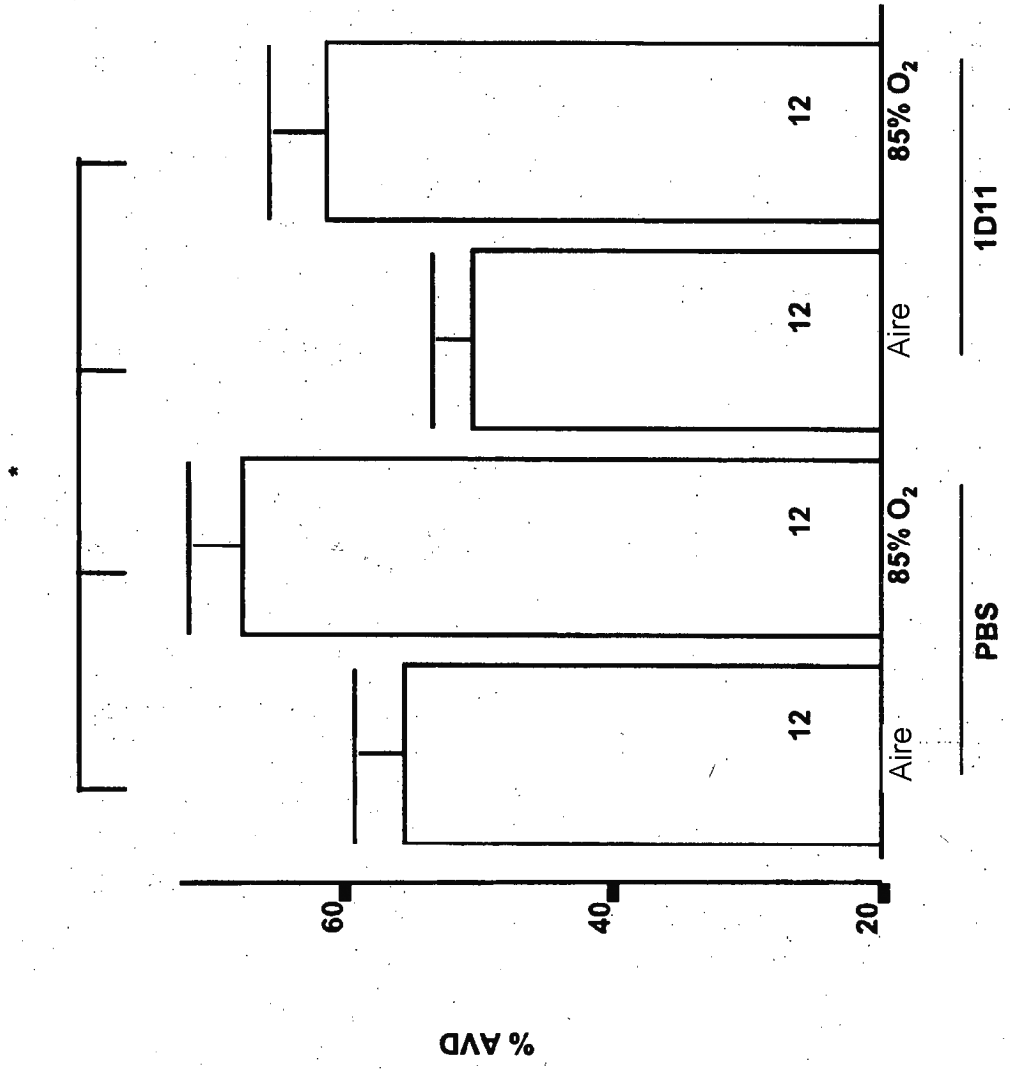

Fig 5B

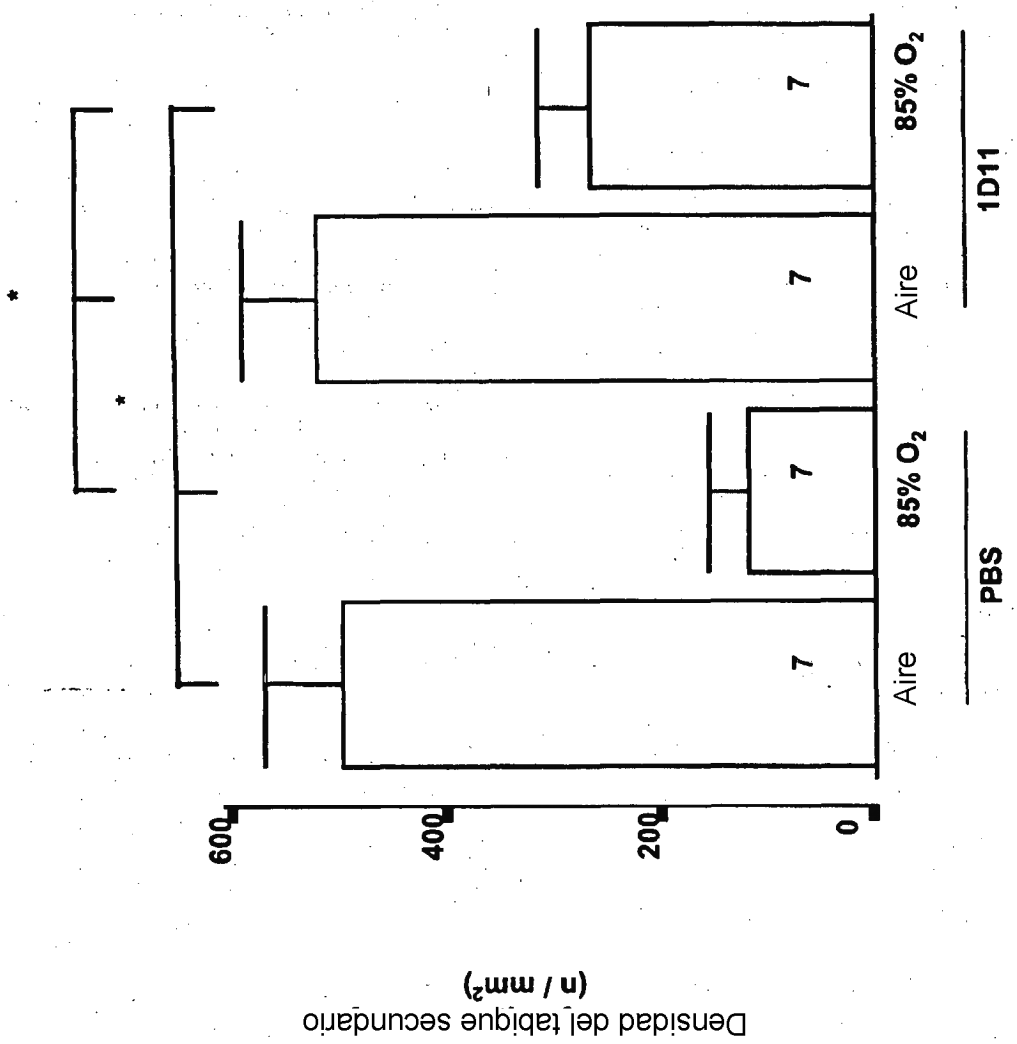
Densidad del tabique secundario
(n / mm²)
600
400
200
0
Aire
85% O2
Aire
85% O2
7
7
7
7
*
*
PBS
1D11

Fig 5C

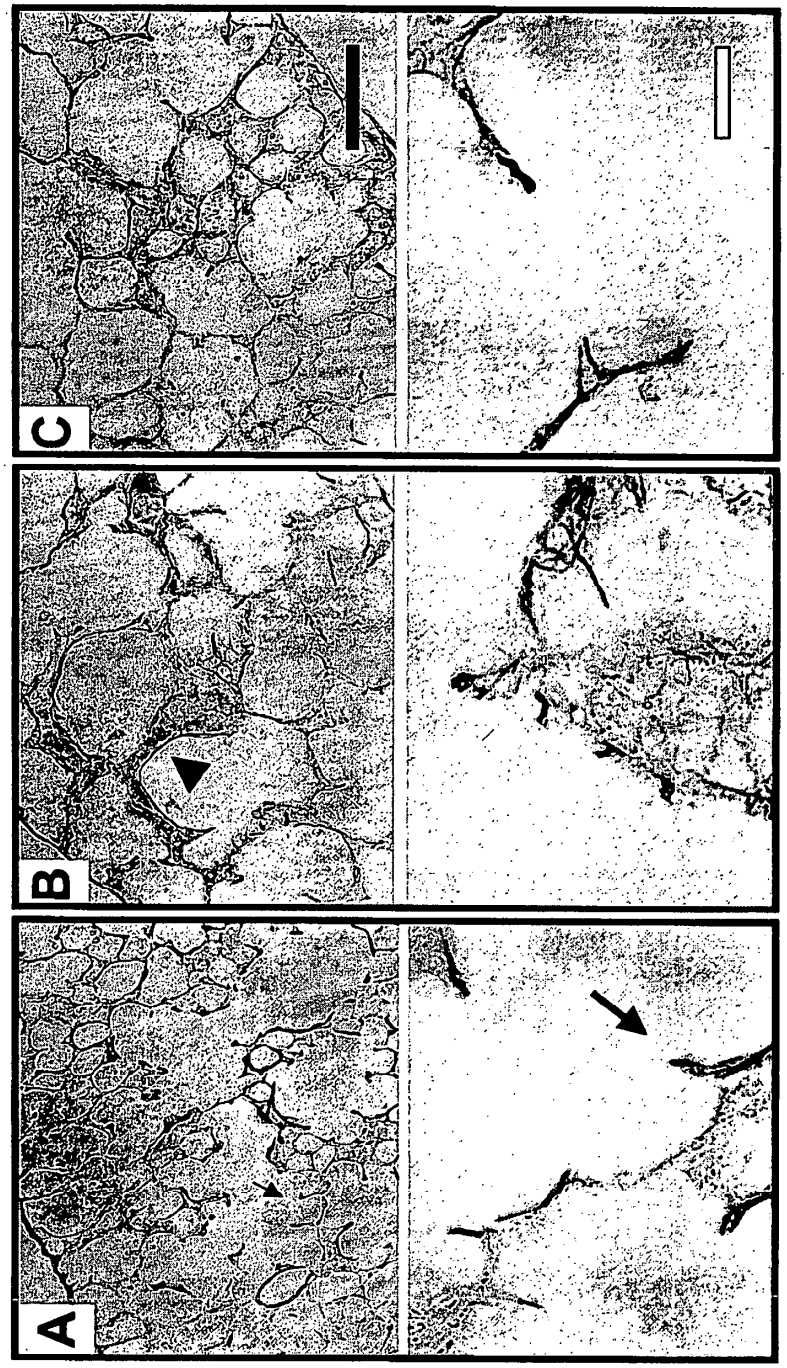

Fig 6

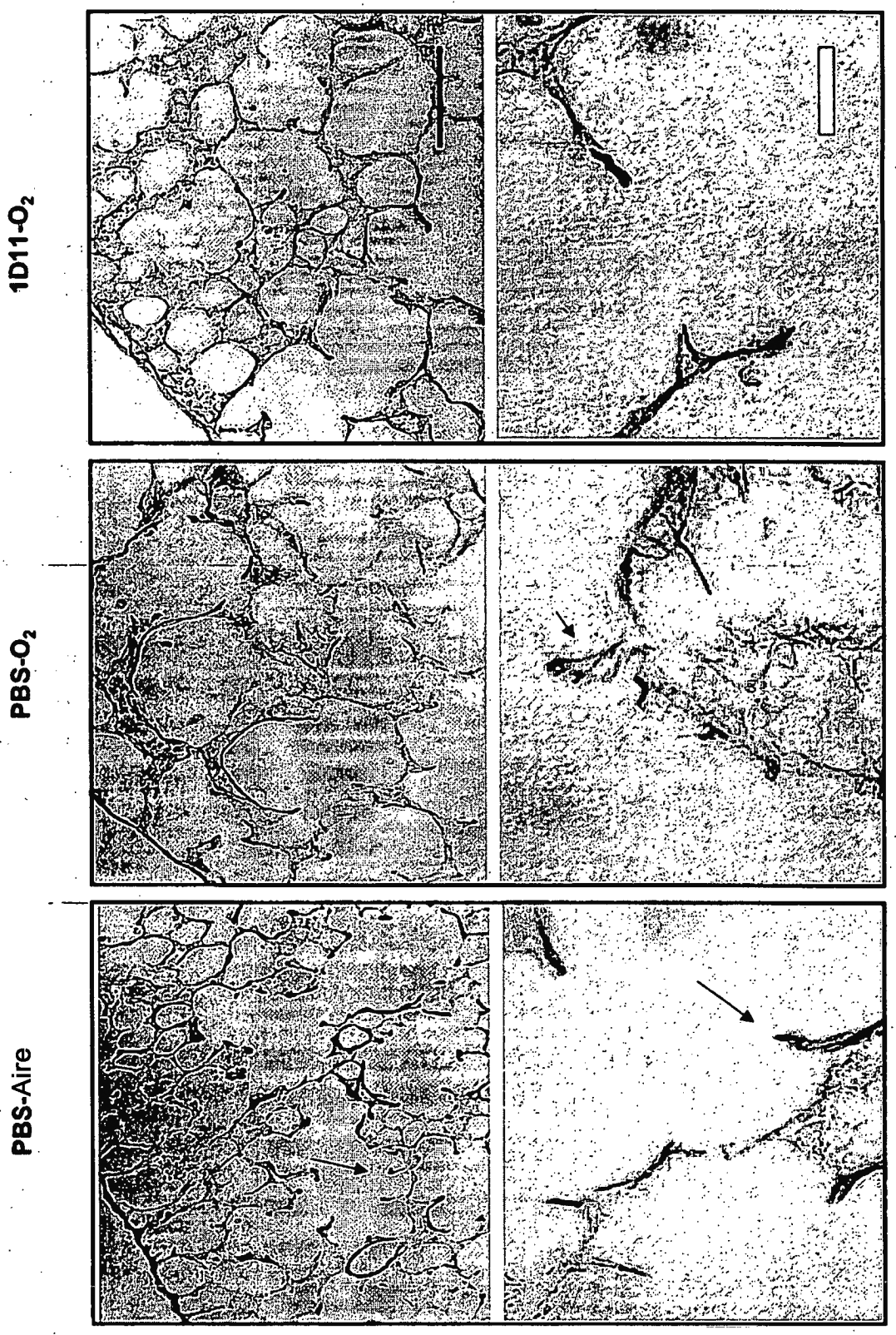

Fig 7A

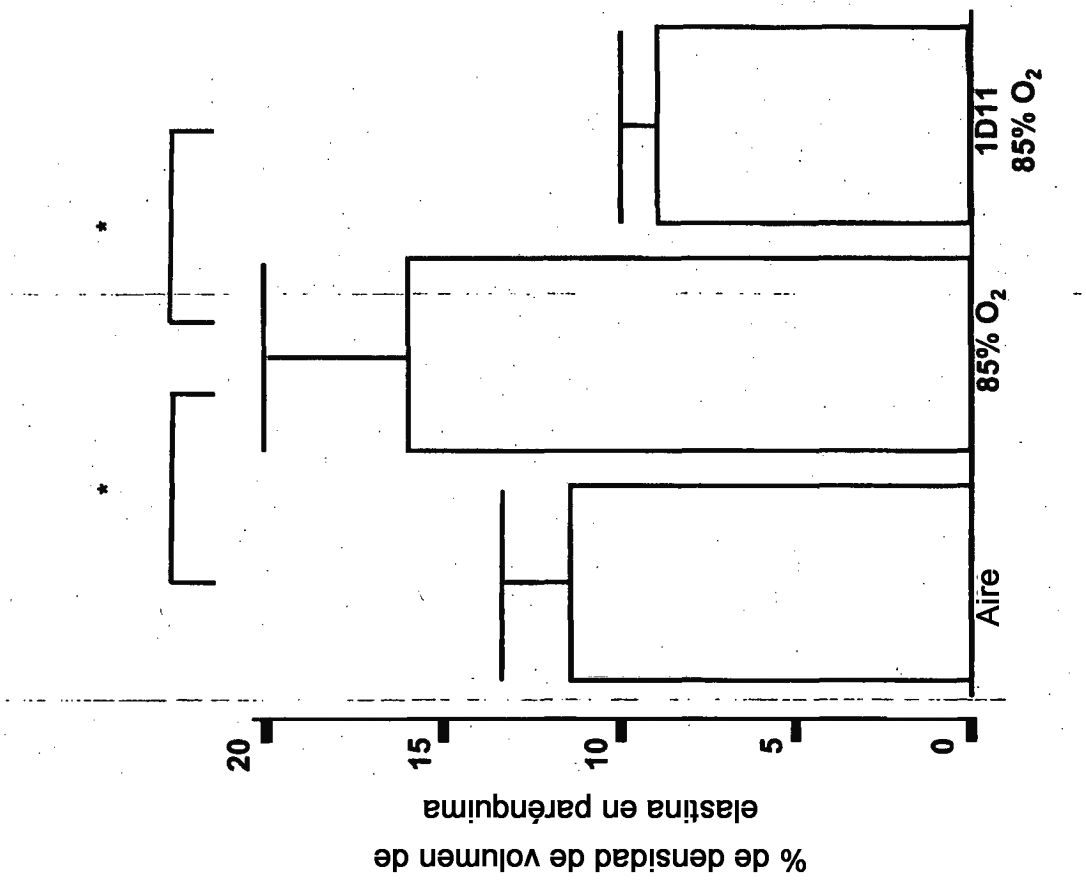
% de densidad de volumen de
elastina en parénquima
20
15
10
5
0
*
*
Aire
85% O_2
1D11
85% O_2

Fig 7B

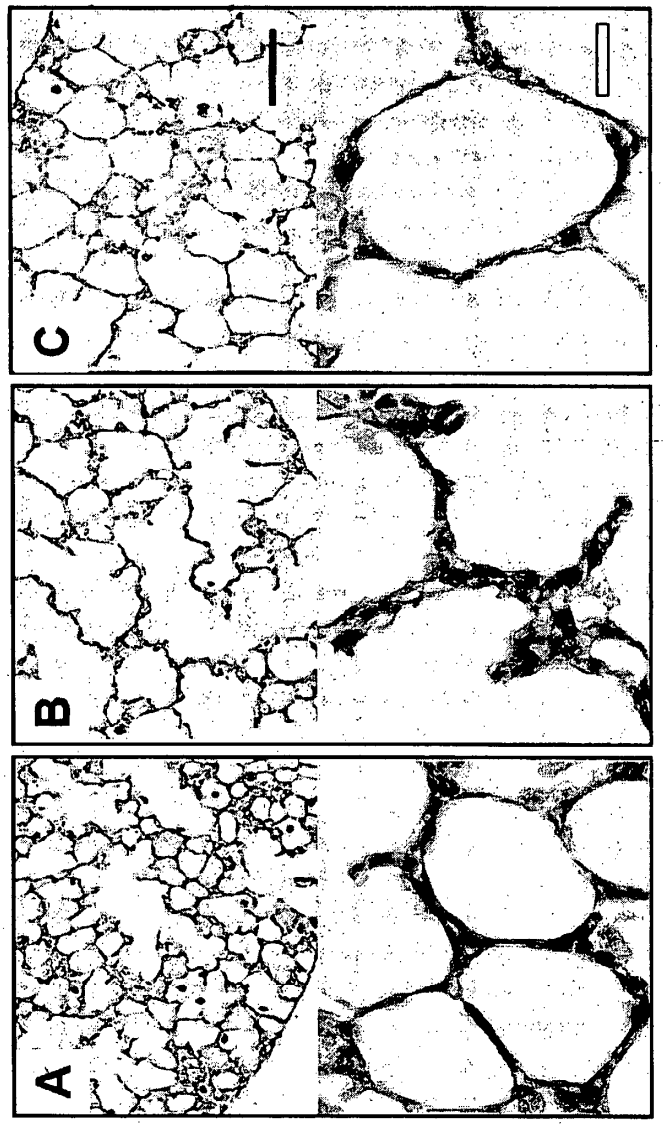

Fig 8

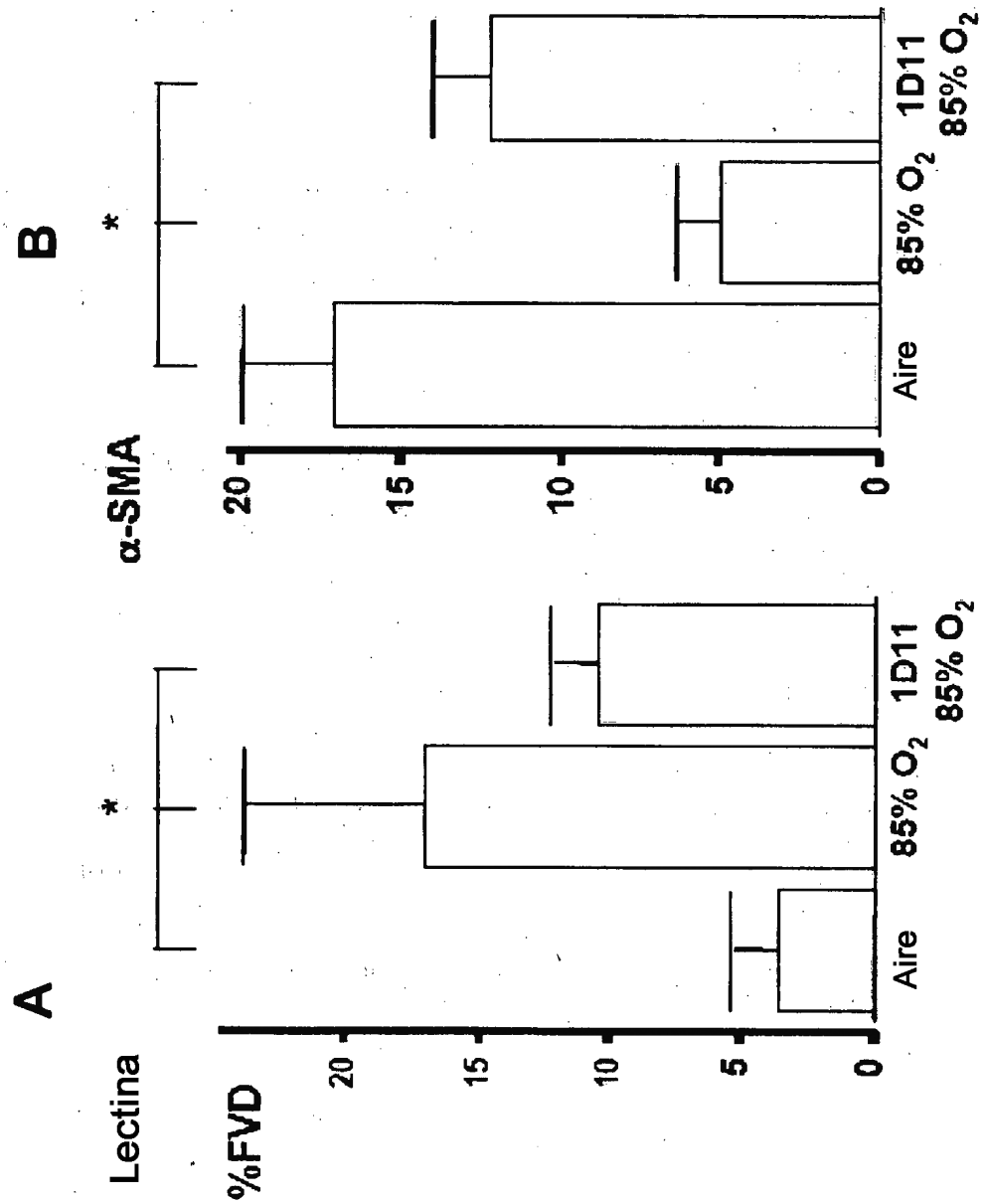
A
Lectina
%FVD
20
15
10
5
0
*
Aire
85% O_2
1D11
85% O_2
B
α-SMA
20
15
10
5
0
*
Aire
85% O_2
1D11
85% O_2

Fig 9

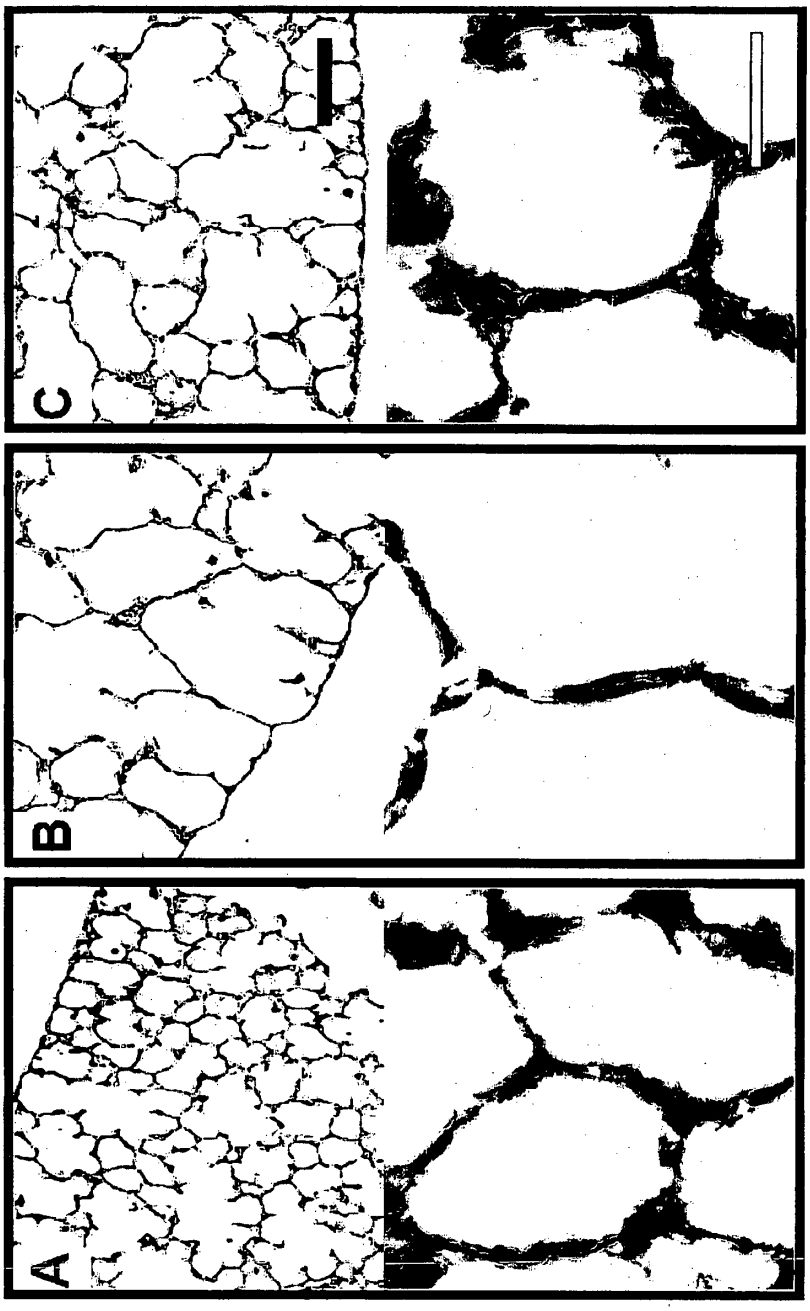

Fig 10