

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 384 564**51 Int. Cl.:
A61K 35/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06841789 .8**
 96 Fecha de presentación: **27.11.2006**
 97 Número de publicación de la solicitud: **1961423**
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Uso de neumocitos de tipo II en el tratamiento de enfermedades pulmonares asociadas con fibrosis pulmonar**

30 Prioridad:
28.11.2005 ES 200502939

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.07.2012

73 Titular/es:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO, 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**SERRANO MOLLAR, Ana María;
CLOSA AUTET, Daniel y
BULBENA MOREU, José Oriol**

74 Agente/Representante:
Arizti Acha, Monica

ES 2 384 564 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

Uso de neumocitos de tipo II en el tratamiento de enfermedades pulmonares asociadas con fibrosis pulmonar

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere, en general, al tratamiento de enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar; y, en particular, con el uso de neumocitos de tipo II en el tratamiento de dichas enfermedades.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Entre las enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar hay enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), que constituyen un grupo de estados con manifestaciones respiratorias clínicas, radiológicas y funcionales similares, en el que las principales alteraciones anatomopatológicas afectan a las estructuras alveolointersticiales. Además, en muchas ocasiones, también afectan a las vías respiratorias pequeñas, así como a los vasos pulmonares. Este grupo de enfermedades pulmonares se caracteriza por la inflamación y cicatrización de los alveolos y sus estructuras de soporte (el intersticio), lo que conduce a la pérdida de unidades alveolares funcionales y a una reducción en la transferencia de oxígeno del aire a la sangre.

15 La etiología de las EPID es muy variada. En la actualidad, se conocen más de 150 causas diferentes, aunque sólo es posible identificar el agente causante de las mismas en aproximadamente el 35% de ellas. Se ha modificado su clasificación tras el consenso preparado por la Sociedad Torácica Americana (ATS) y la Sociedad Europea de Enfermedades Respiratorias (ERS) (véase la tabla 1). Se distinguen varios grupos de EPID. El primer grupo corresponde a neumonías intersticiales idiopáticas, aunque este grupo también incluye enfermedades pulmonares granulomatosas, tales como sarcoidosis. En el segundo grupo aparecen las EPID de causa conocida o asociadas a otras entidades clínicas bien definidas; dicho grupo incluye las manifestaciones pulmonares de las enfermedades del colágeno, que tienen frecuentemente una histología indistinguible de neumonías intersticiales idiopáticas, así como las EPID causadas por fármacos, polvo orgánico (alveolitis alérgica extrínseca), polvo inorgánico (neumoconiosis) y las asociadas a enfermedades hereditarias. El tercer grupo está formado por un conjunto de enfermedades que, aunque idiopáticas, tienen síntomas e histología bien definidos.

25 **Tabla 1**
Clasificación de enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID)

- Neumonías intersticiales idiopáticas
- Fibrosis pulmonar idiopática
- Neumonía intersticial aguda
- 30 Neumonía intersticial inespecífica
- Bronquitis respiratoria con enfermedad pulmonar intersticial (bronquitis respiratoria/EPID)
- Neumonía intersticial descamativa
- Neumonía organizada criptogenética
- Neumonía intersticial linfocitaria
- 35 Sarcoidosis de causa conocida o asociada
- Asociada a enfermedades del colágeno
- Causada por polvo inorgánico (neumoconiosis)
- Inducida por fármacos y radioterapia
- Causada por polvo orgánico (alveolitis alérgica extrínseca)
- 40 Asociada a enfermedades hereditarias (síndrome de Hermansky-Pudlak, etc.)
- Primaria o asociada a otros procesos que no están bien definidos
- Proteinosis alveolar
- Microlitiasis alveolar
- Linfangioleiomiomatosis

Eosinofilia pulmonares

Histiocitosis X (granulomatosis de células de Langerhans)

Amiloidosis

5 Las EPID más frecuentes son fibrosis pulmonar idiopática y sarcoidosis, seguidas por alveolitis alérgica extrínseca y las asociadas a enfermedades del colágeno.

10 La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la EPID más frecuente y se refiere a patologías que tienen una forma de neumopatía fibrosante intersticial crónica, limitada al pulmón y asociada a un patrón histopatológico de neumonía intersticial habitual (patrón clásico asociado a biopsia de la FPI). La prevalencia estimada de la FPI es de 20 casos por cada 100.000 (20/100.000) habitantes en hombres y 13/100.000 en mujeres. Esta enfermedad puede presentarse a cualquier edad aunque es más común entre los 40 y 70 años de edad. Una vez que se diagnostica la enfermedad, la mortalidad es del 50% después de 5 años. La incidencia, la prevalencia y la tasa de mortalidad aumentan con la edad.

15 Su etiología es desconocida y, dentro de las neumonías intersticiales idiopáticas, es la de peor pronóstico. La mayoría de los pacientes tienen los síntomas durante muchos meses (6-24 meses) antes de ser diagnosticados. Las primeras manifestaciones clínicas incluyen una dificultad progresiva para respirar, disnea de esfuerzo, tos seca sin causa aparente y sonidos crepitantes en la auscultación.

20 Se ha propuesto un gran número de mecanismos para explicar la patogenia de FPI. En general, se considera que las células inflamatorias actúan directamente sobre los fibroblastos, a través de una gran variedad de mediadores inflamatorios, citocinas y factores de crecimiento, aunque también desempeñan un papel importante las interacciones de estos moduladores inflamatorios con las células del parénquima pulmonar. A medida que tiene lugar este proceso patológico entre las unidades distales del pulmón (alveolos y bronquiolos terminales), las interacciones entre las células inflamatorias con el epitelio y el endotelio pulmonar también son importantes. Por otra parte, debe destacarse que no sólo las células inflamatorias y las epiteliales afectan a los fibroblastos, sino que también alteran las células inflamatorias y parenquimatosas. En el pulmón normal, el intersticio de los alveolos es muy delgado y el número de fibroblastos es limitado. La mayoría de los fibroblastos y las fibras de colágeno se distribuyen por la totalidad de los vasos y los conductos de las vías respiratorias. Parece que el equilibrio entre factores fibróticos y antifibróticos da lugar a la supresión de la proliferación de fibroblastos y la matriz extracelular.

25 Actualmente, se considera que FPI es el resultado final de una agresión desconocida que causa una inflamación crónica asociada a la desestructuración del tejido pulmonar y a la formación de fibrosis como resultado de la reparación normal de las lesiones. Todo esto daría lugar a una acumulación progresiva de matriz extracelular, una disminución entre el equilibrio de fibroblastos-miofibroblastos, la muerte continuada de células epiteliales y, finalmente, una reepitelización anómala.

30 Los objetivos fundamentales del tratamiento para EPID consisten, en general, en evitar la exposición al agente causante, suprimir la componente inflamatoria de la enfermedad (alveolitis) y tratar las complicaciones. El primer objetivo sólo puede lograrse en las enfermedades de etiología conocida. La supresión de la alveolitis es el único medio terapéutico en las EPID de causa desconocida, puesto que no hay fármacos antifibróticos con eficacia probada. Los fármacos usados son glucocorticoides e inmunodepresores. Las indicaciones y la duración del tratamiento varían según el tipo de EPID. Un estudio reciente ha demostrado que sildenafil causa vasodilatación pulmonar y mejora en el intercambio gaseoso. Sin embargo, no existe una estrategia recomendada.

35 Aunque el proceso patogénico sugiere que existen numerosos puntos teóricos para diferentes intervenciones terapéuticas, el tratamiento siempre se ha limitado, en la práctica, a terapias con antiinflamatorios y, recientemente, trasplante de pulmón. Los diferentes tratamientos actuales incluyen corticosteroides (prednisona), inmunosupresores/agentes citotóxicos (azatioprina, ciclofosfamida) y agentes antifibróticos (colchicina o D-penicilamina) solos o en combinación.

40 Desafortunadamente, ninguna de las terapias farmacológicas que se han sometido a prueba ha demostrado ser útil para mejorar el pronóstico de los pacientes.

45 El trasplante de pulmón es la última opción terapéutica para las EPID que progresan a fibrosis y causan insuficiencia respiratoria. Existen más de 120 causas de EPID que evolucionan a fibrosis y, por tanto, es muy difícil identificar la ventana del trasplante (el momento adecuado para el trasplante en cada paciente, sin ser demasiado pronto ni demasiado tarde para que comprometa la viabilidad del trasplante).

50 Actualmente, se cree que las nuevas terapias pueden incluir: inhibidores de agentes oxidantes, inhibidores de citocinas, inhibidores de proteasas, inhibidores de fibroblastos o factores de crecimiento, fármacos antifibróticos, modificaciones de la dieta, mejor eficacia de los fármacos administrados por vía intrapulmonar, tales como el uso de liposomas, antioxidantes, inhibidores de integrinas de leucocitos, y, finalmente, terapia génica.

55 Pueden usarse otros agentes con la capacidad para bloquear la fibrogénesis para el tratamiento de EPID. La relaxina, un péptido que se usa en las últimas fases de la gestación y que contribuye a la remodelación de los ligamentos

5 púbcos, disminuye la producción de colágeno en cultivos de fibroblastos y altera el equilibrio entre proteinasas y anti-proteinasas, a favor de la ruptura de la matriz. La sumarina, un compuesto sintético que se ha usado durante muchos años para tratar infecciones causadas por nematodos, inhibe los efectos de numerosos factores de crecimiento profibróticos. La endotelina-1, un péptido mitógeno y vasoactivo que se sintetiza y se segrega en el endotelio vascular y en el epitelio de las vías respiratorias, se ha encontrado que está asociada al foco fibroblástico de las biopsias y puede obtenerse en los lavados broncoalveolares; en modelos animales, la inhibición de endotelina-1 evita la cicatrización tras producirse una lesión pulmonar. La angiotensina II es otro péptido con efectos mitógenos en los fibroblastos.

10 Puesto que también puede producirse la lesión epitelial, en parte, por radicales libres de oxígeno (RLO), se ha sugerido que pueden ser beneficiosas las estrategias antioxidantes. Posibles estrategias incluirán la administración de enzimas antioxidantes o promoverán un aumento en la expresión génica de las mismas. El agente de eliminación natural de los RLO suprime la proliferación de fibroblastos pulmonares en respuesta a mitógenos. La taurina y niacina inhiben el desarrollo de fibrosis en modelos animales: el uso de dosis altas de N-acetil-L-cisteína, como precursor de glutatión, taurina y agentes de eliminación de RLO, como combinación terapéutica en terapias inmunosupresoras para la FPL.

15 Otra posible estrategia para el tratamiento de dichas EPID sería la interferencia en el proceso de reclutamiento de leucocitos. Las moléculas de adhesión desempeñan un papel muy importante en este proceso. Los anticuerpos contra estas moléculas de adhesión han mostrado la prevención en la deposición de colágenos en modelos animales de lesión pulmonar.

20 Los fármacos inmunomoduladores también se han estudiado tanto en estudios *in vitro* como en animales de investigación. Estos trabajos sugieren que la modificación de la respuesta inflamatoria en la reparación tisular puede modular el grado de fibrosis final tras la lesión pulmonar.

25 Una terapia eficaz debe tratar de prevenir o inhibir la respuesta fibroproliferativa y tener como objetivo la mejora de la reparación de la reepitelización alveolar. De esta manera, se reduciría el impacto de la enfermedad, mejorando la salud de los pacientes. En otras palabras, sería adecuado inducir la muerte de los fibroblastos, y no la de las células epiteliales, dado que esto daría lugar a una buena reepitelización. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la inhibición del crecimiento de fibroblastos no da lugar a una buena reepitelización [Bowden DH, Young L, Adamson IY. Fibroblast inhibition does not promote normal lung repair after hyperoxia. *Exp Lung Res* 1994; 20:251-262].

30 Otro reto terapéutico está relacionado con la posibilidad de que los agentes que pueden inducir directamente la proliferación de las células epiteliales de tipo II disminuyen la respuesta fibrótica a diferentes agresiones y reducen la muerte celular. Por otra parte, se ha planteado la hipótesis de que los neumocitos de tipo II promueven la fibrosis [Portnoy *et al*, Role of alveolar type II epithelial cells in pulmonary fibrosis. *Lung Biology in Health and Disease*. 2004. 185:573-608].

Se ha sugerido el uso de epitelio alveolar modificado para producir y suministrar terapias farmacológicas de manera sistémica *in vivo* usando lentivirus para la transducción de ADN exógeno que codifica para proteínas secretadas en el epitelio del pulmón (documento US2002182732).

35 Se ha señalado también la posibilidad del uso de células madre o progenitoras para la diferenciación en células epiteliales de tipo II para tratar tejido pulmonar dañado. Se han usado neumocitos de tipo II obtenidos mediante diferenciación de MAPC (células madre progenitoras adultas multipotentes) o MASC (células madre adultas multipotentes) en un método para tratar tejido pulmonar dañado (documento WO2005113748). Se ha notificado un método para la diferenciación de neumocitos de tipo II a partir de células madre mediante la formación de cuerpos embrioides (EB, *embrioid bodies*), células madre (CM) embrionarias en crecimiento, células germinales (CG) embrionarias o carcinoma embrionario (CE) en cultivo en suspensión (documento WO2004015091). Se ha descrito el uso de células madre estimulándolas para dividirse y diferenciarse de manera coordinada, usando factor de crecimiento soluble y otros factores de crecimiento adecuados (documento WO01/42425). En ninguno de los casos, se ha notificado el uso de neumocitos de tipo II separados de otras células pulmonares del tejido pulmonar en lugar de obtenerse a partir de células madre/progenitoras para tratar tejido pulmonar dañado.

SUMARIO DE LA INVENCION

50 Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que el trasplante de neumocitos de tipo II a ratas en las que se ha inducido fibrosis pulmonar con bleomicina (modelo experimental en fibrosis pulmonar idiopática) revierte el proceso de fibrogénesis y detiene la progresión de la enfermedad. El ejemplo que acompaña a la presente descripción revela que, tras la inducción de fibrosis pulmonar en ratas mediante la administración de neumocitos, se logra una inhibición de la proliferación de fibroblastos así como una recuperación del tejido pulmonar en las ratas trasplantadas. Las pruebas desarrolladas por los inventores muestran que se produce un aumento en el peso corporal en los animales trasplantados así como una reducción en el peso del pulmón. Asimismo, los inventores han observado que se logra una reepitelización correcta del pulmón dañado trasplantando dichas células. Por tanto, el trasplante de neumocitos de tipo II por vía intratraqueal produce un defecto sinérgico en los animales trasplantados puesto que, por un lado, comprueba el crecimiento de los fibroblastos, y, por otro lado, produce una reepitelización correcta del pulmón dañado, deteniendo de ese modo la progresión de la enfermedad. El tratamiento con dichos neumocitos de tipo II puede combinarse, si se desea, con otras terapias útiles en el tratamiento de enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de neumocitos de tipo II en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar. En una realización particular, dichas enfermedades pulmonares se seleccionan de EPID, entre las que se encuentra FPI, y algunas alteraciones del sistema inmunitario, entre las que está el edema esclerótico.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es una gráfica que representa la evolución del peso corporal de los animales; en el día cero (0) los animales reciben un tratamiento con bleomicina (BLM) que da lugar a pérdida de peso, las flechas muestran los días de los trasplantes de células (3, 7 y 15 días). La gráfica muestra que la administración de neumocitos de tipo II hace que la recuperación del peso corporal sea más rápida en todos los animales trasplantados. Los datos representan la media \pm EEM de un total de 8 animales por grupo.

La figura 2 es un diagrama de barras que representa el peso de los pulmones en los animales control y en los que se ha inducido fibrosis pulmonar (BLM) y los diferentes tiempos en los que se han realizado los trasplantes de células (3, 7 y 15 días -BLM T3, BLM T7 y BLM T15, respectivamente). La gráfica muestra que la administración de neumocitos de tipo II da lugar a una disminución significativa en el peso pulmonar en los animales trasplantados después de 7 días y después de 15 días. Los datos representan la media \pm EEM de un total de 8 animales por grupo.

La figura 3 es un diagrama de barras que muestra los niveles de hidroxiprolina en el pulmón. La gráfica revela que los niveles de hidroxiprolina en los pulmones en los que se han trasplantado neumocitos de tipo II se reducen en todos los tiempos (días 3, 7 y 15) con respecto a los animales no trasplantados. Esta disminución en los niveles de colágeno es realmente evidente en los animales trasplantados después de 7 y 15 días, en los que se observa que los niveles de hidroxiprolina son iguales a los de los animales control. Los datos representan la media \pm EEM de un total de 8 animales por grupo.

La figura 4 muestra fotografías de microscopio óptico de preparaciones pulmonares. Las fotografías muestran una reducción en los focos de fibrosis pulmonar inducida en aquellos animales que se han trasplantado con neumocitos de tipo II en diferentes tiempos (días 3, 7 y 15).

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

La presente invención se refiere al uso de neumocitos de tipo II en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar, en el que dichos neumocitos de tipo II se separaron de otras células pulmonares del tejido pulmonar de un sujeto.

El término "neumocitos de tipo II" se refiere a células epiteliales pulmonares con un aspecto cuboide, cuya superficie apical está cubierta por microvellosidades y su citoplasma está lleno de cuerpos de inclusiones laminares compuestas por lípidos y proteínas que constituyen el surfactante. Una función importante de los neumocitos de tipo II (o células epiteliales de tipo II) es la síntesis, el almacenamiento y la secreción del surfactante pulmonar, que actúa reduciendo la tensión superficial y previniendo el colapso de las células de los alveolos, estas células pueden separarse de otras células pulmonares usando técnicas convencionales [Richards RJ *et al*, 1987. Isolation, biochemical characterisation, and culture of lung type II cells of the rat. *Lung* 165: 143-158]. Los neumocitos de tipo II son los progenitores de neumocitos de tipo I [Johnson NF *et al.*, 1990. Epitelial progenitor cells in the rat respiratory tract. In: *Biology, toxicology, and carcinogenesis of respiratory epithelium*. Thomassen, DG y Nettesheim, P (E.d). Hemipere publish Corporation, Nueva York: 1990; 1-308]. El término "neumocitos de tipo I" se refiere a células epiteliales pulmonares especializadas en el intercambio gaseoso. Las células de tipo I son muy delgadas y planas y cubren el 95% de la superficie alveolar [Crapo *et al*, 1982. Cell numbers and cell characteristics of the normal lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:332-337].

En condiciones normales, aproximadamente el 1% de los neumocitos de tipo II son responsables de la renovación de la superficie alveolar que está diferenciándose a partir de neumocitos de tipo I. Este hecho es importante puesto que los neumocitos de tipo I son especialmente vulnerables a lesión pulmonar debido a su superficie y la simplicidad de su citoplasma. En estas circunstancias, los neumocitos de tipo II proliferan y repueblan la superficie de los alveolos, proporcionando la integridad del epitelio. Por tanto, dichos neumocitos de tipo II llegan a ser neumocitos de tipo I, reestructurando por completo la superficie alveolar.

Para poner en práctica la invención, los neumocitos de tipo II puede ser neumocitos de tipo II "de tipo natural" (o "wt", "wild type"), es decir no se han manipulado genéticamente. Alternativamente, si se desea, dichos neumocitos de tipo II pueden modificarse genéticamente para aumentar, reforzar o favorecer la actividad de inhibición de la fibrogénesis de dichos neumocitos de tipo II "wt" y/o para aumentar, reforzar o favorecer la reepitelización de dichos neumocitos de tipo II "wt", dando lugar a dichos "neumocitos de tipo II modificados genéticamente" en esta descripción. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de modificaciones que pueden introducirse incluyen modificaciones destinadas a la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la producción de surfactante pulmonar, por ejemplo, proteínas A y D del surfactante, etc., así como modificaciones destinadas al aumento de la proliferación de neumocitos de tipo II, por ejemplo, factor de crecimiento de queratinocitos, etc., entre otros. Las modificaciones genéticas que han de llevarse a cabo en los neumocitos de tipo II pueden realizarse mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, el término "neumocitos de tipo II" incluye (i) neumocitos

de tipo II "wt", (ii) neumocitos de tipo II modificados genéticamente y (iii) combinaciones de neumocitos de tipo II "wt" y neumocitos de tipo II modificados genéticamente.

Los neumocitos de tipo II pueden ser de origen autólogo o heterólogo, preferiblemente los neumocitos de tipo II son de origen autólogo.

5 El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de una especie animal de mamíferos e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y seres humanos; el sujeto es preferiblemente un hombre o una mujer que es de cualquier edad o raza.

10 El término "enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar" se refiere a enfermedades pulmonares caracterizadas por la presencia de cicatrices en los pulmones de modo que, gradualmente, los sacos alveolares (alveolos) se sustituyen por tejido fibrótico. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar incluyen enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), así como algunas alteraciones del sistema inmunitario (por ejemplo artritis reumatoide, edema esclerótico, polimiositis, y, en casos poco comunes, lupus eritematoso sistémico). Otras causas frecuentes de fibrosis pulmonar incluyen (a modo de ilustración no limitativa): las infecciones causadas por virus, rickettsias, micoplasmas y tuberculosis diseminada; la inhalación de polvo orgánico o inorgánico, por ejemplo, polvo mineral tal como sílice, carbón, etc., polvos metálicos y amianto, etc.; la inhalación de gases, humos y vapores (por ejemplo, cloro, dióxido de azufre, etc.); radioterapia para tratamientos antitumorales y radiaciones industriales; y la ingesta de algunos fármacos y sustancias tóxicas tales como bleomicina, metotrexato, busulfano, ciclofosfamida, oro, penicilamina, nitrofurantoína, sulfonamidas, amiodarona, paraquat, etc.; en general, estos agentes producen, en principio, enfermedades difusas del parénquima pulmonar.

20 Tal como se ha descrito previamente, el término "EPID" se refiere a enfermedades pulmonares caracterizadas por la inflamación y cicatrización (fibrosis) de los alveolos y sus estructuras de soporte (el intersticio). Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas EPID incluyen neumonías intersticiales idiopáticas, enfermedades pulmonares granulomatosas y EPID de causa conocida o asociadas a otras entidades clínicas bien definidas. En una realización particular, dicha patología pulmonar se selecciona de fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía intersticial aguda, neumonía intersticial inespecífica, bronquitis respiratoria con enfermedad pulmonar (bronquitis respiratoria/EPID), neumonía intersticial descamativa, neumonía organizada criptogenética, neumonía intersticial linfocitaria, sarcoidosis, EPID asociada a enfermedades del colágeno, causada por polvo inorgánico (neumoconiosis), inducida por fármacos y radioterapia, causada por polvo orgánico (alveolitis alérgica extrínseca), asociada a enfermedades hereditarias, proteinosis alveolar, microlitiasis alveolar, linfangioleiomiomatosis, eosinofilia pulmonares, histiocitosis X (granulomatosis de células de Langerhans), amiloidosis. En una realización particular, dicha EPID es FPL.

25 En otra realización particular, dicha enfermedad pulmonar que se presenta con fibrosis pulmonar es una alteración del sistema inmunitario, por ejemplo, artritis reumatoide, edema esclerótico, polimiositis, y, en casos poco comunes, lupus eritematoso sistémico. El término "edema esclerótico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una rara enfermedad del tejido conjuntivo que puede causar el engrosamiento y endurecimiento de los tejidos de la piel, articulaciones y órganos internos tales como los pulmones. Esta forma es más grave y puede ser mortal.

35 Para su administración en el tratamiento de una patología pulmonar que se presenta con fibrosis pulmonar, se formularán los neumocitos de tipo II en una composición farmacéutica adecuada, denominada a continuación en el presente documento "composición farmacéutica de la invención", en una cantidad terapéuticamente eficaz, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 Tal como se ha mencionado previamente, el término "neumocitos de tipo II" incluye neumocitos de tipo II "wt", neumocitos de tipo II modificados genéticamente y combinaciones de neumocitos de tipo II "wt" y neumocitos de tipo II modificados genéticamente. Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende neumocitos de tipo II "wt". En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende neumocitos de tipo II modificados genéticamente. En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende una mezcla o combinación de neumocitos de tipo II "wt" y neumocitos de tipo II modificados genéticamente.

45 En el sentido usado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de neumocitos de tipo II ("wt" y/o modificados genéticamente) contenidos en la composición farmacéutica de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, estará determinada, entre otras causas, por las características típicas de dichos neumocitos de tipo II y el efecto de inhibición de la proliferación de fibroblastos y reepitelización de la superficie alveolar que ha de lograrse. En general, la cantidad terapéuticamente eficaz de neumocitos de tipo II que ha de administrarse dependerá, entre otros factores, del sujeto que va a tratarse, la patología que padecen, su gravedad, la forma de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben considerarse sólo como una guía para el experto en la técnica, y deben ajustarse la dosis según las variables mencionadas anteriormente. A modo de ilustración no limitativa, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse en una dosis única que contiene entre aproximadamente 1×10^6 células y aproximadamente 25×10^6 células, ventajosamente entre aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células y aproximadamente 20×10^6 células, preferiblemente, entre aproximadamente 5×10^6 células y aproximadamente 10×10^6 células, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. La dosis de

neumocitos de tipo II puede repetirse, dependiendo del estado del paciente y su evolución, en intervalos de tiempo (días, semanas o meses) que tendrán que establecerse en cada caso por el especialista.

5 La composición farmacéutica de la invención se preparará, en general, en una forma farmacéutica de administración adecuada para facilitar el contacto entre los neumocitos de tipo II ("wt" y/o modificados genéticamente) y el tejido pulmonar afectado con el fin de que se produzca el efecto deseado, es decir una inhibición de la proliferación de fibroblastos y, ventajosamente, una reepitelización correcta del tejido afectado; por esta razón, dicha composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica adecuada para la vía de administración elegida. Dicha composición farmacéutica de la invención puede administrarse *in vivo* directamente en el tejido pulmonar del sujeto que necesita el tratamiento, o administrarse *in vitro* en el tejido afectado previamente, que se vuelve a implantar posteriormente en el sujeto que necesita el tratamiento después de la administración de la composición farmacéutica de la invención.

15 Para su administración *in vivo* a un sujeto que necesita el tratamiento, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por cualquier vía apropiada, tal como, por ejemplo por vía pulmonar, intratraqueal, nasal, parenteral, intraperitoneal, etc., preferiblemente, por vía pulmonar, intratraqueal, nasal o parenteral, razón por la que la composición farmacéutica de la invención incorporará las sustancias auxiliares, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados según la forma farmacéutica de administración seleccionada. Dichas formas farmacéuticas de administración pueden prepararse mediante métodos convencionales. Puede encontrarse una revisión de las diferentes formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Fauli i Trillo, 10ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones. En cualquier caso, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse usando el equipo, aparato y dispositivos adecuados, que se conocen por los expertos en la técnica, por ejemplo catéteres, cánulas, etc.

25 Por otra parte, para la administración *in vitro* de la composición farmacéutica de la invención es posible proceder tal como se indica a continuación. En primer lugar, se extrae el tejido pulmonar que está dañado o afectado por fibrosis (por ejemplo, un lóbulo pulmonar). A continuación, el tejido pulmonar se pone en contacto con la composición farmacéutica de la invención en condiciones que permiten el contacto y la adhesión de neumocitos de tipo II al tejido pulmonar de modo que dichas células pueden ejercer su acción inhibitoria de la proliferación de fibroblastos y, ventajosamente, reepitelizar el tejido afectado. Finalmente, el tejido pulmonar tratado se implanta en el sujeto. Tanto la extracción del tejido pulmonar como su implantación en el sujeto una vez sometido a tratamiento con la composición farmacéutica de la invención pueden llevarse a cabo usando métodos convencionales, normalmente mediante métodos quirúrgicos conocidos por los expertos en la técnica. La composición farmacéutica de la invención puede ponerse en contacto con el tejido pulmonar usando métodos convencionales, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica de la invención en el tejido pulmonar, o mediante lavado del tejido pulmonar con la composición farmacéutica de la invención, o sumergiendo el tejido pulmonar en un baño que contiene la composición farmacéutica de la invención, o mediante "siembra" de los neumocitos de tipo II directamente en el tejido pulmonar con el fin de establecer una población celular, etc. El tejido pulmonar extraído del sujeto puede volver a implantarse en el sujeto, una vez tratado con neumocitos de tipo II, después de un periodo de tiempo variable, normalmente de entre 6 y 24 horas después de su extracción de modo que no se comprometa la viabilidad del tejido pulmonar.

35 En cualquier caso (administración *in vivo* o *in vitro*), la composición farmacéutica de la invención se administrará usando el equipo, aparato y dispositivos adecuados que son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, catéteres, cánulas, etc.

40 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se prepara en forma de una suspensión o disolución acuosa, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina, una solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de los vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración de neumocitos de tipo II incluyen, por ejemplo, una solución salina estéril (por ejemplo, NaCl al 0,9%). La composición farmacéutica de la invención también puede contener, si fuese necesario, otras sustancias auxiliares o compuestos farmacéuticamente aceptables, tales como codisolventes, aditivos para estabilizar la suspensión, por ejemplo conservantes farmacéuticamente aceptables, ácidos, bases o tampones que son farmacéuticamente aceptables para ajustar el pH, tensioactivos, etc. Asimismo, para estabilizar la suspensión, es posible añadir agentes quelantes de metales. La estabilidad de las células presentes en el medio líquido de la composición farmacéutica de la invención puede aumentarse mediante la adición de sustancias adicionales, por ejemplo, aminoácidos, tales como ácido aspártico, ácido glutámico, etc. Estas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención se conocen, en general, por los expertos en la técnica y se usan normalmente para la preparación de formulaciones para composiciones de células. Puede encontrarse información adicional sobre estas sustancias en tratados de salud animal o galénica, por ejemplo, en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Fauli i Trillo, 10ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

55 La composición farmacéutica de la invención puede conservarse hasta su uso mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica; en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención puede almacenarse hasta su uso mediante congelación.

La composición farmacéutica de la invención puede usarse junto con otros fármacos adicionales usados en la prevención y/o el tratamiento de dichas patologías pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar en forma activa para proporcionar un tratamiento de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica proporcionada por esta invención o, alternativamente, pueden proporcionarse en forma de una composición independiente para su administración simultánea o secuencial a la de la composición farmacéutica de la invención.

Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de fármacos adicionales que pueden usarse para proporcionar una terapia de combinación incluyen antiinflamatorios, antifibróticos, factores de crecimiento de neumocitos de tipo II tales como factor de crecimiento de queratinocitos, etc.; inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos tales como antagonistas del factor de crecimiento transformante β (TGF β), etc.; inhibidores de angiotensina II, tales como sartanes, por ejemplo losartán, etc.

Tal como se mencionó anteriormente, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse *in vitro*, es decir en el tejido pulmonar dañado o afectado por fibrosis extraído previamente del sujeto que necesita el tratamiento con el fin de inhibir la proliferación de fibroblastos y, ventajosamente, reepitelizar el tejido pulmonar afectado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para inhibir *in vitro* la proliferación de fibroblastos o para reepitelizar tejido pulmonar que comprende poner tejido pulmonar en contacto con una composición farmacéutica de la invención, en el que en dichos neumocitos de tipo II de la composición farmacéutica se separaron de otras células pulmonares del tejido pulmonar de un sujeto. En una realización particular, dicho tejido pulmonar es tejido pulmonar dañado, es decir afectado por fibrosis pulmonar, y que se ha extraído previamente de un sujeto que padece enfermedad pulmonar que se presenta con fibrosis pulmonar. Tal como se mencionó anteriormente, la extracción del tejido pulmonar puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales, normalmente quirúrgicos, conocidos por los expertos en la técnica. La composición farmacéutica de la invención puede ponerse en contacto con el tejido pulmonar mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica de la invención en el tejido pulmonar, o mediante lavado del tejido pulmonar con la composición de la invención, o sumergiendo el tejido pulmonar en un baño que contiene la composición farmacéutica de la invención, o mediante "siembra" de los neumocitos de tipo II directamente en el tejido pulmonar con el fin de establecer una población celular, etc. El tejido pulmonar extraído del sujeto y sometido a tratamiento con neumocitos de tipo II, si se desea, puede volver a implantarse en el sujeto, después de un periodo de tiempo variable, normalmente de entre 6 y 24 horas después de su extracción.

En otro aspecto, la solicitud da a conocer adicionalmente un método para el tratamiento de una enfermedad pulmonar que se presenta con fibrosis pulmonar en un sujeto que necesita el tratamiento que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende neumocitos de tipo II a dicho sujeto. La administración de la composición farmacéutica de la invención puede llevarse a cabo usando métodos convencionales tal como se mencionó anteriormente en relación con la administración *in vivo* de dicha composición farmacéutica de la invención a un sujeto que necesita el tratamiento.

En otro aspecto, la solicitud da a conocer adicionalmente un método para el tratamiento de una enfermedad pulmonar que se presenta con fibrosis pulmonar en un sujeto que necesita el tratamiento que comprende extraer tejido pulmonar de dicho sujeto, ponerlo en contacto con una composición farmacéutica que comprende neumocitos de tipo II, y volver a implantarlo en dicho sujeto. En una realización particular, dicho tejido pulmonar es tejido pulmonar dañado, es decir afectado por fibrosis pulmonar, y se ha extraído previamente de un sujeto que padece enfermedad pulmonar que se presenta con fibrosis pulmonar. En este caso, la composición farmacéutica de la invención puede ponerse en contacto con el tejido pulmonar extraído mediante métodos convencionales tal como se mencionó anteriormente, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica de la invención en el tejido pulmonar, o mediante lavado del tejido pulmonar con la composición farmacéutica de la invención, o sumergiendo el tejido pulmonar en un baño que contiene la composición farmacéutica de la invención, o mediante "siembra" de los neumocitos de tipo II directamente en el tejido pulmonar con el fin de establecer una población celular, etc. El tejido pulmonar extraído del sujeto puede volver a implantarse en el sujeto, una vez tratado, con neumocitos de tipo II, después de un periodo de tiempo variable, normalmente de entre 6 y 24 horas después de su extracción.

El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe considerarse limitativo del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

50 **Trasplante de neumocitos de tipo II en ratas en las que se ha inducido fibrosis pulmonar.**

I. Materiales y métodos

Se usaron ratas macho y hembra de la raza Lewis (Harlan Inerfauna, Barcelona) de peso corporal entre 175-200 gramos al comienzo de los experimentos.

Se alojaron los animales en condiciones ambientales constantes de temperatura de 22-24°C, humedad relativa del 60-65% y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Se les facilitó una dieta convencional de comida AO4 (Panlab, Barcelona) y agua de la red de Barcelona a voluntad. Se llevaron a cabo todos los estudios según las normas reguladoras de la Unión Europea para modelos experimentales de animales (Directiva 86/609/EEC).

1.1 Modelo experimental

Se provocó fibrosis pulmonar mediante una instilación intratraqueal de una dosis única de 0,25 U de bleomicina por 100 gramos de peso del animal, disuelta en un volumen de 0,25 ml de solución salina (NaCl al 0,9%). Los animales control recibieron el mismo volumen de solución salina en vez de bleomicina. La instilación intratraqueal se realiza con los animales anestesiados con halotano por vía inhalatoria.

Se realizaron los trasplantes de neumocitos de tipo II en ratas Lewis hembra 3, 7 y 15 días después de la inducción de la fibrosis pulmonar. Se llevaron a cabo dichos trasplantes mediante instilación intratraqueal de las células ($2,5 \times 10^6$ células por animal, suspendidas en 0,5 ml de solución salina) con anestesia inhalatoria con halotano. Se llevó a cabo un trasplante en los animales control mediante instilación intratraqueal de las células ($2,5 \times 10^6$ células por animal/suspendidas en 0,5 ml de solución salina) con anestesia inhalatoria con halotano, 3 días después de la instilación de solución salina. Se sacrificaron todos los animales 21 días después de la inducción de la fibrosis pulmonar. Se sacrificaron los animales mediante una inyección letal por vía intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/kg) y desangramientos posteriores del animal por la aorta abdominal; finalmente, se extrajeron los pulmones unidos a la tráquea.

1.2 Preparación de las células

Se aislaron células epiteliales de tipo II (neumocitos) de ratas Lewis macho. En primer lugar, se anestesiaron los animales con pentobarbital sódico (100 mg/kg). Se perfundieron los pulmones con solución salina mediante canulación de la arteria pulmonar. Se extrajeron los pulmones y se llevó a cabo un lavado broncoalveolar (4×10 ml) para eliminar los macrófagos alveolares. Después de digestión con tripsina (Sigma) en un baño de agua a 37°C , se cortaron los pulmones en pequeños fragmentos y se añadieron 5 ml de suero fetal bovino y ADNasa (Roche Diagnostics) para llevar la disolución hasta un volumen final de 20 ml. En primer lugar se filtró la suspensión celular a través de un tejido de gasa, un filtro de $50 \mu\text{m}$ y finalmente a través de un filtro de $30 \mu\text{m}$. Se separaron las células mediante un gradiente de Percoll (Amersham Biosciences) y centrifugación a 250 g, durante 20 minutos a 10°C . Se recogió la banda de células que quedaban en los dos gradientes y se añadió ADNasa hasta un volumen final de 40 ml. Se centrifugó a 250 g durante 20 minutos a 10°C . Se resuspendió el precipitado celular con 5 ml de medio de cultivo DCCM1 (Biological Industries) complementado con glutamina 2 mM, $100 \mu\text{g/ml}$ de penicilina y $60 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Se incubó durante 1 hora para eliminar los macrófagos alveolares. Después de una hora, se centrifugó la suspensión celular a 250 g durante 20 minutos a 10°C y se lavaron dos veces usando centrifugación en solución salina. Finalmente, se resuspendieron en solución salina ($0,5 \text{ ml}/2,5 \times 10^6$ células).

Se facilitaron la viabilidad y el recuento celular mediante tinción con azul tripano (Sigma). Cada animal recibió un promedio de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ neumocitos de tipo II resuspendidos en suero fisiológico estéril.

1.3 Análisis estadístico

Todos los resultados se refieren a la media \pm EEM. Se determinaron diferencias significativas entre medias usando un análisis de la varianza ANOVA y una prueba posterior de Neuman-Keuls. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

II. Resultados

En todos los casos, se llevaron a cabo los trasplantes de neumocitos de tipo II (T) varias veces después de la inducción de fibrosis pulmonar: día 3 (BLM T3), día 7 (BLM T7) y día 15 (BLMT15).

2.1 Medición del peso corporal

La fibrosis pulmonar conlleva una pérdida de peso corporal. Sin embargo, los resultados muestran que dicha pérdida se recupera antes en los animales trasplantados con neumocitos de tipo II (figura 1).

2.2 Medición del peso del pulmón

Asimismo, el peso del pulmón, que aumenta significativamente con la inducción de fibrosis pulmonar, experimentó un menor aumento en los grupos de animales trasplantados después de 7 y 15 días con neumocitos de tipo II (figura 2).

2.3 Niveles de hidroxiprolina

Finalmente, la determinación de los niveles de hidroxiprolina (marcador específico de la deposición de colágeno) mostró valores significativamente menores en todos los grupos trasplantados (figura 3). Este resultado mostró una reducción muy importante en el proceso de fibrosis en el parénquima pulmonar. Esta reducción en el proceso fibrótico también puede observarse en preparaciones histológicas de pulmón (figura 4) de los animales tratados.

REIVINDICACIONES

1. Uso de neumocitos de tipo II que inhiben la fibrogénesis en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar, en el que dichos neumocitos de tipo II se separaron de otras células pulmonares del tejido pulmonar de un sujeto.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad pulmonar que se presenta con fibrosis pulmonar es una enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID).
3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha EPID se selecciona de neumonías intersticiales idiopáticas, enfermedades pulmonares granulomatosas y EPID de causa conocida o asociada a otras entidades clínicas bien definidas.
- 10 4. Uso según la reivindicación 3, en el que dicha EPID se selecciona de fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial aguda, neumonía intersticial inespecífica, bronquitis respiratoria con enfermedad pulmonar intersticial (bronquitis respiratoria/EPID), neumonía intersticial descamativa, neumonía organizada criptogénica, neumonía intersticial linfocitaria, sarcoidosis, EPID asociada a enfermedades del colágeno, causada por polvo inorgánico (neumoconiosis), inducida por fármacos y radioterapia, causada por polvo orgánico (alveolitis alérgica extrínseca), asociada a enfermedades hereditarias, proteinosis alveolar, microlitiasis alveolar, linfangioleiomiomatosis, eosinofilia pulmonares, histiocitosis X (granulomatosis de células de Langerhans) y amiloidosis.
- 15 5. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad pulmonar que se presenta con fibrosis pulmonar es una alteración del sistema inmunitario seleccionada entre artritis reumatoide, edema esclerótico, polimiositis y lupus eritematoso sistémico.
- 20 6. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha composición farmacéutica es una composición farmacéutica destinada para su administración por vía pulmonar, intratraqueal, nasal, intraperitoneal o parenteral.
- 25 7. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha composición farmacéutica se administra en combinación con un fármaco adicional para el tratamiento de enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que dicho fármaco adicional útil en el tratamiento de dichas enfermedades se administra en forma de una composición independiente para su administración de manera simultánea o secuencial a la de la composición farmacéutica que comprende neumocitos de tipo II.
- 30 9. Uso según la reivindicación 1, en el que dichos neumocitos de tipo II son de origen autólogo o heterólogo.
10. Uso según la reivindicación 1, para el tratamiento de enfermedades pulmonares que se presentan con fibrosis pulmonar en un sujeto.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicho sujeto es un ser humano.
- 35 12. Uso según la reivindicación 10, en el que dicho sujeto es un mamífero no humano.
13. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha composición farmacéutica comprende neumocitos de tipo II "wt" y/o neumocitos de tipo II modificados genéticamente para aumentar o favorecer la actividad de inhibición de la fibrogénesis de neumocitos de tipo II de tipo natural ("wt") y/o para aumentar o favorecer la actividad de reepitelización de dichos neumocitos de tipo II "wt".
- 40 14. Método para inhibir *in vitro* la proliferación de fibroblastos o para reepitelizar tejido pulmonar (alveolos) que comprende poner tejido pulmonar en contacto con una composición farmacéutica que comprende neumocitos de tipo II, en el que dichos neumocitos de tipo II se separaron de otras células pulmonares del tejido pulmonar de un sujeto.

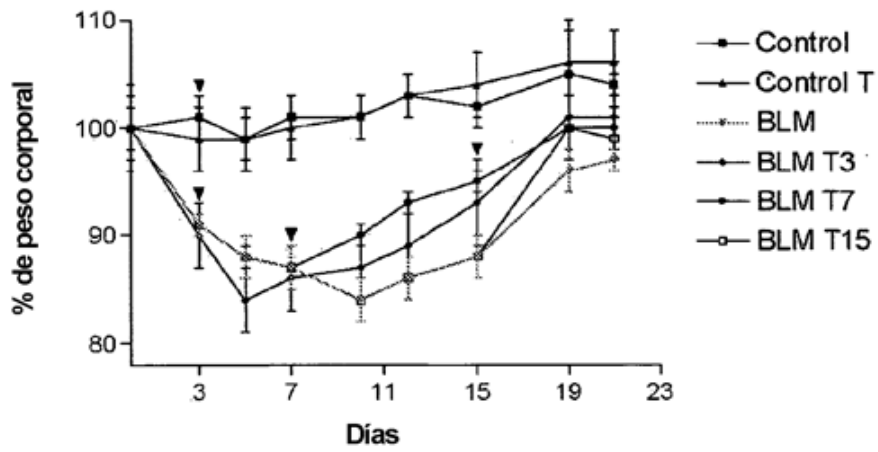


FIGURA 1

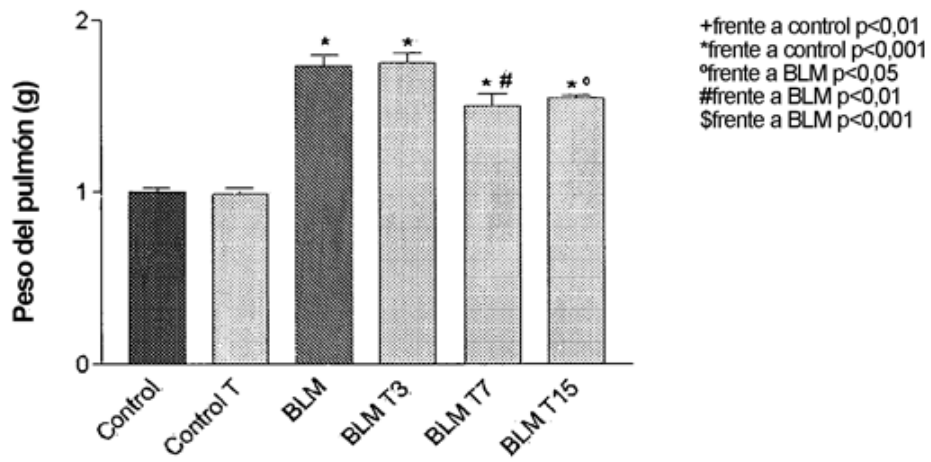


FIGURA 2

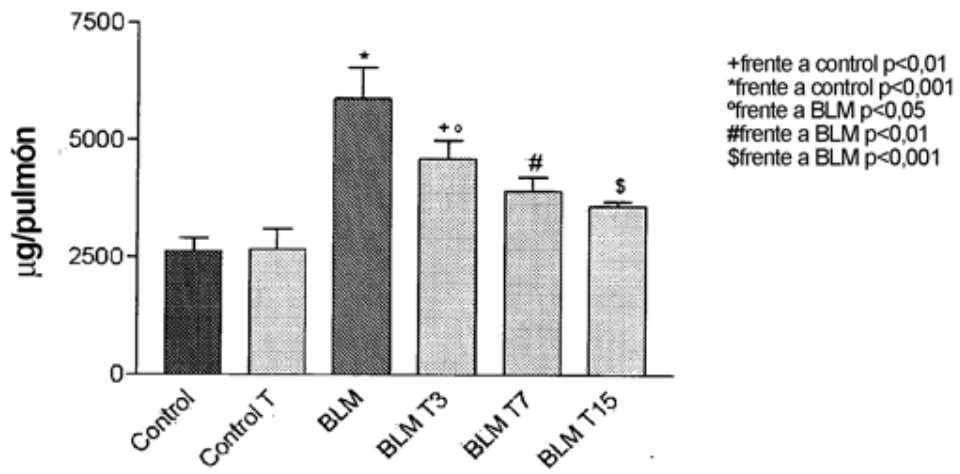


FIGURA 3

Hematoxilina / eosina

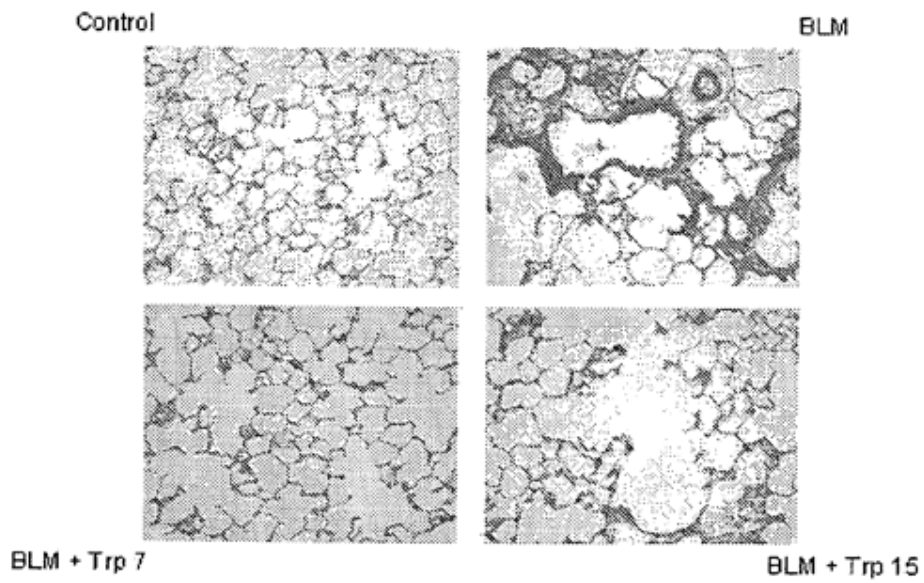


FIGURA 4