

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 229**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 9/50** (2006.01)  
**A61K 9/51** (2006.01)  
**A61K 31/07** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61P 1/18** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2005 E 05819552 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1842557**

54 Título: **Portador de fármacos y kit portador de fármacos para la inhibición de la fibrosis**

30 Prioridad:

**22.12.2004 JP 2004382791**

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

**18.02.2014**

73 Titular/es:

**NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)  
1-1-2 SHIMOHUZUMI  
IBARAKI OSAKA 567-8680, JP**

72 Inventor/es:

**NIITSU, YOSHIRO;  
KATO, JUNJI y  
SATO, YASUSHI**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 443 229 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

Portador de fármacos y kit portador de fármacos para la inhibición de la fibrosis

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una medicina que contiene un portador de fármacos usado en un sistema de administración de fármacos (DDS) para células estrelladas, y a un kit para preparar dicha medicina que comprende un retinoide como componente y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas, que es un fármaco dirigido a una molécula constituyente de la matriz extracelular secretada por células estrelladas, o a una o más moléculas con la función de producir o de secretar una molécula constituyente de la matriz extracelular, según se especifica en la reivindicación anexa 1.

Antecedentes de la técnica

15

La fibrosis hepática está provocada por, aunque no se limita a, la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC) como resultado de, por ejemplo, una enfermedad hepática vírica debida al virus de la hepatitis B o C, una esteatohepatitis no alcohólica, una diabetes relacionada con malnutrición, parásitos, enfermedades infecciosas tales como tuberculosis o sífilis, congestión intrahepática debida a una cardiopatía o a la curación de una herida de una lesión tisular, etc. dentro del hígado que acompaña a una alteración en el paso de la bilis, etc., y un exceso de producción y de secreción de la matriz extracelular (ECM), tal como una pluralidad de tipos de moléculas de colágeno y de fibronectina depositándose en el tejido intersticial. La etapa final de la fibrosis hepática es la cirrosis hepática, y dado que provoca fallo hepático, carcinoma hepatocelular, etc., con objeto de evitarlos y/o de inhibir el progreso de los mismos, existe un deseo de desarrollar un portador de fármacos y un kit portador de fármacos para inhibir al menos la fibrosis hepática.

Adicionalmente en el páncreas se desarrolla una pancreatitis crónica como resultado de la fibrosis pancreática por el mismo mecanismo que el de la fibrosis hepática (Madro A y col., *Med Sci Monit.*, julio de 2004; 10 (7): RA166-70; Jaster R, *Mol Cancer*, 6 de octubre de 2004; 3 (1): 26). Sin embargo, todavía no se han encontrado medios eficaces para inhibir el progreso de la fibrosis pancreática o de la pancreatitis crónica.

Como medio eficaz para inhibir la fibrosis hepática o pancreática, existe la posibilidad de que las células estrelladas sean uno de los objetivos candidatos importantes (Fallowfield J A, Iredale J P, *Expert Opin Ther Targets*, octubre de 2004; 8 (5): 423 - 35; Pinzani M, Rombouts K. *Dig Liver Dis.*, abril de 2004; 36 (4): 231 - 42). En el proceso de la fibrosis, las células estrelladas son activadas por las citocinas de las células de Kupffer o células infiltrantes, y transformadas en células activadas, y existe una notable producción de matriz extracelular (ECM). Las células estrelladas se conocen como las células de almacenamiento de la vitamina A, y pertenecen a la familia de los miofibroblastos. Por otro lado, las células estrelladas producen metaloproteinasa de la matriz (MMP), su factor inhibidor (TIMP), una citocina tal como TGF- $\beta$  o PDGF, y un factor de crecimiento tal como HGF, y pueden jugar un papel importante en la fibrosis hepática. Las células estrelladas activadas aumentan la capacidad contráctil y están implicadas en la regulación del flujo sanguíneo, y adicionalmente, aumentan la expresión de varios tipos de receptores de citocinas y se vuelven muy sensibles a las citocinas.

Con respecto a los procedimientos terapéuticos de la fibrosis que se han intentado hasta la fecha actual, pueden citarse el control del metabolismo del colágeno, la promoción del sistema de degradación del colágeno, la inhibición de la activación de las células estrelladas, etc. Incluyen la inhibición del TGF $\beta$  (conocido como un factor para la activación de las células estrelladas y la promoción de la producción de matriz extracelular (ECM)) usando un receptor truncado de tipo II del TGF $\beta$  (Qi Z y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2 de marzo de 1999; 96 (5): 2345 - 9), un receptor soluble de tipo II del TGF $\beta$  (George J y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 26 de octubre de 1999; 96 (22): 12719 - 24), HGF (traducción japonesa publicada 5-503076 de una solicitud PCX; Ueki K y col., *Nat Med.*, febrero de 1999 Feb; 5 (2): 226 - 30), etc., La promoción de la producción de metaloproteinasa de la matriz (MMP) mediante un vector que contiene el gen de HGF o de MMP (Iimuro Y y col., *Gastroenterology* 2003; 124: 445 - 458), la inhibición del TIMP, que es un inhibidor de la MMP, mediante un ARN antisentido, etc. (Liu W B y col., *World J Gastroenterol.*, febrero de 2003; 9 (2): 316 - 9), el control de la activación de las células estrelladas mediante un ligando de PPAR $\gamma$  (Marra F y col., *Gastroenterology*, agosto de 2000; 119 (2): 466 - 78) o un antagonista del receptor de la angiotensina-II de tipo I (Yoshiji H y col., *Hepatology*, octubre de 2001; 34 (4 Pt 1): 745 - 50), la inhibición del crecimiento de las células estrelladas mediante la inhibición de la acción del PDGF mediante un inhibidor de la cinasa de tirosina del PDGF, etc. (Liu X J y col., *World J Gastroenterol.*, agosto de 2002; 8 (4): 739 - 45) y la inhibición del canal de sodio mediante amilorida (Benedetti A y col., *Gastroenterology*, febrero de 2001; 120 (2): 545 - 56), etc., y la inducción de apoptosis en las células estrelladas mediante el Compuesto 861 (Wang L, y col., *World J Gastroenterol.*, 1 de octubre de 2004; 10 (9): 2831 - 2835), gliotoxina (Orr J G y col., *Hepatology*, julio de 2004; 40 (1): 232 - 42), etc. Sin embargo, en todos los casos, dado que la especificidad de acción y/o la especificidad de órgano son bajas, existen problemas con los efectos y con los efectos secundarios.

Con respecto a la síntesis proteica de colágeno, existen muchos puntos sin clarificar con respecto a la vía metabólica, y un procedimiento terapéutico que use un fármaco que inhiba esto no ha sido establecido como un

procedimiento terapéutico que sea eficaz y seguro con respecto a un cuerpo vivo en términos de efectos secundarios. Esto es, en un procedimiento dirigido a las moléculas implicadas en la producción de colágeno, la especificidad por el objetivo no puede mejorarse debido a la diversidad de la función de las moléculas, y la posibilidad de provocar efectos secundarios es alta. Si el colágeno, que es el producto final, pudiera ser inhibido  
5 directamente, esto sería razonable como procedimiento terapéutico común para procesos de fibrosis, y con objeto de hacer esto sería necesario controlar todos los diversos tipos de colágeno representados por los Tipos I a IV al mismo tiempo.

Como un medio eficaz para controlar simultáneamente la síntesis de los diversos tipos de moléculas de colágeno sin  
10 perder la especificidad por el colágeno, puede considerarse un procedimiento para controlar la función de la HSP47. La HSP47 es una chaperona molecular específica de colágeno que es esencial para el transporte intracelular y la maduración molecular, que son comunes a los procesos sintéticos de los diversos tipos de colágeno. Por lo tanto, si puede controlarse específicamente la función de la HSP47 en las células estrelladas, existe una posibilidad de inhibir la fibrosis hepática, pero no hay informes de que se haya intentado dicho procedimiento terapéutico.

15 Los presentes inventores prepararon una ribozima que controla específicamente la función de la HSP47 en un sistema celular, y demostraron que la producción y la secreción de los colágenos puede ser controlada por la ribozima al mismo tiempo (Sasaki H, y col. *Journal of Immunology*, 2002, 168: 5178 - 83; Hagiwara S, y col. *J Gene Med.* 2003, 5: 784 - 94). Con objeto de controlar específicamente la síntesis de la HSP47, puede emplearse un  
20 ARNic, que es más fácil de optimizar que la ribozima. El ARNic (ARN interferente corto) usado en la presente memoria descriptiva es un término general para el ARN bicatenario usado en el ARNi (RNA interferente). El ARNi es un fenómeno en el que el ARN bicatenario (ARN bicatenario; ARNbc), que está formado a partir de ARN sentido y ARN antisentido, y es homólogo de un gen dado, destruye un segmento homólogo de un transcrito (ARNm) del gen. Originalmente fue mostrado en un experimento que usa un nematodo (Fire A, y col: *Nature* (1998) 391: 806 - 811), y  
25 se ha demostrado que en las células de mamífero hay presente un mecanismo de inducción similar (Ui-Tei K, y col: *FEBS Lett* (2000) 479: 79 - 82). Adicionalmente, Elbashir y col. han demostrado que un ARNbc corto con una longitud del orden de 21 a 23 pb puede inducir un ARNi en un sistema celular de mamífero sin mostrar citotoxicidad (Elbashir S M, y col: *Nature* (2001) 411: 494 - 498). Sin embargo, con objeto de que los efectos de estas moléculas se muestren de forma eficaz, es necesario emplear un procedimiento que sea específico para el órgano objetivo. La  
30 *Publicación Patente 2* describe un conjugado de administración de un fármaco de unión a un receptor de vitamina, y preparaciones para el mismo. El conjugado de administración del fármaco consiste en una fracción de unión al receptor de vitamina, un conector bivalente (L) y un fármaco. La fracción de unión al receptor de vitamina es una vitamina o un análogo de unión al receptor de vitamina o un derivado del mismo, y el fármaco incluye análogos o derivados del mismo. La fracción de unión al receptor de vitamina está unida covalentemente al conector bivalente, y  
35 el fármaco, o el análogo o el derivado del mismo, está unido covalentemente al conector bivalente, en el que el conector bivalente (L) comprende uno o más conectores separadores, conectores liberables y conectores de heteroátomo. También se describen procedimientos y composiciones farmacéuticas para eliminar poblaciones celulares patógenas usando el conjugado de administración del fármaco. La *Publicación Patente 3* se refiere a procedimientos para tratar enfermedades hepáticas en un sujeto que implican la administración de un inductor de la  
40 apoptosis que es capaz de inducir selectivamente la apoptosis en las células estrelladas hepáticas en un sujeto, o un agente que es capaz de dar lugar a dicho inductor en el sujeto. Además, la desvelación proporciona procedimientos para tratar la fibrosis hepática en un sujeto que comprenden la administración selectiva de un inductor de la apoptosis específicamente a las células estrelladas hepáticas del sujeto, o de un agente que sea capaz de dar lugar a un inductor de la apoptosis en las células estrelladas hepáticas.

45 [Publicación Patente 1] traducción japonesa 5-503076 de una solicitud PCT

[Publicación Patente 2] documento WO 2004/069159 A2

50 [Publicación Patente 3] documento WO 2004/019921 A2

[Publicación no Patente 1] Madro A y col., *Med Sci Monit.*, julio de 2004; 10 (7): RA166-70

[Publicación no Patente 2] Jaster R, *Mol Cancer.*, octubre de 2004 06; 3 (1): 26

55 [Publicación no Patente 3] Fallowfield J A, Iredale J P, *Expert Opin Ther Targets*, octubre de 2004; 8 (5): 423 - 35

[Publicación no Patente 4] Pinzani M, Rombouts K. *Dig Liver Dis.*, abril de 2004; 36 (4): 231 - 42

60 [Publicación no Patente 5] Qi Z y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2 de marzo de 1999; 96 (5): 2345 - 9

[Publicación no Patente 6] George J y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 26 de octubre de 1999; 96 (22): 12719 - 24

[Publicación no Patente 7] Ueki K y col., *Nat Med.*, febrero de 1999; 5 (2): 226 - 30

65 [Publicación no Patente 8] Iimuro Y y col., *Gastroenterology* 2003; 124: 445 - 458

[Publicación no Patente 9] Liu W B y col., World J Gastroenterol., febrero de 2003; 9 (2): 316 - 9

[Publicación no Patente 10] Marra F y col., Gastroenterology, agosto de 2000; 119 (2): 466 - 78

5 [Publicación no Patente 11] Yoshiji H y col., Hepatology, octubre de 2001; 34 (4 Pt 1): 745 - 50

[Publicación no Patente 12] Liu X J y col., World J Gastroenterol., agosto de 2002; 8 (4): 739 - 45

[Publicación no Patente 13] Beneaetti A y col., Gastroenterology, febrero de 2001; 120 (2): 545 - 56

10

[Publicación no Patente 14] Wang L y col., World J Gastroenterol., 1 de octubre de 2004; 10 (19): 2831 - 2835

[Publicación no Patente 15] Orr J G y col., Hepatology. 2004 Jul; 40 (1): 232 - 42

15 [Publicación no Patente 16] Sasaki H y col., Journal of Immunology, 2002, 168: 5178 - 83

[Publicación no Patente 17] Hagiwara S y col., J Gene Med., 2003, 5: 784 - 94

[Publicación no Patente 18] Fire A y col.: Nature (1998) 391: 806 - 811

20

[Publicación no Patente 19] Ui-Tei K y col.: FEBS Lett (2000) 479: 79 - 82

[Publicación no Patente 20] Elbashir S M y col.: Nature (2001) 411: 494 - 498

25 [Publicación no Patente 21] Yasuhiko Tabata, New Developments in Drug Delivery System DDS Technology and their Application - Cutting-edge technology for biomedical research and advanced medical treatment. Medical Do, ISBN: 4944157932, 2003

[Publicación no Patente 22] Mitsuru Hashida, Drug Delivery Systems - New challenges for drug discovery and therapy, New Bioscience Series, Kagaku-dojin, ISBN: 4759803858, 1995

30

Desvelación de la invención

Problemas que debe resolver la invención

35

Con objeto de dirigirse a un tejido y/o a un órgano, la aplicación de un sistema de administración de fármacos (DDS) es un medio eficaz (Yasuhiko Tabata, New Developments in Drug Delivery System DDS Technology and their Application - Cutting-edge technology for biomedical research and advanced medical treatment, Medical Do, ISBN: 4 944157932, 2003; Mitsuru Hashida, Drug Delivery Systems - New challenges for drug discovery and therapy, New Bioscience Series, Kagaku-dojin, ISBN: 4759803858, 1995). Como portadores de fármacos usados en el sistema de administración de fármacos (DDS) están aquellos en los que se aplica una micela polimérica, un liposoma, una microemulsión, etc., Como técnica para mejorar la especificidad de estos portadores frente a un órgano objetivo, existe una técnica conocida en la que se mezcla o se une un anticuerpo y/o un ligando para un antígeno o receptor específico de un órgano y/o de un tejido, al portador, y una técnica en la que se utilizan las propiedades físicoquímicas del portador, pero no se conoce ninguna técnica para el caso en particular de dirigirse a las células estrelladas.

40

45

Medios para resolver los problemas

50 La presente invención se refiere a una medicina que contiene un portador de un fármaco y a un kit de preparación para la medicina, según se especifica en las reivindicaciones anexas, que permiten transportar específicamente un fármaco terapéutico a las células estrelladas. El portador de fármacos en la presente invención puede ser cualquier forma de una micela polimérica, un liposoma, una emulsión, una microesfera y una nanoesfera, y mediante la unión a la misma o la inclusión en la misma de vitamina A (VA), un retinoide tal como, por ejemplo, tretinoína, adapaleno o palmitato de retinol o Fenretinida (4-HPR), un fármaco terapéutico puede ser transportado específicamente a las células estrelladas hepáticas. Adicionalmente, mediante el uso del portador de fármacos que encierra en el mismo una ribozima, puede inhibirse simultáneamente un ARN antisentido, o un ARN que inhiba específicamente la HSP47, que es una chaperona molecular específica de colágeno, o el TIMP, que es un inhibidor de la MMP, puede inhibirse simultáneamente la secreción de los colágenos de tipo I a IV, y como resultado puede inhibirse de forma eficaz la fibrogénesis.

55

60

Por lo tanto, la presente invención se refiere a la medicina y al kit de preparación de la medicina según se especifica en las reivindicaciones anexas.

65 Adicionalmente se describe en este documento un portador de fármacos específico para las células estrelladas con un retinoide como componente.

Adicionalmente se describe en este documento el portador de fármacos en el que el retinoide incluye vitamina A.

Además, en este documento se desvela el portador de fármaco en el que el retinoide está contenido a entre el 0,2 y el 20% en peso.

5

Adicionalmente se describe en este documento el portador de fármacos en el que es uno cualquiera de una forma de una micela polimérica, un liposoma, una emulsión, una microesfera y una nanoesfera.

Además, la presente invención se refiere a una medicina para tratar una alteración relacionada con las células estrelladas, incluyendo la medicina el portador de fármacos y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas, según se especifica en las reivindicaciones anexas.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a la medicina en la que la alteración se elige de entre el grupo formado por hepatitis, fibrosis hepática, cirrosis hepática, pancreatitis, fibrosis pancreática, fibrosis de las cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea.

Además, la presente invención se refiere a la medicina en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas se elige de entre el grupo que consiste en un inhibidor de la producción del TIMP según se especifica en las reivindicaciones anexas, y un ARNic, una ribozima, un ácido nucleico antisentido o un polinucleótido quimérico de ADN/ARN, o un vector que expresa los mismos, que se dirige a una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por las células estrelladas o a una o más moléculas con la función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a la medicina en la que la molécula con la función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular es la HSP47.

Además, la presente invención se refiere a la medicina en la que el fármaco y el portador de fármacos se mezclan en un sitio de tratamiento médico o en las proximidades del mismo.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un kit de preparación de la medicina según se especifica en las reivindicaciones anexas, incluyendo el kit uno o más en recipientes que contienen uno o más del fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas, un constituyente portador de fármacos y un retinoide.

Además, en este documento se desvela un procedimiento para tratar una alteración relacionada con las células estrelladas, incluyendo el procedimiento la administración de una cantidad eficaz de la medicina a un sujeto en necesidad de la misma.

Adicionalmente se describe en este documento el procedimiento en el que el trastorno se elige de entre el grupo formado por hepatitis, fibrosis hepática, cirrosis hepática, cáncer de hígado, pancreatitis, fibrosis pancreática, cáncer de páncreas, fibrosis de las cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea.

Además, en este documento se desvela el procedimiento en el que la medicina se administra por vía parenteral.

Adicionalmente se describe en este documento el uso del portador de fármacos en la producción de una medicina para el tratamiento de un trastorno relacionado con las células estrelladas.

Además, en este documento se desvela un procedimiento de administración de un fármaco para las células estrelladas que utiliza el portador de fármacos.

50

Adicionalmente, la presente invención también se refiere a una medicina según se especifica en las reivindicaciones anexas, que comprende un portador de un fármaco para inhibir la fibrosis, que incluye un retinoide como componente y transporta un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas específicamente hasta las células estrelladas, la medicina según se especifica en las reivindicaciones anexas, que

comprende un portador de fármacos para inhibir la fibrosis, en el que el retinoide incluye la vitamina A, la medicina según se especifica en las reivindicaciones anexas, que comprende un portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que el retinoide está contenido entre el 0,2% y el 20%, la medicina según se especifica en las reivindicaciones anexas, que comprende un portador de fármacos para inhibir la fibrosis, en el que es una cualquiera de una forma de micela polimérica, un liposoma, una emulsión, una microesfera y una nanoesfera, la medicina según se

especifica en las reivindicaciones anexas, que comprende un portador de fármacos para inhibir la fibrosis, en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas incluye uno o más fármacos elegidos de entre un inhibidor de la producción del TIMP según se especifica en las reivindicaciones anexas, la medicina según se especifica en las reivindicaciones anexas, que comprende un portador de fármacos para inhibir la fibrosis, en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas incluye un ARNic, una

ribozima o un ARN antisentido, o un vector que expresa los mismos, que se dirige a una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por las células estrelladas, o que se dirige a una o más moléculas con la función de

producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular, y la medicina según se especifica en las reivindicaciones anexas, que comprende un portador de fármacos para inhibir la fibrosis, en la que la molécula con la función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular es la HSP47.

- 5 Además, la presente invención se refiere a un kit de preparación de la medicina de la presente invención para inhibir la fibrosis que incluye uno o más recipientes que contienen uno o más de un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas, un constituyente portador de fármacos y un retinoide, el kit de preparación de la medicina de la presente invención para inhibir la fibrosis en el que el retinoide incluye la vitamina A, el kit de preparación de la medicina de la presente invención para inhibir la fibrosis en el que el retinoide está contenido entre  
 10 el 0,2% y el 20%, el kit de preparación de la medicina de la presente invención para inhibir la fibrosis en el que es una cualquiera de una forma de micela polimérica, un liposoma, una emulsión, una microesfera y una nanoesfera, el kit de preparación de la medicina de la presente invención para inhibir la fibrosis en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas incluye uno o más fármacos elegidos de entre un inhibidor de la producción del TIMP según se especifica en las reivindicaciones anexas, el kit de preparación de la medicina de la presente invención para inhibir la fibrosis en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas incluye un ARNic, una ribozima o un ARN antisentido, o un vector que expresa los mismos, que se dirige a una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por las células estrelladas, o que se dirige a una o más moléculas con la función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular, y el kit de preparación de la medicina de la presente invención para inhibir la fibrosis en el que la molécula con la  
 15 función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular es la HSP47.  
 20

#### Efectos de la invención

- Mediante el uso de la medicina y del kit de preparación de la medicina de la invención que contiene el portador de fármacos que permite que un fármaco terapéutico sea transportado específicamente hasta las células estrelladas  
 25 como medio eficaz para prevenir, suprimir o mejorar la fibrosis y/o diversos tipos de alteraciones relacionadas con la fibrosis, pueden proporcionarse innovadores efectos terapéuticos tales como los mostrados por los Ejemplos. Esto es, dado que la medicina y el kit de preparación de la medicina de la presente invención se dirigen específicamente a las células estrelladas, pueden inhibirse eficaz y eficientemente los estados clínicos que se desarrollan  
 30 principalmente debido a las células estrelladas, tales como, por ejemplo, la fibrosis, y minimizando los efectos secundarios.

#### Breve descripción de los dibujos

- 35 [FIG. 1] Un diagrama que muestra un protocolo con respecto a la evaluación del efecto del gp46-ARNic *in vitro* usando células NRK, y la determinación de la secuencia óptima, la cronología y la concentración.

[FIG. 2] Un diagrama fotográfico que muestra el resultado de la inmunotransferencia western de la gp46 y de actina (cultivo de 24 h, examen de la secuencia óptima).

- 40 [FIG. 3] Un diagrama fotográfico que muestra el resultado de la inmunotransferencia western de la gp46 y de actina (cultivo de 24 h, examen de la secuencia óptima).

- [FIG. 4] Un diagrama fotográfico que muestra el resultado de la inmunotransferencia western de la gp46 y de actina  
 45 (concentración 50 nM, examen del tiempo de cultivo óptimo).

[FIG. 5] Un diagrama que muestra un protocolo para la evaluación de la inhibición de la expresión del colágeno por parte del gp46-ARNic en células NRK.

- 50 [FIG. 6] Un gráfico que muestra la inhibición de la síntesis de colágeno por parte del ARNic.

[FIG. 7] Un diagrama fotográfico que muestra la transfección específica de HSC del ARNic.

[FIG. 8] Un diagrama fotográfico para evaluar el porcentaje de transfección específica de HSC del ARNic.

- 55 [FIG. 9] Un diagrama fotográfico para la evaluación de la inhibición de la expresión de la gp46 por parte del ARNic.

[FIG. 10] Un diagrama fotográfico que muestra la tinción con azán de hígado de rata a la que se le ha administrado DMN.

- 60 [FIG. 11] Un diagrama que muestra un protocolo de tratamiento de rata LC.

[FIG. 12] Un diagrama fotográfico que muestra la tinción con azán de hígado de rata LC a la que se le ha administrado VA-Lip-gp46ARNic.

- 65 [FIG. 13] Un diagrama que muestra un procedimiento para la extracción de una porción teñida mediante una imagen

NTH (tomándose aleatoriamente 6 posiciones de la imagen teñida con azán).

[FIG. 14] Un gráfico que muestra la proporción superficial ocupada por porciones fibróticas en una histología hepática (proporción de colágeno por área, %).

5

[FIG. 15] Un gráfico que muestra la cantidad de hidroxiprolina en tejido hepático.

[FIG. 16] Un gráfico que muestra una curva de supervivencia para cirrosis hepática de rata a la que se le ha administrado por vía intraportal VA-Lip-gp46ARNic.

10

[FIG. 17] Un diagrama fotográfico que muestra la tinción con azán de tejido hepático de cirrosis hepática de rata a la que se le ha administrado por vía intraportal VA-Lip-gp46ARNic.

[FIG. 18] Un gráfico que muestra una curva de supervivencia para cirrosis hepática de rata a la que se le ha administrado por vía intraportal VA-Lip-gp46ARNic.

15

[FIG. 19] Un diagrama fotográfico que muestra la tinción con azán de tejido hepático de cirrosis hepática de rata a la que se le ha administrado por vía intraportal VA-Lip-gp46ARNic.

[0019]

20

[FIG. 20] Un gráfico que muestra una curva de supervivencia para cirrosis hepática de rata a la que se le ha administrado por vía intravenosa VA-Lip-gp46ARNic.

[FIG. 21] Un gráfico que muestra una curva de supervivencia para cirrosis hepática de rata a la que se le ha administrado por vía intravenosa VA-Lip-gp46ARNic.

25

[FIG. 22] Un diagrama fotográfico que muestra la tinción con azán de tejido hepático de cirrosis hepática de rata a la que se le ha administrado por vía intravenosa VA-Lip-gp46ARNic.

[FIG. 23] Un diagrama que muestra una mejora en la eficacia de transfección de VA-Lip-gp46ARNic por parte de la RBP.

30

[FIG. 24] Un diagrama que muestra la inhibición de la transfección de VA-Lip-gp4 6ARNic por parte del anticuerpo anti-RBP.

35

Mejor modo de llevar a cabo la invención

El retinoide de la presente invención incluye vitamina A así como un retinoide en un estado en el que está disuelto o mezclado con un medio que pueda disolverlo o retenerlo.

40

En la presente invención puede usarse cualquier retinoide siempre que se acumule de forma activa en las células estrelladas; algunos ejemplos de retinoides incluyen, pero no se limitan a, tretinoína, adapaleno, palmitato de retinol, y en particular la vitamina A (ácido retinoico) y Fenretinida (4-HPR). La presente invención utiliza la propiedad de las células estrelladas para incorporar positivamente un retinoide, y mediante el uso del retinoide como un portador de fármacos o mediante su unión o su inclusión en otro componente portador de fármacos, se transporta específicamente el fármaco según las reivindicaciones a las células estrelladas.

45

El portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención puede contener por tanto un componente portador de fármacos distinto al retinoide. Dicho componente no está limitado particularmente, y puede usarse cualquier componente conocido en los campos de la medicina y la farmacia, pero es preferible que sea capaz de incluir el retinoide o de unirse al mismo. Algunos ejemplos de dichos componentes incluyen un lípido, por ejemplo, un fosfolípido tal como un glicerofosfolípido, un esfingolípido tal como esfingomielina, un esteroide tal como colesterol, un aceite vegetal tal como aceite de semilla de soja o aceite de semilla de amapola, aceite mineral y una lecitina tal como lecitina de yema de huevo, pero los ejemplos no están limitados a los mismos. De entre ellos, son preferibles aquellos que pueden formar un liposomas, por ejemplo, fosfolípidos naturales tales como lecitina, fosfolípidos semisintéticos tales como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), y colesterol.

55

Adicionalmente, el portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención puede contener una sustancia que mejore su incorporación en las células estrelladas, por ejemplo, proteína de unión al retinol (RBP).

60

La unión o la inclusión del retinoide en el portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención también puede llevarse a cabo uniendo o incluyendo el retinoide con otro componente del portador de fármacos mediante procedimientos químicos y/o físicos. Alternativamente, la unión o la inclusión del retinoide en el portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención también puede llevarse a cabo mezclando el retinoide con afinidad de formación y componentes básicos del portador de fármacos, en los componentes del portador de

65

fármacos durante la preparación del portador de fármacos. La cantidad de retinoide unido o incluido en el portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención puede ser del 0,01% al 100% como una proporción ponderal relativa a los componentes del portador de fármacos, preferiblemente del 0,2% al 20%, y más preferiblemente del 1% al 5%.

5

El portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención puede estar en cualquier forma, siempre que el fármaco según las reivindicaciones pueda ser transportado a las células estrelladas objetivo, y algunos ejemplos de formas incluyen, pero no se limitan a, micela polimérica, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera. Adicionalmente, el portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención puede incluir en su interior el fármaco que se va a transportar, estar unido al exterior del fármaco que se va a transportar o estar mezclado con el fármaco que se va a transportar, siempre que el retinoide incluido en el mismo esté al menos parcialmente expuesto en el exterior de la preparación antes de que alcance finalmente las células estrelladas.

El portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención se dirige especialmente a las células estrelladas y permite un efecto deseado, tal como, por ejemplo, que se muestre el máximo efecto de la inhibición o la prevención de la fibrosis y unos mínimos efectos secundarios mediante un transporte eficiente a las células estrelladas de un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas, según se especifica en las reivindicaciones anexas.

Por lo tanto, en la presente invención, el "fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas" puede ser cualquier fármaco que inhiba directa o indirectamente las acciones fisicoquímicas de las células estrelladas implicadas en la promoción de la fibrosis, según se especifica en las reivindicaciones anexas, incluyendo inhibidores de la producción del TIMP, que son ácidos nucleicos TIMP antisentido.

Otros ejemplos del "fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas" puede incluir un fármaco para controlar el metabolismo de una matriz extracelular, tal como colágeno, por ejemplo, una sustancia con un efecto en la inhibición de la expresión de una molécula objetivo, tal como ARN<sub>Nic</sub>, ribozima ácidos nucleicos antisentido (incluyendo ARN, ADN, APN y una combinación de los mismos), y vectores que expresan los mismos, que se dirigen a una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por las células estrelladas, o se dirigen a una o más moléculas que tienen la función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular.

El ARN<sub>Nic</sub> es un ARN bicatenario con una secuencia específica para una molécula objetivo tal como un ARN<sub>m</sub>, y promueve la degradación de la molécula objetivo, inhibiendo así la expresión de un material así formado, tal como, por ejemplo, una proteína (ARN interferente). Dado que el principio fue publicado por Fire y col. (Nature, 391: 806 - 811, 1998), se ha llevado a cabo una amplia investigación en la optimización del ARN<sub>Nic</sub>, y una persona experta en la materia está familiarizada con dichas técnicas. Adicionalmente, se han investigado ampliamente materiales distintos al ARN<sub>Nic</sub> que puedan provocar interferencia en el ARN u otra reacción de inhibición de la expresión génica, y actualmente existe una gran cantidad de dichos materiales.

40

Por ejemplo, el documento JP, A, 2003-219893 describe un polinucleótido bicatenario formado a partir de ARN y ADN que inhibe la expresión de un gen objetivo. Este polinucleótido puede ser un híbrido de ADN/ARN en el que una de las dos hebras es ADN y la otra es ARN, o una quimera de ADN/ARN en la que una porción de la misma hebra es ADN y la otra porción es ARN. Dicho polinucleótido está formado preferiblemente a partir de entre 19 y 25 nucleótidos, más preferiblemente de 19 a 23 nucleótidos, y aún más preferiblemente de 19 a 21 nucleótidos; en el caso de un híbrido de ADN/ARN, es preferible que la hebra sentido sea ADN y la hebra antisentido sea ARN, y en el caso de la quimera de ADN/ARN, es preferible que una porción del lado secuencia arriba del polinucleótido bicatenario sea ARN. Dicho polinucleótido puede prepararse de forma que tenga cualquier secuencia según un procedimiento sintético químico conocido *per se*.

50

Con respecto a la molécula objetivo, por ejemplo, es preferible una molécula que pueda inhibir conjuntamente la secreción de todas las moléculas constituyentes de la matriz extracelular, y algunos ejemplos de dicha molécula incluyen, pero no se limitan a, la HSP47. La HSP47, o una secuencia génica homóloga de la misma se desvela como, por ejemplo, el número de acceso del GenBank AB010273 (humana), X60676 (de ratón) o M69246 (de rata, gp46).

55

Algunos ejemplos preferidos del material que es transportado por el portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención incluyen un ARN<sub>Nic</sub>, un polinucleótido híbrido o quimérico de ADN/ARN, y un ácido nucleico antisentido, que se dirige a la HSP47.

60

El fármaco que es suministrado por el portador de fármacos contenido en la medicina de la presente invención, según se especifica en las reivindicaciones anexas, puede estar marcado o no. El marcaje es útil a nivel de investigación y de ensayo, en particular dado que puede controlarse la viabilidad del transporte o un aumento o disminución en las células estrelladas. Un marcaje puede elegirse de entre aquellos conocidos por una persona experta en la materia; por ejemplo, un isótopo radiactivo, un material que puede unirse a un material que puede marcarse (por ejemplo, un anticuerpo), un material fluorescente, un fluoróforo, un material quimioluminiscente y una

65

enzima.

La presente invención también se refiere a una medicina para tratar una alteración relacionada con las células estrelladas según se especifica en la reivindicación anexa 5. La alteración relacionada con las células estrelladas aquí mencionada significa fibrosis, hepatitis y pancreatitis, en particular hepatitis crónica, fibrosis hepática, cirrosis hepática, pancreatitis crónica y fibrosis pancreática. Adicionalmente, según recientes informes, dado que las células estrelladas están presentes en las cuerdas vocales (por ejemplo, Fuja T J y col., Cell Tissue Res. 2005; 322 (3): 417 - 24), las alteraciones mencionadas anteriormente incluyen alteraciones de las cuerdas vocales y la laringe tales como fibrosis de las cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea.

10

En la medicina de la presente invención, el portador de fármacos puede incluir un fármaco en su interior, estar unido al exterior de la sustancia que contiene el fármaco o estar mezclado con un fármaco, siempre que el retinoide incluido en el portador de fármacos esté al menos parcialmente expuesto en el exterior de la preparación antes de que alcance finalmente las células estrelladas. Por lo tanto, dependiendo de la vía de administración o de la forma en la que se libere el fármaco, la medicina puede estar recubierta con un material apropiado, tal como, por ejemplo, un material de recubrimiento entérico o un material que se disgregue con el tiempo, o puede estar incorporado en un sistema de liberación de fármacos apropiado.

15

La medicina de la presente invención puede ser administrada a través de diversos tipos de vías incluyendo la vía oral y parenteral; algunos ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, las vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosal, percutánea, intranasal, intraperitoneal, intrapulmonar e intrauterina, y la medicina puede ser preparada en una forma apropiada para cada vía de administración. Dicha forma y procedimiento de preparación puede emplear cualquier forma y procedimiento conocido según sea apropiado (por ejemplo 'Hyoujun Yakuzaijaku1 (Standard Pharmaceuticals), Ed. Y. Watanabe y col., Nankodo, 2003, etc.).

20

Algunos ejemplos de formas adecuadas para su administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, gránulo, comprimido, cápsula, líquido, suspensión, emulsión, gel y jarabe, y algunos ejemplos de formas adecuadas para administración parenteral incluyen inyecciones tales como disolución inyectable, suspensión inyectable, emulsión inyectable e inyección de tipo preparación extemporánea. La formulación para administración parenteral puede estar en forma de una disolución o de una suspensión estéril isotónica, acuosa o no acuosa.

30

La medicina de la presente invención puede proporcionarse en cualquier configuración, pero desde el punto de vista de estabilidad de almacenamiento, es preferible proporcionarla en una configuración que permita su preparación extemporánea, por ejemplo, en una configuración que permita que un médico y/o un farmacéutico, una enfermera u otro auxiliar la prepare en el sitio del tratamiento médico o en las proximidades del mismo. En este caso, la medicina de la presente invención se proporciona como uno o más recipientes que contienen al menos un componente esencial para la misma, y se prepara antes de su uso, por ejemplo, 24 horas, preferiblemente 3 horas, y más preferiblemente inmediatamente antes de su uso. Cuando se lleva a cabo la preparación pueden usarse según sea apropiado un reactivo, un disolvente, un equipo de preparación, etc. que normalmente están disponibles en el sitio de preparación.

35

40

La presente invención incluye por lo tanto un kit de preparación de medicinas que contiene uno o más recipientes que contienen uno o más de un constituyente portador de fármacos, un retinoide y un fármaco. El kit de la presente invención puede contener, además de los descritos anteriormente, una descripción, etc. en la que se describe un procedimiento de preparación o un procedimiento de administración para el portador de fármacos y la medicina de la presente invención. Adicionalmente, el kit de la presente invención puede contener todos los componentes para completar el portador de fármacos o la medicina de la presente invención pero no contiene necesariamente todos los componentes. El kit de la presente invención no necesita por tanto contener un reactivo o un disolvente que normalmente está disponible en el sitio de tratamiento médico, instalación experimental, etc. tal como, por ejemplo, agua estéril, disolución salina o disolución glucosada.

45

50

La medicina de la presente invención puede usarse en un procedimiento para tratar una alteración relacionada con las células estrelladas, incluyendo el procedimiento la administración de una cantidad eficaz de la medicina a un sujeto en necesidad de la misma. La cantidad eficaz referida aquí es una cantidad que suprime la aparición de la alteración objetivo, reduce los síntomas de la misma o evita la progresión de la misma, y preferiblemente es una cantidad que evita la aparición de la alteración objetivo o cura la alteración objetivo. También es preferiblemente una cantidad que no provoca ningún efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Dicha cantidad puede determinarse según sea apropiado mediante un ensayo *in vitro* usando células cultivadas, etc., o mediante un ensayo en un modelo animal tal como un ratón, una rata, un perro o un cerdo, y dichos procedimientos de ensayo son bien conocidos por la persona experta en la materia.

55

60

La dosis de una medicina de la presente invención administrada según se describe en este documento depende del tipo de fármaco usado o del tipo de retinoide, y, por ejemplo, cuando se usa un ARNic para la HSP47 como fármaco, el peso del fármaco es, por ejemplo, de 0,01 a 45 mg/kg/día, preferiblemente de 0,1 a 30 mg/kg/día, más preferiblemente de 1 a 20 mg/kg/día, y lo más preferiblemente de 4 a 6 mg/kg/día. Cuando se usa vitamina A como

65

retinoide, la vitamina A se administra típicamente a una dosis 10 a 20 mg/kg/día. El retinoide contenido en el portador de fármacos y la dosis de fármaco usada en el procedimiento descrito en este documento son ambos conocidos por una persona experta en la materia o son determinados según sea apropiado mediante el ensayo mencionado anteriormente, etc.

5 Una dosis específica de una medicina de la presente invención según se describe en este documento puede ser determinada teniendo en consideración varias condiciones de un sujeto que requiera el tratamiento, por ejemplo, la gravedad de los síntomas, el estado de salud general del sujeto, la edad, el peso, el sexo del sujeto, la dieta, la cronología y la frecuencia de administración, una medicina usada en combinación, la respuesta al tratamiento y el cumplimiento del tratamiento, y puede ser diferente de la dosificación típica mencionada anteriormente.

Con respecto a la vía de administración, existen diversas vías que incluyen tanto la vía oral como la parenteral, tales como, por ejemplo, las vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosal, percutánea, intranasal, intraperitoneal, intrapulmonar e intrauterina.

15 La frecuencia de administración depende de las propiedades de la medicina usada en las condiciones mencionadas anteriormente del sujeto, y puede ser, por ejemplo, de una pluralidad de veces al día (es decir, de 2, 3, 4, 5 o más veces al día), una vez al día, cada pocos días (es decir, cada 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días, etc.), una vez a la semana o una vez cada pocas semanas (es decir, una vez cada 2, 3 ó 4 semanas, etc.).

20 En el procedimiento descrito en este documento, el término "sujeto" significa cualquier individuo vivo, preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero y aún más preferiblemente un individuo humano. El sujeto puede estar sano o afectado por alguna alteración, y en el caso del tratamiento de la alteración prevista, el sujeto típicamente significa un sujeto afectado por la alteración o que está en riesgo de verse afectado.

25 Adicionalmente, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervenciones profilácticas y/o terapéuticas médicamente aceptables con el propósito de curar, revertir temporalmente, prevenir, etc. una alteración. Por ejemplo, cuando la alteración es fibrosis hepática, el término "tratamiento" incluye una intervención médicamente aceptable con diversos fines que incluyen el retraso o la detención de la progresión de la fibrosis, la regresión a la desaparición de las lesiones, la prevención del inicio de la fibrosis o la prevención de su reincidencia.

La medicina de la presente invención también es adecuada para su uso en un procedimiento para administrar un fármaco a las células estrelladas usando el portador de fármacos. Este procedimiento incluye, pero no se limita a, una etapa de sustentar una sustancia que se va a administrar en el portador de fármacos para producir la medicina, y una etapa de administrar o añadir la medicina al portador de fármacos que porta la sustancia que se va a administrar al cuerpo vivo o al medio que contiene las células estrelladas, tal como, por ejemplo, un medio de cultivo. Estas etapas pueden conseguirse según sea apropiado según cualquier procedimiento conocido, el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva, etc. Este procedimiento de administración puede combinarse con otro procedimiento de administración, por ejemplo, otro procedimiento de administración en el que el objetivo es un órgano en el que hay presentes células estrelladas, etc.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden explicar la presente invención.

### 45 Ejemplo de preparación 1 Preparación de ARNic para la gp46

De entre las secuencias óptimas para el reconocimiento del ARNic en la selección de una secuencia de bases de la HSP47, que es una chaperona molecular común para los colágenos (tipos I a IV), se prepararon las Secuencias A y B según un programa de diseño de oligo ARNic de iGENE Therapeutics, Inc. La Secuencia C se prepara mediante una búsqueda en Internet usando el buscador de objetivos de ARNic ([http://www.ambion.com/techlib/misc/ARNic\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/ARNic_finder.html)) de Ambion, Inc. y seleccionando 19 secuencias de bases que se transformarían en un objetivo para la gp46 de rata (homólogo humano de la HSP47, número de acceso del GenBank M69246). Al llevar a cabo el diseño se tuvo cuidado en 1) comenzar en las 75 a 100 bases secuencia abajo del codón de inicio, 2) posicionar el primer dímero AA, y 3) asegurarse de que el contenido en GC era del 30% al 70%. En este ejemplo se prepararon los ARNic con las siguientes secuencias.

A: GUUCCACCAUAAGAUGGUAGACAAC (hebra de ARNic de 25 bases en dirección sentido partiendo de la 757<sup>a</sup> de la secuencia, ID SEC N°:1)

60 B: CCACAAGUUUUAUAUCCAUCUAGC (hebra de ARNic de 25 bases en dirección sentido partiendo de la 1626<sup>a</sup> de la secuencia, ID SEC N°: 2)

C: GAAACCUAGAGGCCGCA (hebra de ARNic de 19 bases en dirección sentido partiendo de la 64<sup>a</sup> de la secuencia, ID SEC N°: 3)

**Ejemplo de Referencia 2 Inhibición de la expresión de la gp46 por parte del ARNic preparado**

Se transfectaron células renales normales de rata (células NRK), que tenían gp46 de rata y eran fibroblastos productores de colágeno, con entre 0,1 nM y 50 nM de ARNic y se cultivaron durante entre 12 y 48 horas (FIG. 1).  
 5 Se comprobó la cantidad de expresión de la gp46 mediante el método de inmunotransferencia western (FIGS. 2 a 4, la banda superior se corresponde con la gp46, la banda inferior se corresponde con un control de actina). Todos los ARNics inhibieron notablemente la expresión de la proteína gp46 en comparación con un vehículo (FIG. 2). En el experimento, a continuación, se usó la Secuencia A de ARNic, que mostró el efecto más potente. La inhibición por parte del ARNic era dependiente de la concentración (FIG. 3); la expresión proteica de la gp46 fue inhibida en  
 10 aproximadamente el 90% por parte del ARNic 50 nM a las 48 horas (FIG. 4).

**Ejemplo de Referencia 3 Inhibición de la síntesis de colágeno por parte del ARNic preparado**

Con objeto de examinar la cantidad de colágeno sintetizada, se añadió <sup>3</sup>H-prolina al sobrenadante de cultivo de  
 15 fibroblastos de rata (células NRK) en las condiciones mencionadas anteriormente (concentración de ARNic 50 nM, tiempo 48 horas), y después de la transfección se examinó la cantidad de <sup>3</sup>H en la proteína secretada (FIG. 5). La cantidad de colágeno sintetizada se calculó a partir de la proporción entre la proteína secretada sobrenadante y la proteína degradada por la colagenasa cuando se cultivaron fibroblastos transfectados con gp46ARNic en presencia de <sup>3</sup>H-prolina según un informe de Peterkofsky y col. (Peterkofsky y col., Biochemistry, 16 de marzo de 1971; 10 (6):  
 20 988 - 94),

[Ecuación 1]

$$\text{Proporción de síntesis de colágeno} = \frac{\text{fracción sensible a la colagenasa} \times 100}{(5,4 \times \text{fracción insensible a la colagenasa} + \text{fracción sensible a la colagenasa})}$$

25 La proporción de síntesis de colágeno en fibroblastos de rata disminuyó en aproximadamente un 40% en comparación con un grupo de Control (FIG. 6).

**Ejemplo de Referencia 4 Transfección específica de ácido nucleico en células estrelladas hepáticas (HSC)**

30 Se preparó una emulsión (VA-Lip-GFP) mezclando el plásmido de expresión de GFP y VA encapsulada en liposomas formada mezclando un 10% de VA y liposomas, y después se administró por vía intraportal a una rata, se recogió el tejido hepático y se fijó. La emulsión se preparó suponiendo que la cantidad de plasma para una rata de 200 g era de aproximadamente 10 ml, y estableciendo las concentraciones de VA y de GFP en la sangre a 10 μM.  
 35 Específicamente, se disolvieron en primer lugar 25 mg de retinol todo trans (VA) en 87 μl de DMSO para proporcionar así una disolución madre 100 mM. Se mezcló 1 μl de esta disolución madre de VA con 10 μl de lipofectamina y se añadieron adicionalmente a la misma 179 μl de PBS, 10 μg de plásmido de expresión de GFP, para dar un total de 200 μl, y la mezcla se agitó vorticialmente durante 3 minutos para dar VA-Lip-GFP. Se abrió el abdomen de una rata SD, y se inyectó lentamente la VA-Lip-GFP en una vena periférica portal. 48 horas después de  
 40 la inyección se recogió el tejido hepático. Dado que en comparación con otras células hepáticas, el filamento intermedio de desmina es expresado específicamente en las células estrelladas hepáticas (HSC), cuando el tejido hepático fijado se tiñó con un anticuerpo anti-desmina marcado con Alexa Fluor 568, y se examinó una imagen de fluorescencia doble con GFP, se confirmó que la GFP era expresada dentro de las células estrelladas hepáticas (HSC) (FIG. 7). Para los controles sin tratar y un grupo al que se administró únicamente el vector del plásmido de  
 45 expresión de GFP, no se observó la expresión de las células estrelladas hepáticas de rata, pero en un grupo al que se le administró VA-Lip-GFP, se observó específicamente la expresión de GFP en las células estrelladas.

**Ejemplo 5 Análisis cuantitativo de la tasa de transfección de ácido nucleico**

50 De la misma forma que en el Ejemplo 4, excepto porque se usó gp46ARNic marcado con FITC en lugar del plásmido de expresión de GFP, se preparó una emulsión (VA-Lip-gp46ARNic (FITC)) que contiene liposomas de VA encapsulada y gp46ARNic marcado con FITC, y se administró por vía intraportal a una rata SD (10 μg como la cantidad de ARNic/200 μl). 48 horas después de la administración, se recogió el tejido hepático, se tiñó la αSMA (actina del músculo liso), que en comparación con otras células hepáticas es expresada específicamente en las  
 55 HSC, con un anticuerpo anti-αSMA marcado con Alexa Fluor 568, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI, y se examinó una imagen de fluorescencia mediante microscopía de barrido de láser confocal (LSM). Según se muestra en el lado izquierdo de la FIG. 8, en un grupo al que se le administró VA-Lip-gp46ARNic (FITC) se observó un gran número de células emitiendo tanto fluorescencia verde debido a FITC como fluorescencia roja debido a Alexa Fluor 568, y cuando se llevó a cabo un análisis cuantitativo mediante una imagen por NIH (se contó el número de células seleccionando 10 campos cualquiera de una fotografía de microscopía de fluorescencia x 1.000), la eficacia de transfección era del 77,6% (promedio de 10 campos). Por otro lado, en un grupo al que se le administró Lip-gp46ARNic (FITC) que no contenía VA, la eficacia de transfección era un valor bajo del 14,0% y además, se observó una transfección del 3,0% en células distintas a las células estrelladas (lado derecho de la FIG. 8). A partir de los resultados anteriores se ha averiguado que la eficacia de transfección en células estrelladas aumenta notablemente  
 65 mediante la inclusión de la VA.

**Ejemplo 6 Inhibición de la expresión de la gp46 por parte del VA-Lip-gp46ARNic**

Con respecto a otra sección del tejido recogido en el Ejemplo 5, la gp46 se tiñó con anticuerpo anti-HSP47 marcado con Alexa Fluor 568 y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI, y se examinó una imagen de fluorescencia mediante microscopía de barrido de láser confocal. Según se muestra en la FIG. 9, se observó que en un grupo al que se le había administrado VA-Lip-gp46ARNic, la expresión de la gp46, que puede observarse como una fluorescencia roja (lado derecho de la figura) estaba notablemente reducida en comparación con un grupo de control al que se le administró VA-Lip-ARNic aleatorio, que contenía un ARNic aleatorio, que no era específico para la gp46 (lado izquierdo de la figura). La tasa de inhibición de la expresión con respecto a un promedio de 6 campos del grupo de control era del 75%, lo que era extremadamente alto, cuando se examinó el número de células negativas para la gp46 seleccionando 10 campos cualquiera de una fotografía de microscopía de fluorescencia x 1.000 usando una imagen por NIH de la misma forma que en el Ejemplo 7.

**Ejemplo 7 Tratamiento de una rata LC (administración intraportal 1)**

Según un informe de Jezequel y col. (Jezequel A M y col., J Hepatol., octubre de 1987; 5 (2): 174 - 81), se preparó un modelo de rata LC usando dimetilnitrosamina (DMN) (FIG. 10). Específicamente, se administró una dosis de 1 ml/kg de dimetilnitrosamina al 1% (DMN) (administración intraperitoneal) a ratas SD de 5 semanas de edad (machos) 3 días consecutivos por semana. Como ya se ha informado, se observó un aumento en la fibra a partir de la 2ª semana, y en la 4ª semana esto estaba acompañado por los hallazgos de una notable fibrosis, una destrucción de la estructura de los lóbulos hepáticos y la observación de la formación de nódulos regenerativos (FIG. 11). Después, mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 4, se preparó una emulsión (VA-Lip-gp46ARNic) formulando el gp46ARNic como un liposoma y mezclándolo con un 10% de VA, y se administró. La administración del VA-Lip-gp46ARNic comenzó en la 3ª semana, tiempo durante el cual se observó una fibrosis suficiente, y la evaluación se llevó a cabo en las semanas 4ª y 5ª. Dado que fue confirmado por el Ejemplo 2 que los efectos fueron observados durante hasta 48 horas *in vitro*, la administración se lleva a cabo dos veces por semana (FIG. 11). La cantidad administrada se determinó según un informe en el que el ARNic era inyectado directamente (McCaffery y col., Nature, 4 de julio de 2002; 418 (6893): 38 - 9), y la cantidad total era de 40 µg de ARNic. A partir de una tinción con azán del hígado tras la administración del ARNic, en la 4ª semana no había una diferencia apreciable entre un grupo al que se le había administrado disolución salina, un grupo al que se le había administrado un ARNic (aleatorio) y un grupo al que se le habría administrado el ARNic (gp46), pero en la 5ª semana se observó una disminución en la cantidad de fibra para el grupo al que se le había administrado el gp4SARNic (FIG. 12). Con objeto de analizar cuantitativamente la cantidad de fibra, se extrajo una porción no teñida usando una imagen por NIH, se midió su área (FIG. 13) y se observó una disminución significativa en el área de colágeno para el grupo al que se le había administrado el gp46ARNic (FIG. 14). Adicionalmente, con objeto de evaluar el grado de fibrosis usando otra medición, se midió cuantitativamente la cantidad de hidroxiprolina, que es un indicador de fibrosis, mediante un procedimiento estándar. Específicamente, después de hidrolizar 20 mg de tejido hepático liofilizado con HCl durante 24 horas, el líquido de reacción se centrifugó y el sobrenadante se trató con un reactivo tal como disolución de Ehrlich, y se centrifugó. El sobrenadante se recuperó y se midió la cantidad de hidroxiprolina en el tejido hepático midiendo la absorbancia a 560 nm (Hepatology, noviembre de 1998; vol. 28: 1247 - 1252). Según se muestra en la FIG. 15, en el grupo al que se le había administrado el gp46ARNic, la cantidad de hidroxiprolina resultó muy pequeña.

**Ejemplo 8 Tratamiento de una rata LC (administración intraportal 2)**

Adicionalmente, con objeto de examinar un cambio en la tasa de supervivencia mediante la administración de la medicina de la presente invención, según un método de Qi Z y col., (Proc Natl Acad Sci EE.UU., 2 de marzo de 1999; 96 (5): 2345 - 9), se preparó un modelo de rata LC usando dimetilnitrosamina (DMN) en una cantidad que era un 20% superior a la cantidad normal. En este modelo se llevaron a cabo un total de 4 administraciones intraportales en las semanas 1ª y 2ª. Los detalles de la administración eran: PBS, Lip-gp46ARNic, VA-Lip-ARNic aleatorio y VA-Lip-gp46ARNic (n = 7 para cada grupo). Después de la 3ª semana, todos los controles (el grupo al que se le había administrado PBS, el grupo al que se le había administrado VA-Lip-ARNic aleatorio y el grupo al que se le había administrado Lip-gp46ARNic) estaban muertos, pero 6 de los 7 sobrevivieron en el grupo al que se le había administrado VA-Lip-gp46ARNic (FIG. 16). Adicionalmente, en una tinción con azán del hígado en el día 21º, se observó una aparente disminución en la cantidad de fibra para el grupo al que se le había administrado gp46ARNic (FIG. 17).

**Ejemplo 9 Tratamiento de una rata LC (administración intraportal 3)**

En otro experimento se llevó a cabo la administración a partir de la 3ª semana para ratas del modelo LC (1% de DMN, 1 mg/kg intraperitoneal administrado 3 veces por semana) preparado según el método de Qi Z y col., y un método de Ueki T y col. (Nat Med., febrero de 1999; 5 (2): 226 - 30), según se muestra en la tabla, a continuación (n = 6 para cada grupo). Se añadió PBS a cada sustancia que se iba a administrar para hacer un volumen total de 200 µl y la frecuencia de administración era de una vez por semana.

65

[Tabla 1]

Grupo de tratamiento	Contenido de la administración	Dosis
9-1	VA	VA 200 nmol
9-2	Lip-gp46ARNic	liposomas 100 nmol, gp46ARNic 20 µg
9-3	VA-Lip-ARNic aleatorio	VA 200 nmol, liposomas 100 nmol, ARNic aleatorio 20 µg
9-4	VA-Lip-gp46ARNic	VA 200 nmol, liposomas 100 nmol, gp46ARNic 20 µg

A partir de los resultados, en los grupos distintos al grupo al que se le había administrado la medicina de la presente invención (grupo de tratamiento 9-4), las 6 ratas estaban muertas en día 45 después del inicio de la administración de DMN, pero en el grupo al que se le había administrado la medicina de la presente invención, todos los individuos salvo un caso, que murió el día 36, sobrevivieron durante más de 70 días después del inicio de la administración de DMN (FIG. 18). Para los individuos muertos, la cantidad de fibra hepática se analizó cuantitativamente basándose en el área del colágeno, de la misma forma que en el Ejemplo 7, y el aumento en la cantidad de fibra hepática fue notablemente inhibido mediante la administración de VA-Lip-gp46ARNic (FIG. 19).

#### Ejemplo 10 Tratamiento de una rata LC (administración intravenosa)

Se llevó a cabo la administración intravenosa a partir de la 3ª semana para ratas del modelo LC (1% de DMN, 1 mg/g de peso corporal intraperitoneal administrado 3 veces por semana) preparado de la misma forma que en el Ejemplo 9, según se muestra en la tabla, a continuación (n = 6 para cada grupo). Se añadió PBS a cada sustancia que se iba a administrar para hacer un volumen total de 200 µl. El periodo de administración fue hasta la muerte, excepto que fue hasta la 7ª semana para el Grupo 10-4 y la 6ª semana para el Grupo 10-10.

20 [Tabla 2]

Grupo de tratamiento	Contenido de la administración	Dosis	Frecuencia de administración
10-1	VA	VA 200 nmol	Dos veces por semana
10-2	Lip-gp46ARNic	liposomas 100 nmol, gp46ARNic 100 µg	
10-3	VA-Lip-ARNic aleatorio	VA 200 nmol, liposomas 100 nmol, ARNic aleatorio 100 µg	
10-4	VA-Lip-gp46ARNic	VA 200 nmol, liposomas 100 nmol, gp46ARNic 100 µg	
10-5	PBS	200 µl	Tres veces por semana
10-6	VA	VA 200 nmol	
10-7	VA-Lip	VA 200 nmol, liposomas 100 nmol	
10-8	Lip-gp4 6ARNic	liposomas 100 nmol, gp46ARNic 150 µg	
10-9	VA-Lip-ARNic aleatorio	VA 200 nmol, liposomas 100 nmol, ARNic aleatorio 150 µg	
10-10	VA-Lip-gp46ARNic	VA 200 nmol, liposomas 100 nmol, gp46ARNic 150 µg	

A partir de los resultados, en los grupos distintos a los grupos a los que se les había administrado la medicina de la presente invención (grupos de tratamiento 10-4 y 10-10), las 6 ratas estaban muertas el día 45 después del inicio de la administración de DMN, pero en los grupos a los que se les había administrado la medicina de la presente invención, todos los individuos salvo un caso, en el que dos ratas murieron el día 45 en el grupo de tratamiento 10-4, sobrevivieron durante más de 70 días después del inicio de la administración de DMN (FIGS. 20 y 21). Para los individuos muertos, la cantidad de fibra hepática se analizó cuantitativamente de la misma forma que en el Ejemplo 7, y el aumento en la cantidad de fibra hepática fue notablemente inhibido mediante la administración de VA-Lip-gp46ARNic (FIG. 22).

Los resultados mencionados anteriormente demuestran que la medicina de la presente invención es extremadamente eficaz para la prevención y el tratamiento de la fibrosis en la que están implicadas las células estrelladas.

**5 Ejemplo 11 Mejora de los resultados mediante la RBP (proteína de unión a retinol)**

Se examinó la influencia de la RBP sobre la eficacia de la transfección con VA-Lip-gp46ARNic usando LI90, que es una línea celular derivada de células estrelladas hepáticas humanas. Se añadieron 100 nM del VA-Lip-gp46ARNic (FITC) preparado en el Ejemplo 5, junto con varias concentraciones (es decir, 0, 0,1, 0,5, 1, 2, 4 o 10%) de FBS (suero bovino fetal), a LI90 durante el cultivo y se incubaron durante 48 horas, se observó una imagen de fluorescencia mediante LSM, y la cantidad de ARNic incorporado en las células individuales se analizó cuantitativamente mediante FACS. El FBS contenía aproximadamente 0,7 mg/dl de RBP. Según se muestra en la FIG. 23, el FBS (RBP) dio un aumento dependiente de la concentración en la cantidad de transfección del ARNic. Subsiguientemente se añadió 100 nM de VA-Lip-gp46ARNic (FITC) y un 4% de FBS, junto con 10 µg (21,476 nmol) de anticuerpo anti-RBP, a LI90 durante el cultivo, y la eficacia de transfección del ARNic se evaluó de la misma forma. Según se muestra en la FIG. 24, el aumento en la cantidad de transfección por parte de la RBP disminuyó notablemente por la adición del anticuerpo anti-RBP. Los resultados mencionados anteriormente demuestran que la RBP es eficaz para mejorar adicionalmente la transfección de la medicina de la presente invención.

20 [Lista de secuencias]

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Hokkaido Renomedix Institute Inc.
- 25 <120> Portador de fármacos y kit portador de fármacos para la inhibición de la fibrosis
- <130> PCT2264SI
- 30 <140> EP 05819552.0
- <141> 2005-12-22
- <150> JP2004-382791
- <151> 2004-12-22
- 35 <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.1
- 40 <210> 1
- <211> 25
- <212> ARN
- <213> Artificial
- 45 <220>
- <223> ARNic para la gp46 de rata
- <400> 1
- 50 guuccaccau aagaugguag acaac 25
- <210> 2
- <211> 25
- <212> ARN
- 55 <213> Artificial
- <220>
- <223> ARNic para la gp46 de rata
- 60 <400> 2
- ccacaaguuu uauauccaau cuagc 25
- <210> 3
- 65 <211> 19
- <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> ARNic para la gp46 de rata

5

<400> 3

gaaaccugua gaggccgca

19

10

**REIVINDICACIONES**

1. Medicina que comprende un portador de fármacos que comprende un retinoide como componente, y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas,  
5 en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas se elige de entre
- (i) el grupo que consiste en un ARNic, una ribozima, un ácido nucleico antisentido o un polinucleótido quimérico de ADN/ARN, o un vector que expresa los mismos,  
10 que se dirige a una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por las células estrelladas o a una o más moléculas con la función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular,
- (ii) el grupo que consiste en una ribozima o en un ARNic  
15 que inhibe específicamente el TIMP,
- y  
(iii) un inhibidor de la producción del TIMP que es un ácido nucleico antisentido del TIMP.  
20
2. La medicina según la Reivindicación 1, en la que el componente retinoide se elige de entre vitamina A, tretinoína, adapaleno o palmitato de retinol, y Fenretinida (4-HPR).
3. La medicina según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 2, en la que el portador de fármacos es  
25 uno cualquiera de las formas micela polimérica, liposomas, emulsión, microesfera y nanoesfera.
4. La medicina según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en la que la molécula con la función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular es la HSP47.
- 30 5. Una medicina para su uso en el tratamiento de una alteración relacionada con las células estrelladas, que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la alteración se elige del grupo formado por fibrosis, hepatitis y pancreatitis.
6. La medicina para su uso según la Reivindicación 5, en la que la fibrosis se elige de entre el grupo  
35 formado por fibrosis hepática, cirrosis hepática, fibrosis pancreática, fibrosis de las cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea.
7. La medicina para su uso según la Reivindicación 5 ó 6, en la que la molécula con la función de producir o de secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular es la HSP47.  
40
8. La medicina para su uso según una cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 7 en la que el componente retinoide se elige de entre vitamina A, tretinoína, adapaleno o palmitato de retinol, y Fenretinida (4-HPR).
9. La medicina para su uso según una cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 8, en la que el portador de  
45 fármacos es uno cualquiera de las formas micela polimérica, liposomas, emulsión, microesfera y nanoesfera.
10. Un kit de preparación para la medicina según las reivindicaciones 5 a 9, comprendiendo el kit uno o más recipientes que contienen uno o más del fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células estrelladas según se especifica en la reivindicación 1, un retinoide y un constituyente portador de fármacos distinto al  
50 retinoide.

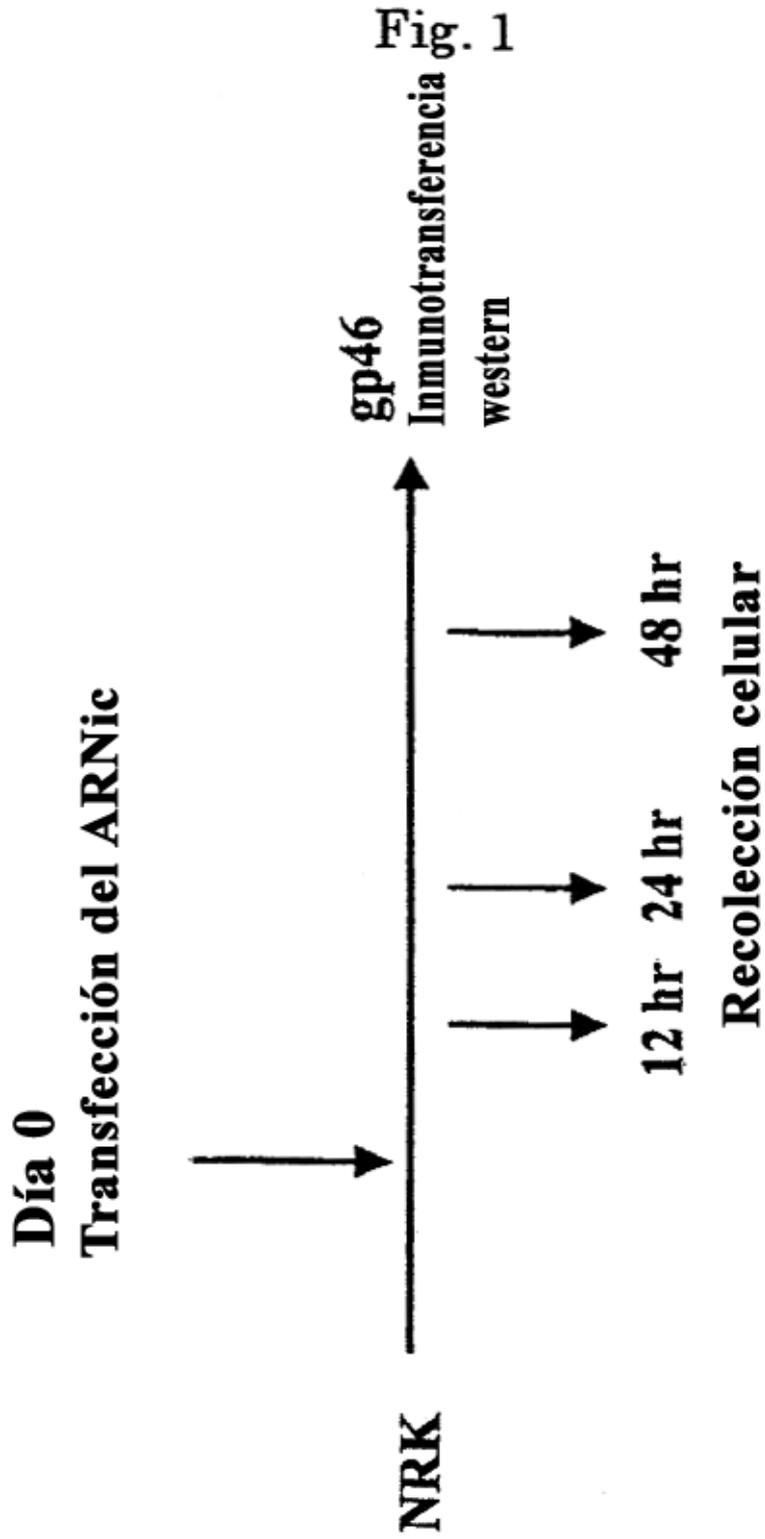


Fig. 2



Fig. 3

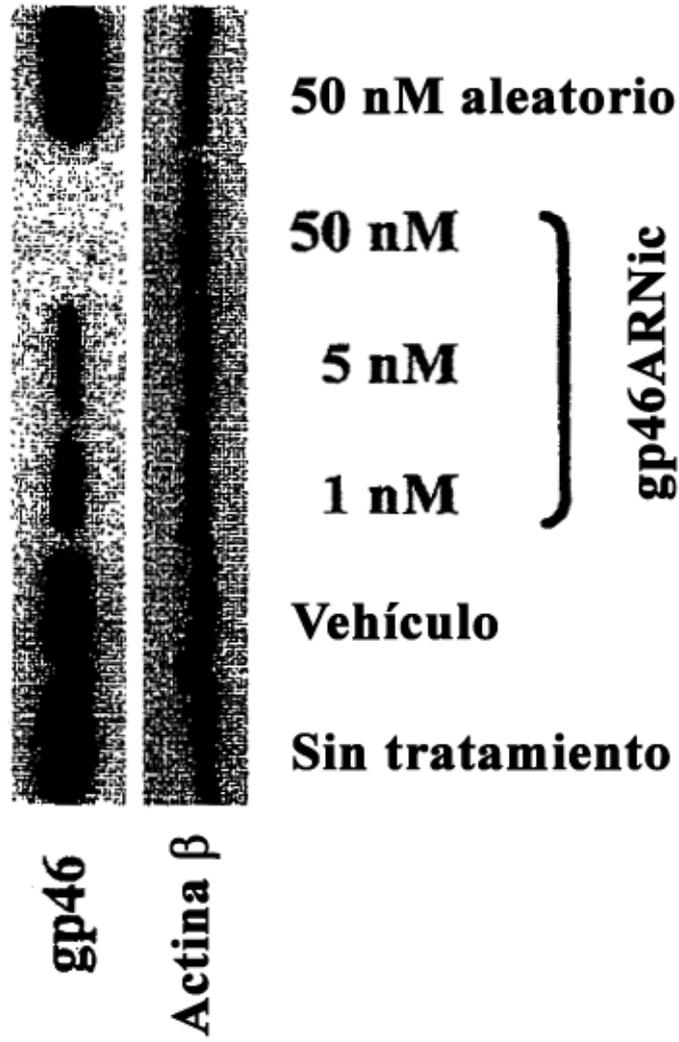


Fig. 4

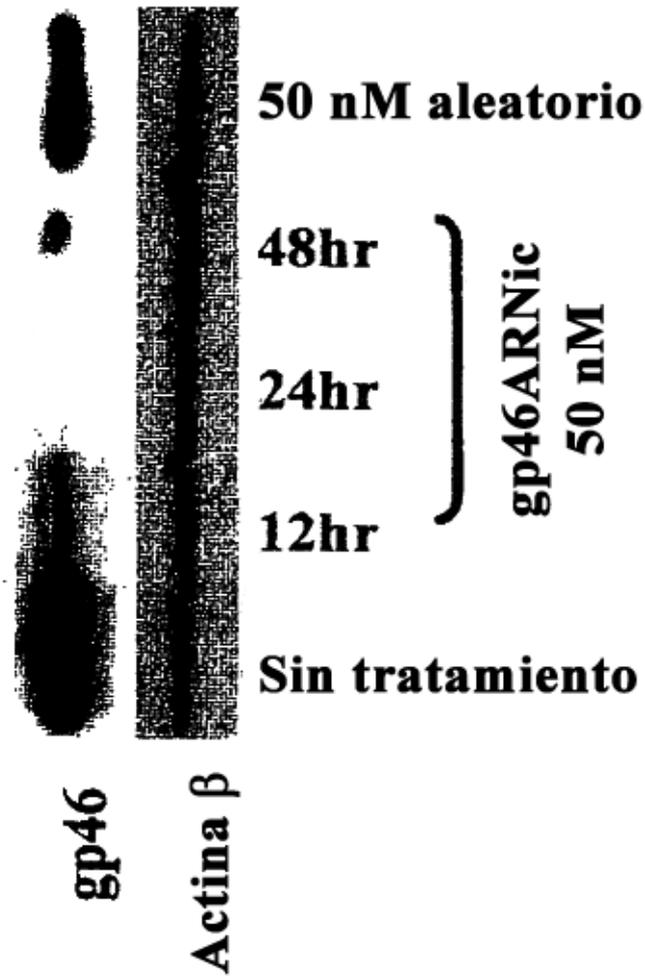




Fig. 6

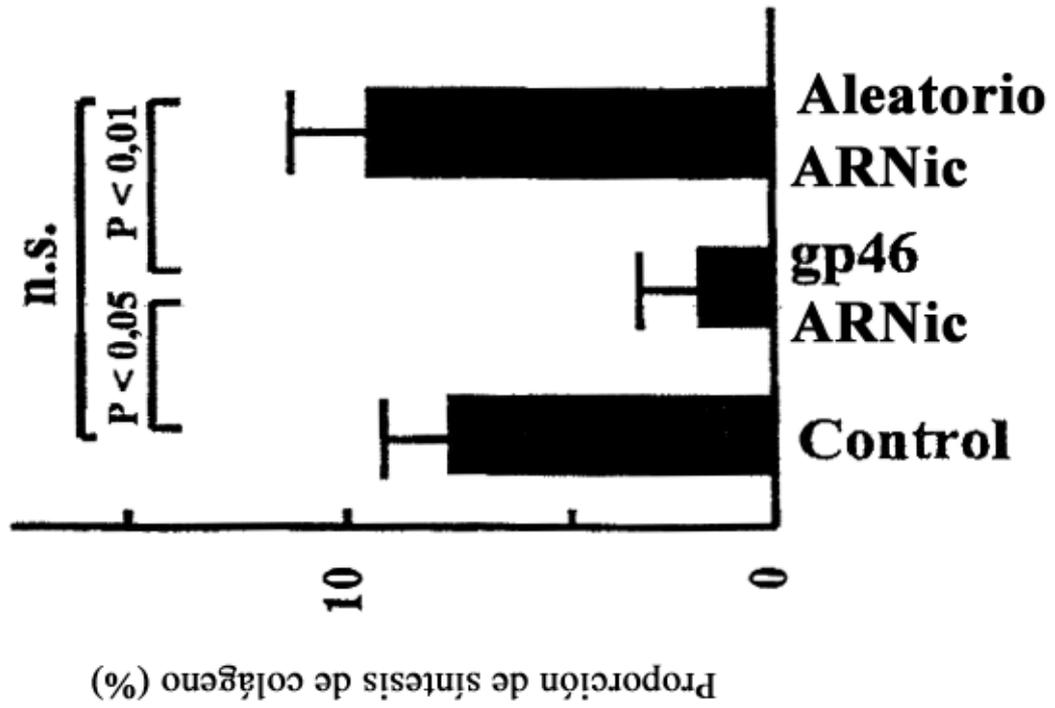


Fig. 7

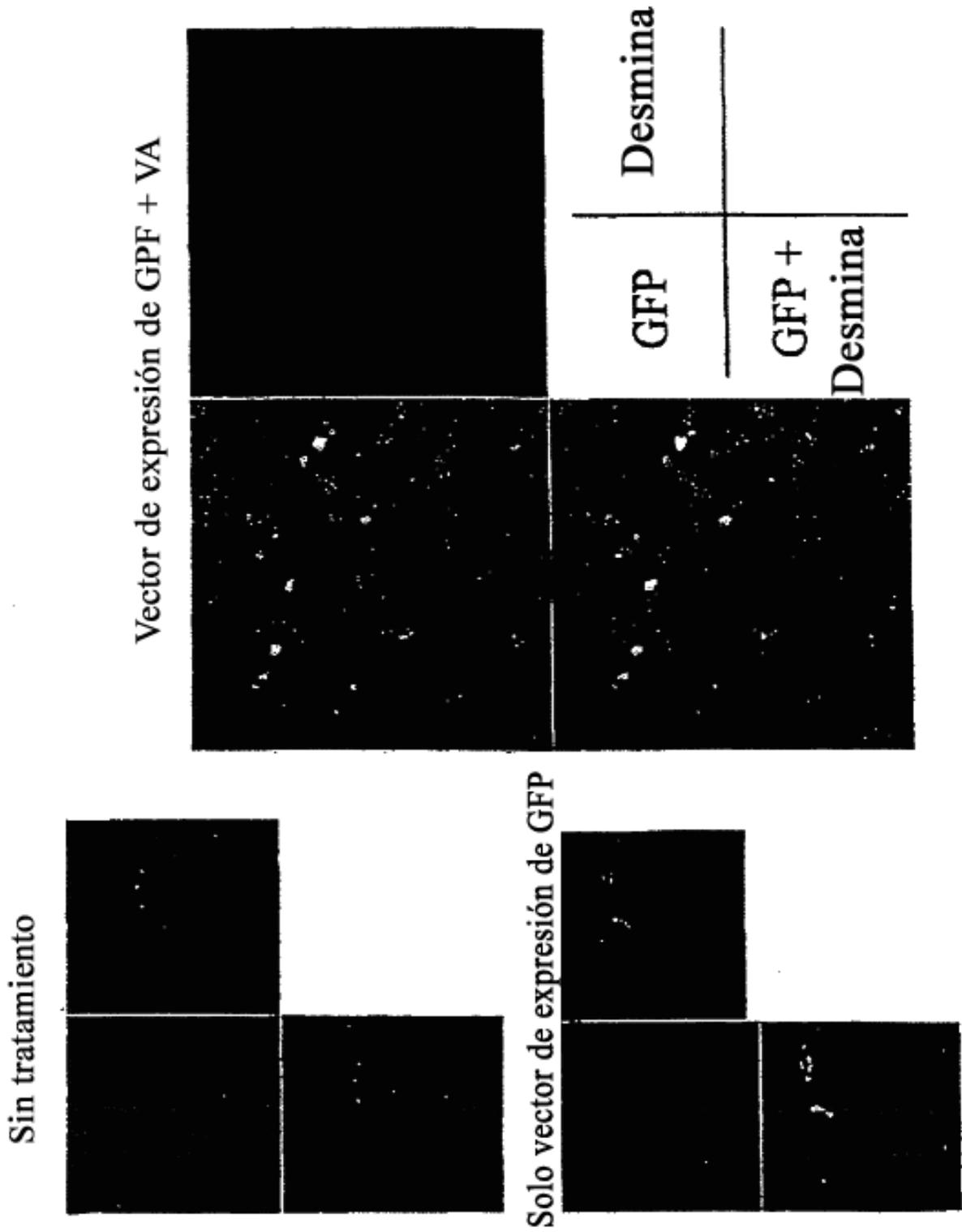
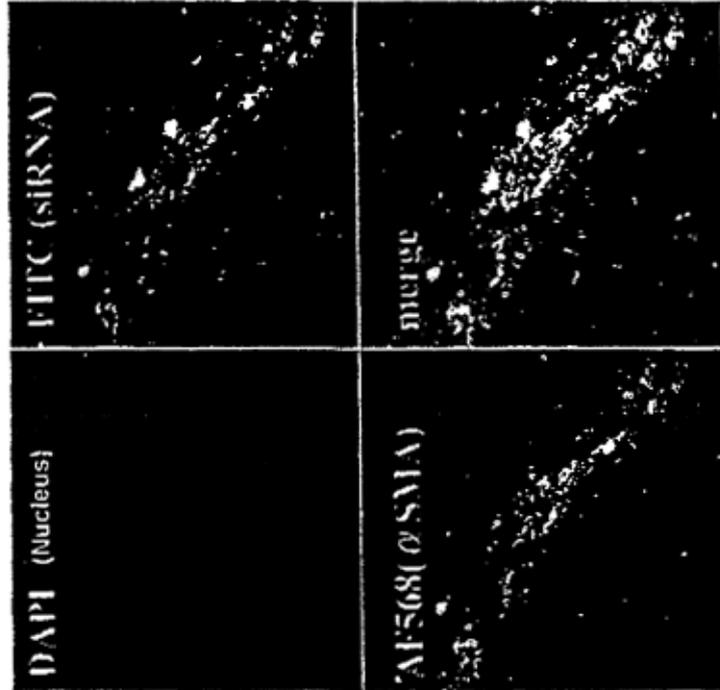


Fig. 8

**Lip-ARNic (FITC)**



**VA-Lip-ARNic (FITC)**

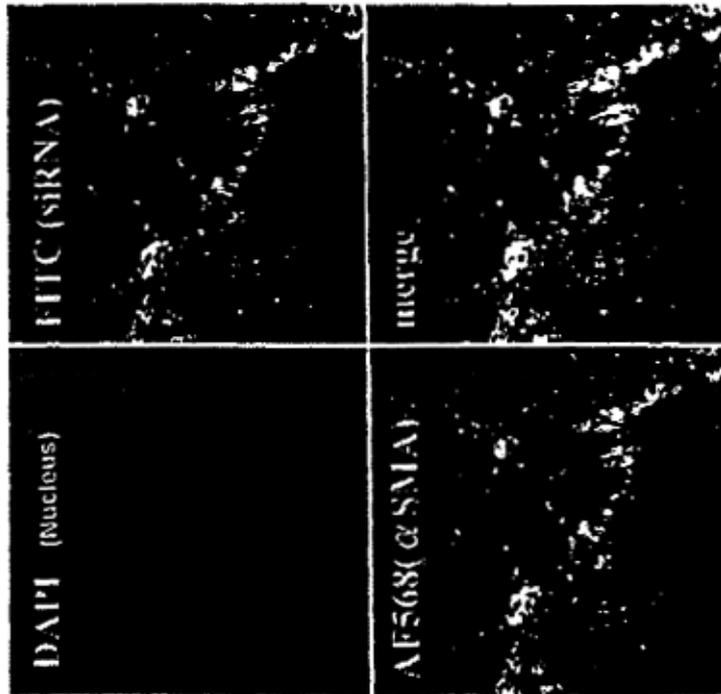


Fig. 9

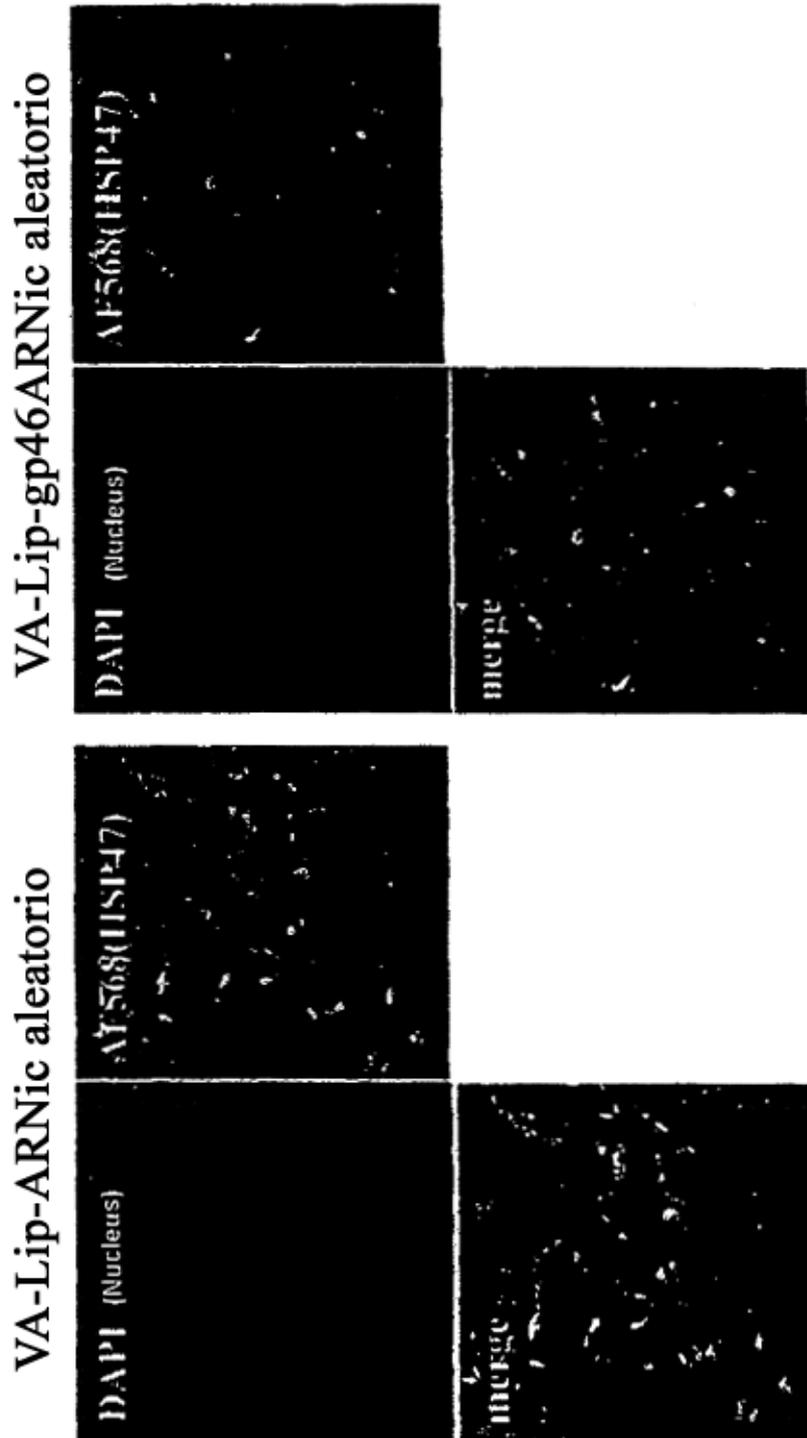


Fig. 10

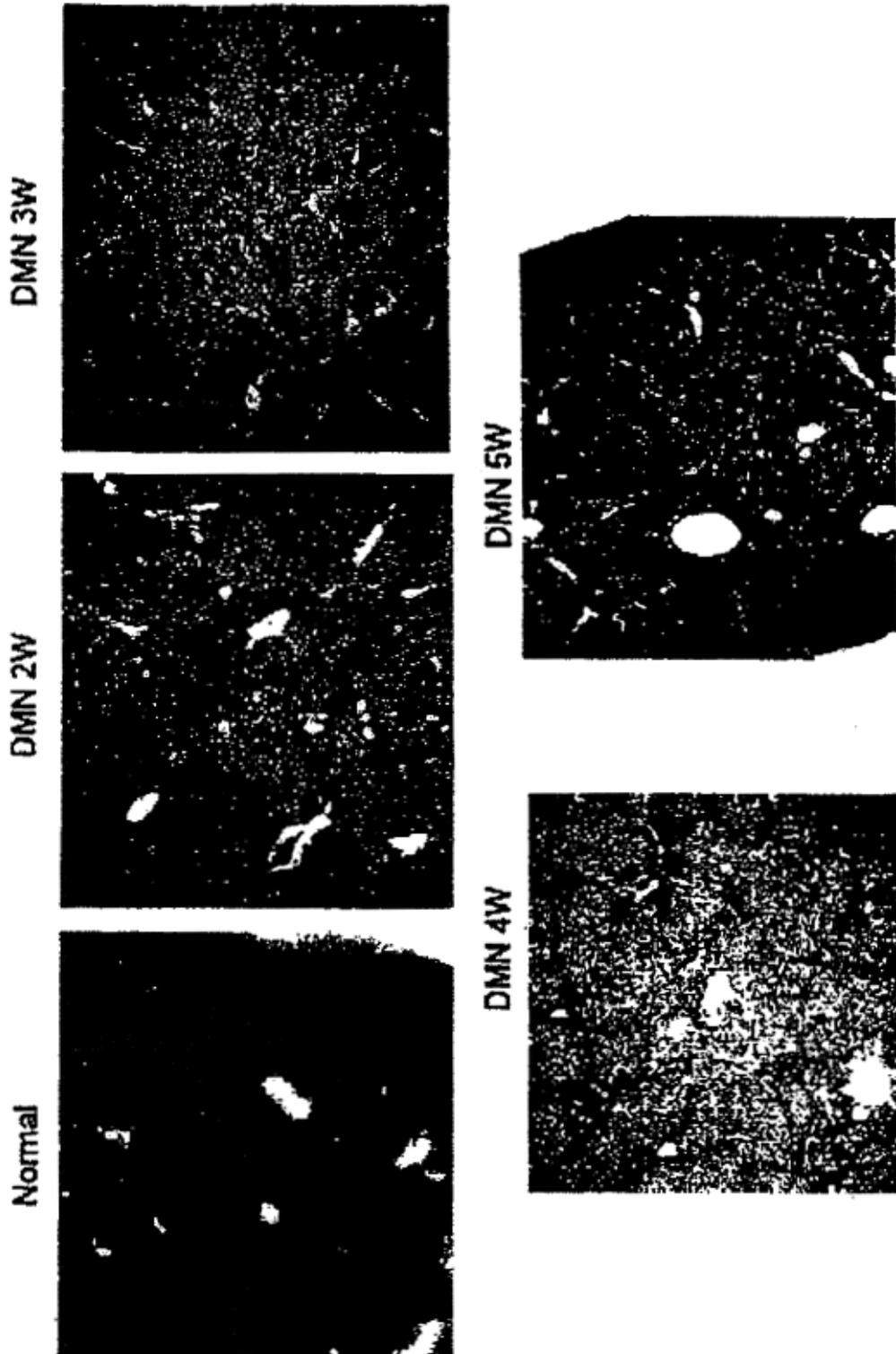


Fig. 11

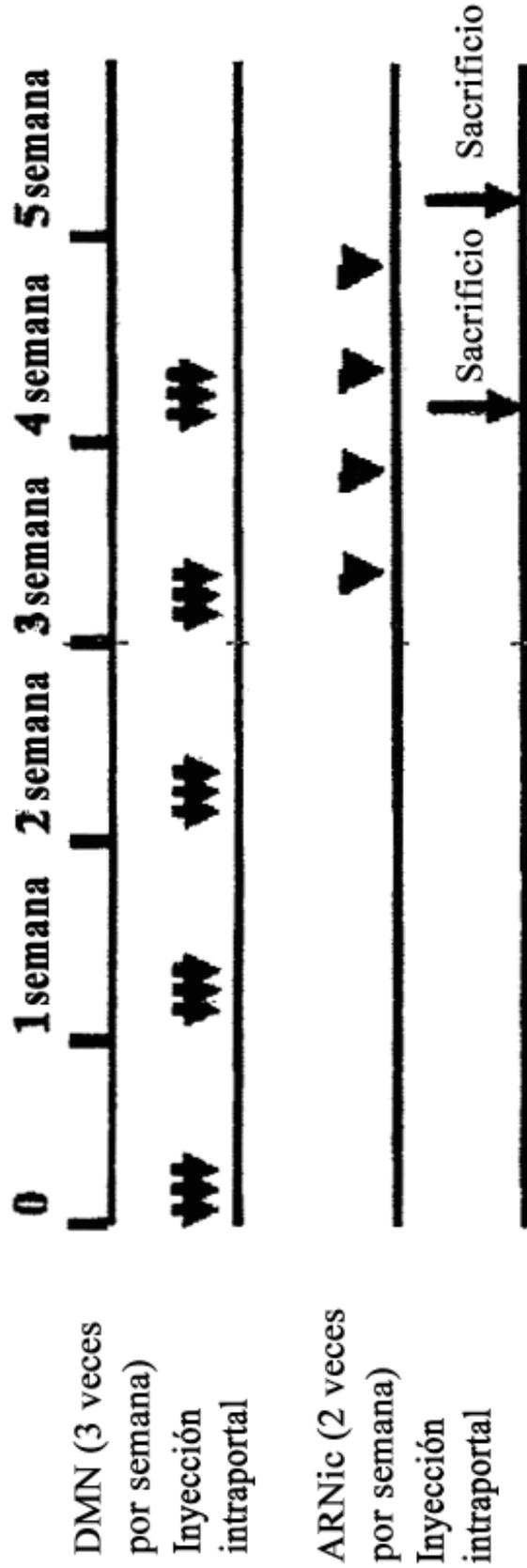
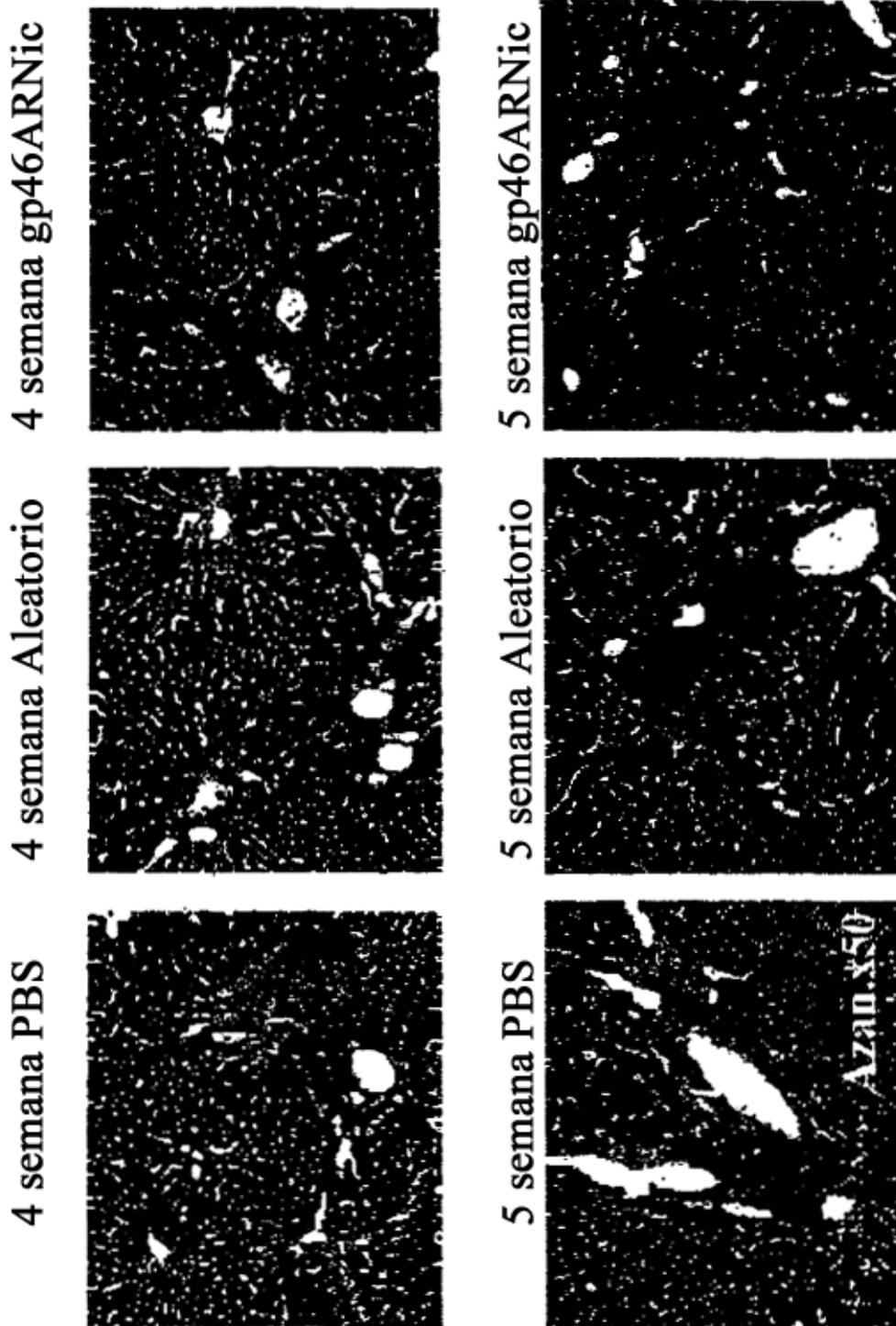
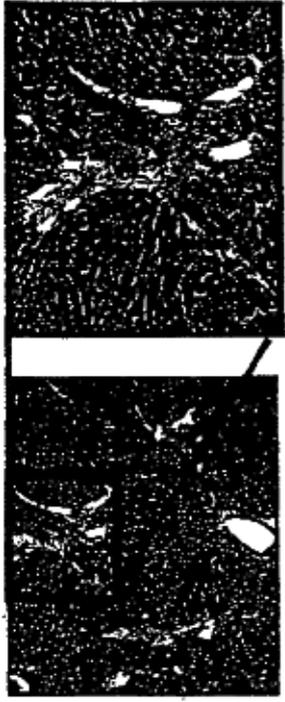


Fig. 12



Tinción de azán, imágenes de 6 posiciones aleatorias



**Azan.x50**      **Azan.x100**



Fig. 13

Medido mediante la recolección del área de colágeno azul usando una imagen por NIH

Fig. 14

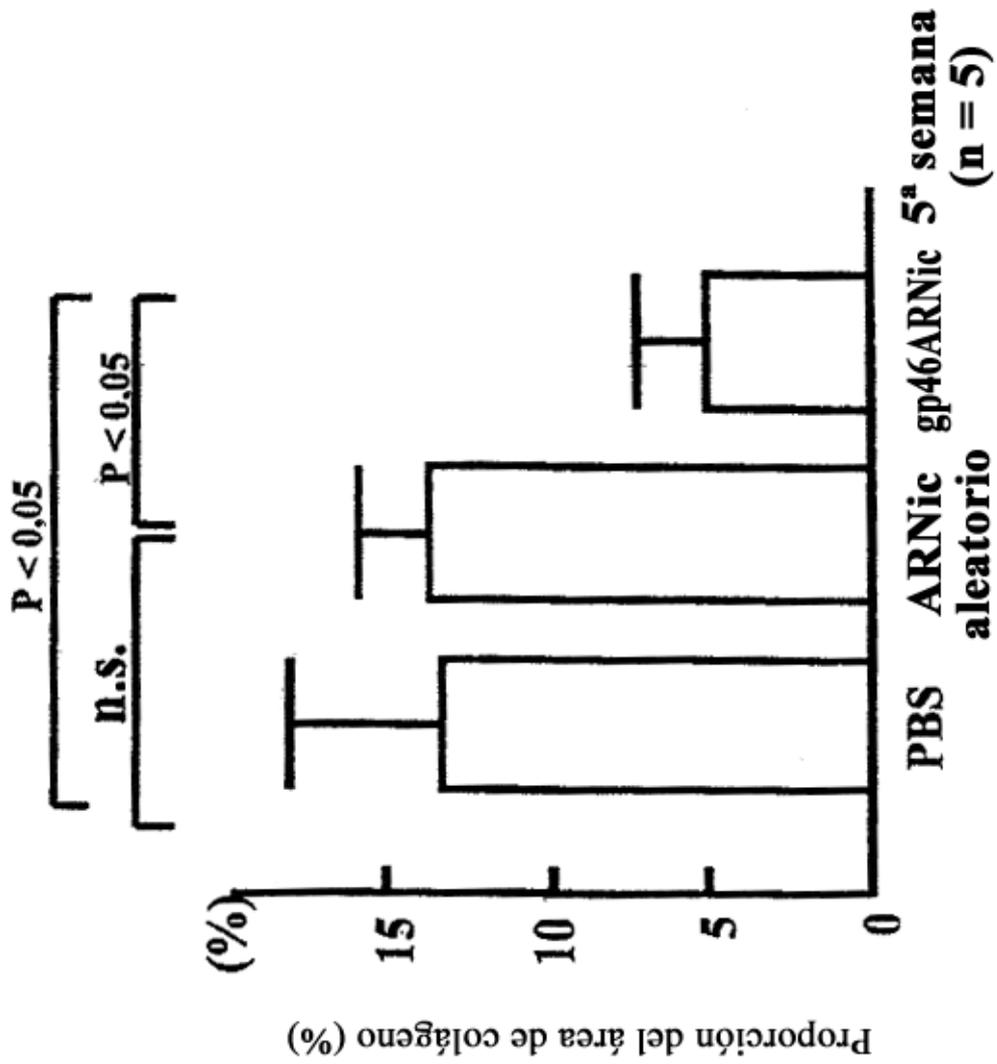


Fig. 15

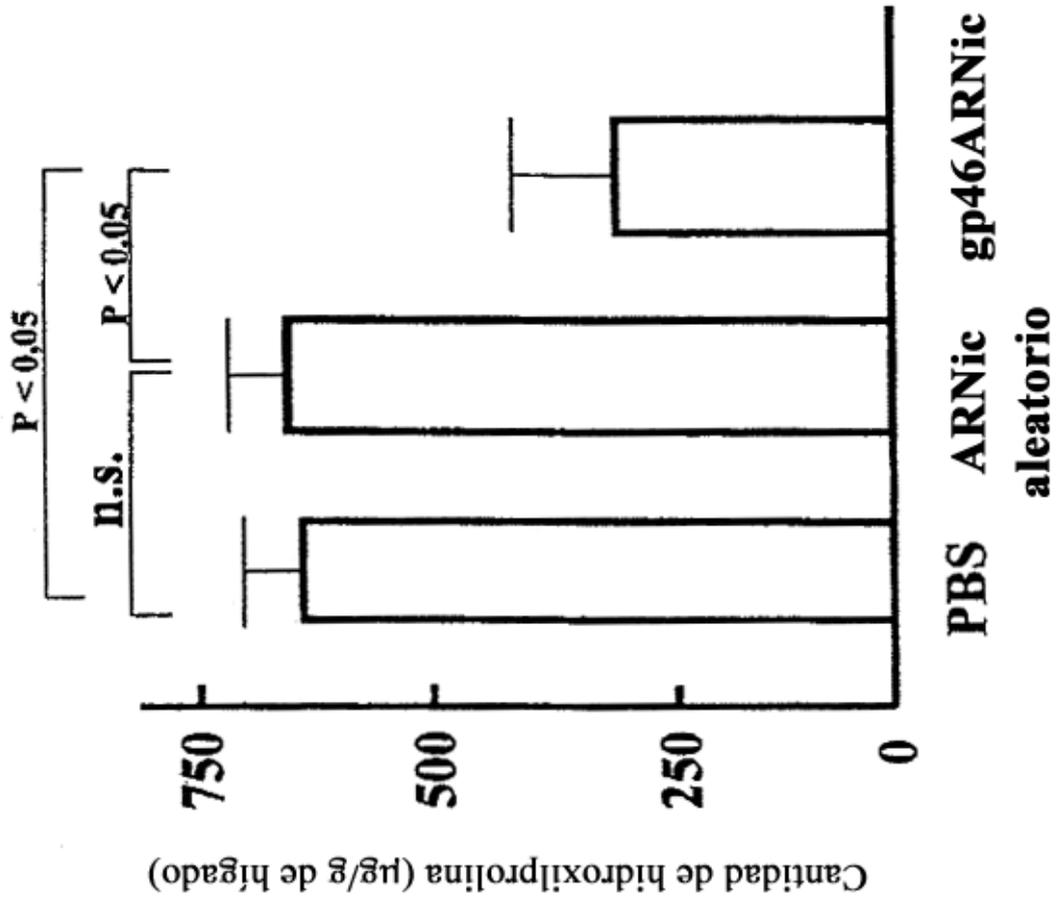


Fig. 16

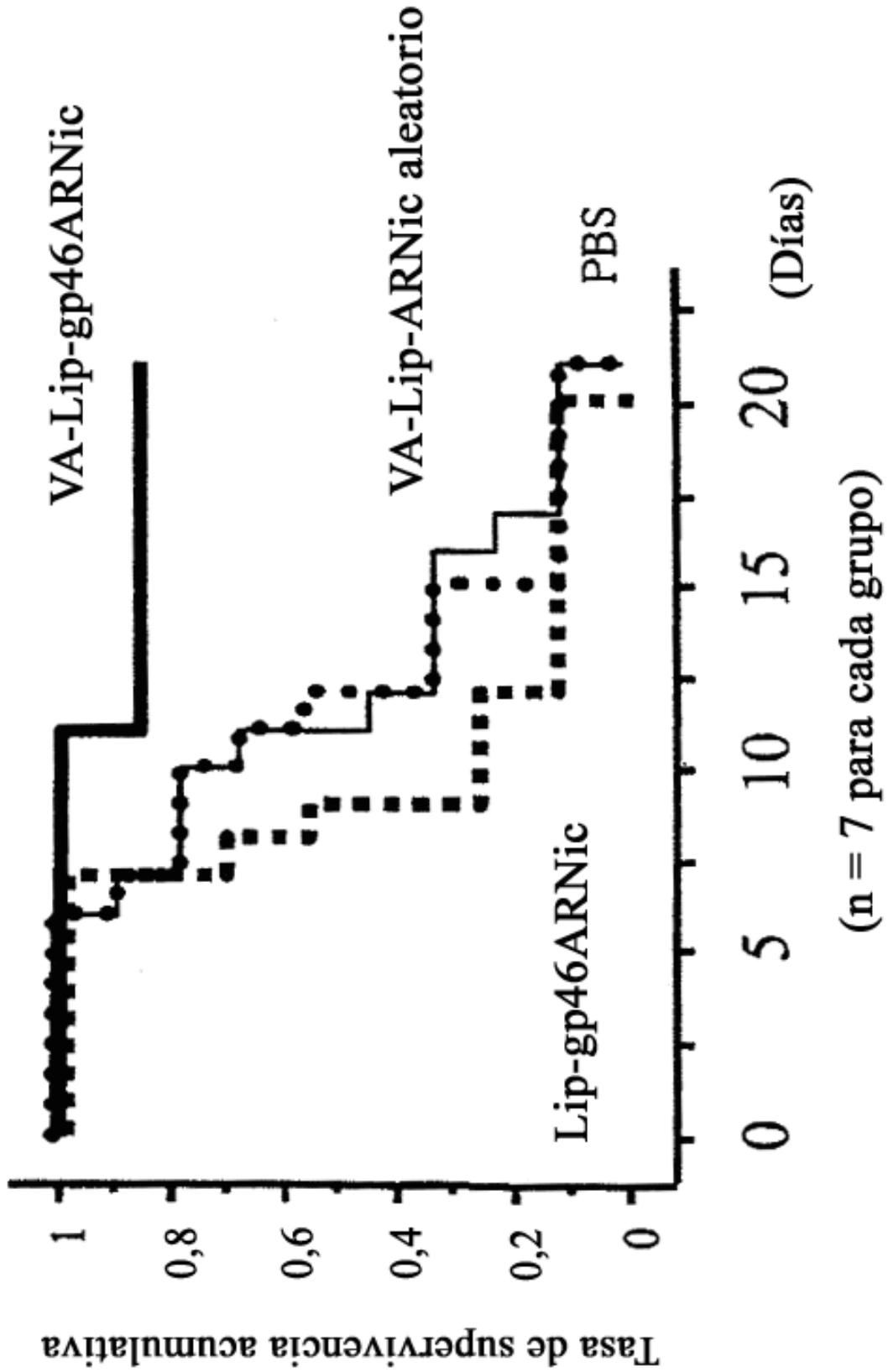


Fig. 17

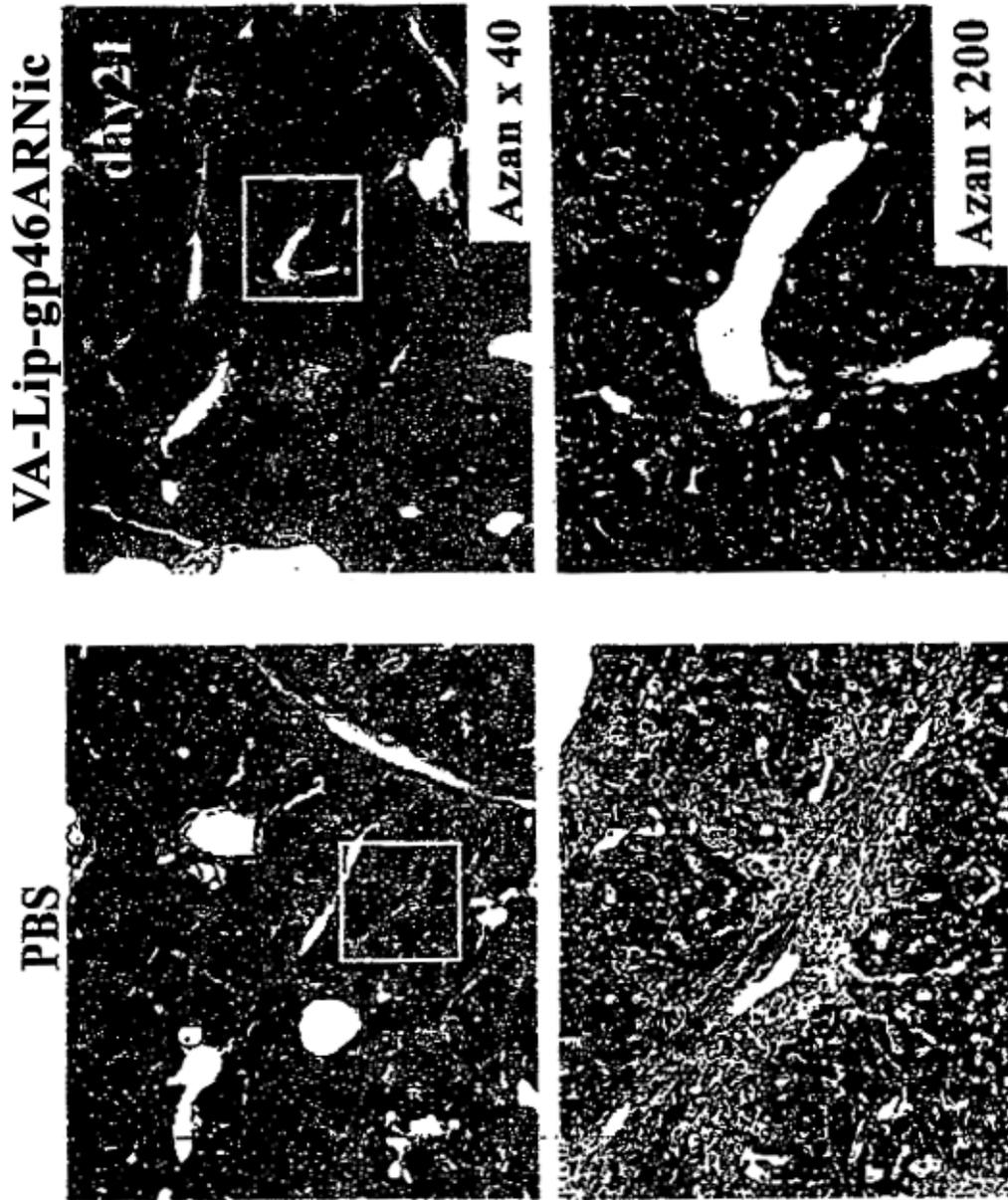
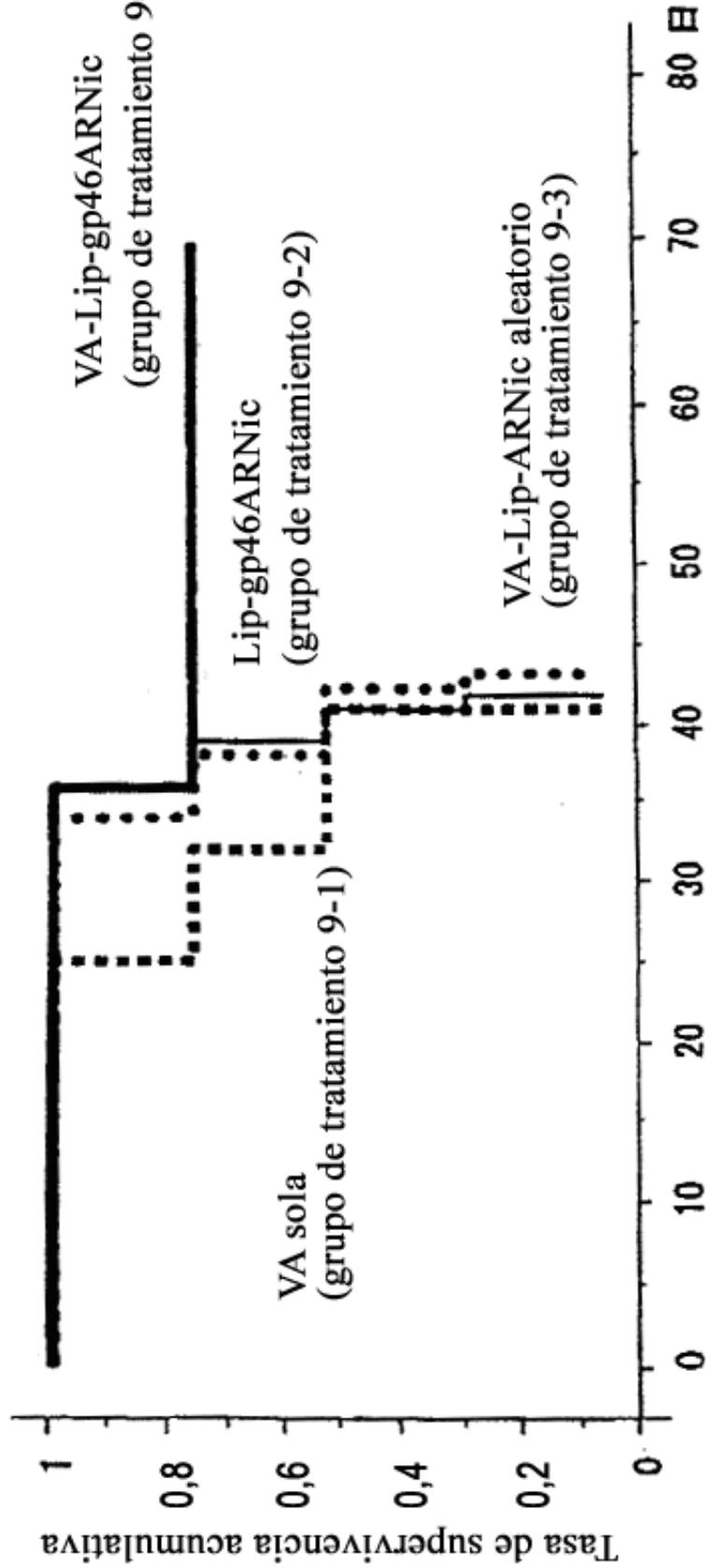
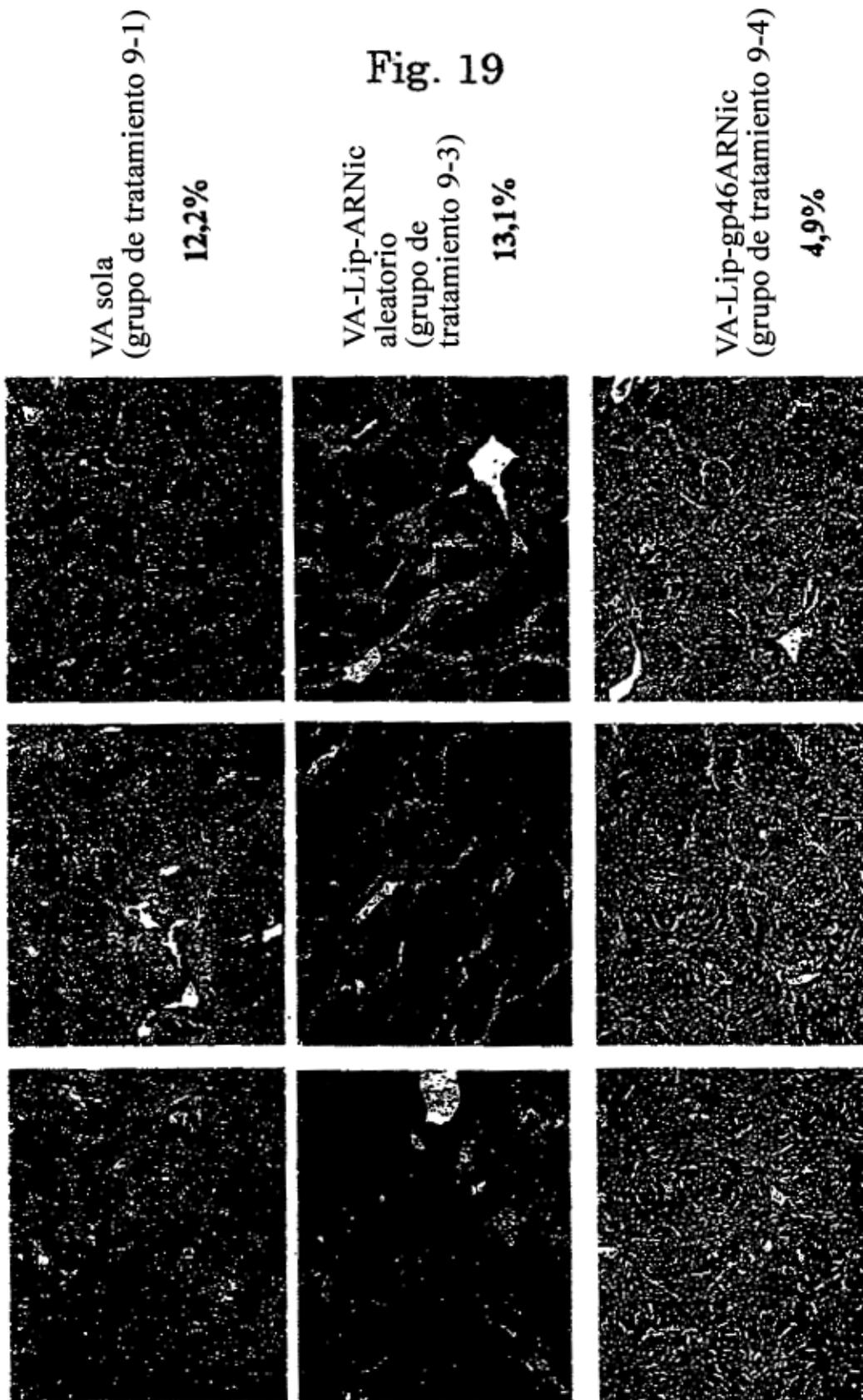
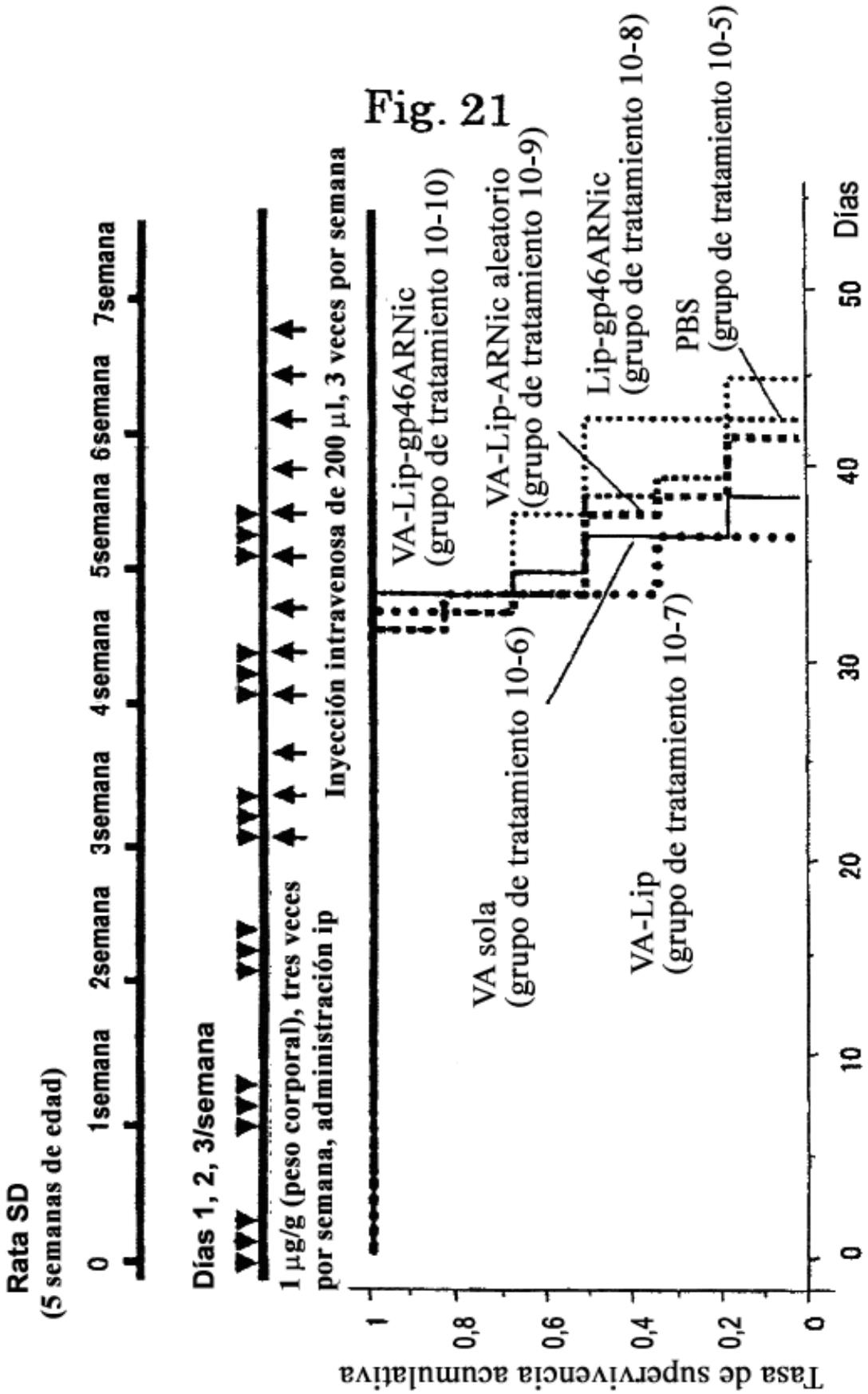


Fig. 18









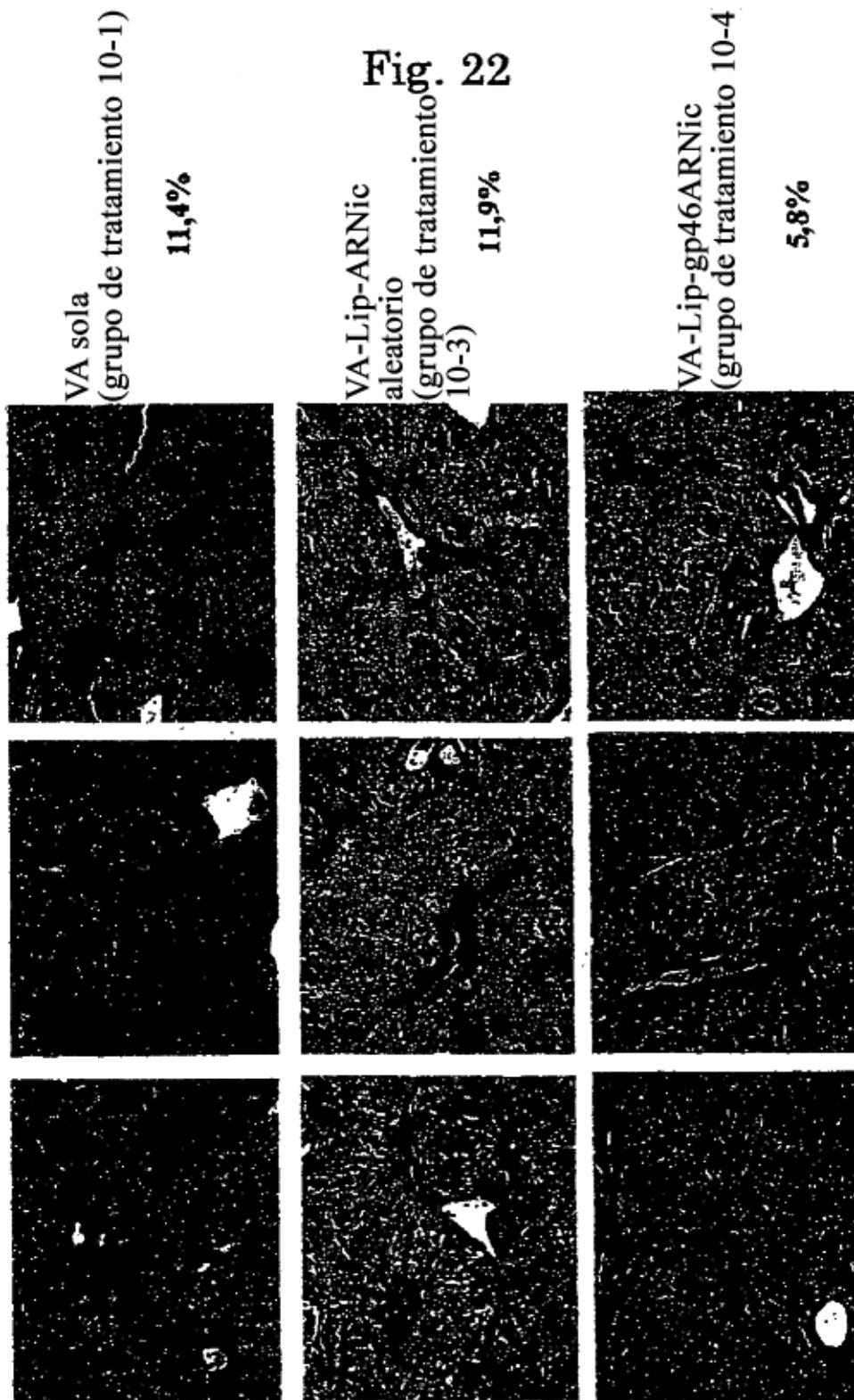


Fig. 23

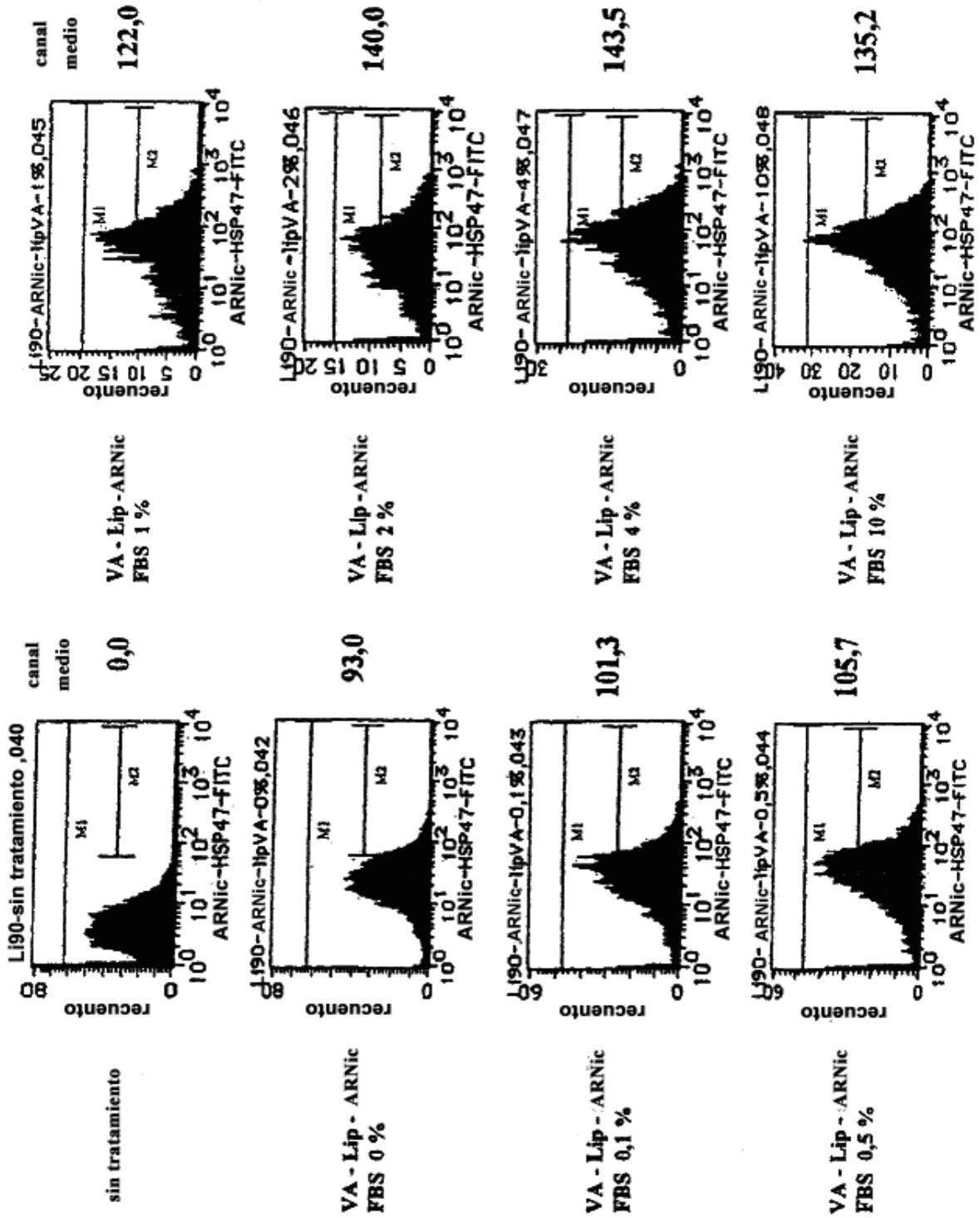


Fig. 24

