

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 348**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/41</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/55</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/713</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/10</b>	(2007.01)
<b>A61K 47/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/127</b>	(2006.01)
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2011 PCT/JP2011/067953**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12018115**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2011 E 11814740 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2601971**

54 Título: **Composición para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico**

30 Prioridad:

**12.10.2010 JP 2010230020**  
**05.08.2010 JP 2010175920**

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

**01.02.2018**

73 Titular/es:

**NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)**  
**1-1-2, Shimohozumi, Ibaraki-shi**  
**Osaka 567-8680, JP**

72 Inventor/es:

**NIITSU, YOSHIRO;**  
**YONEDA, AKIHIRO y**  
**ISHIWATARI, HIROTOSHI**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 652 348 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

Composición para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico

5 **[Campo técnico]**

La presente invención se refiere a una composición para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico.

10 **[Técnica anterior]**

15 La fibrosis de tejido está provocada por la producción y acumulación excesivas en el tejido de matriz extracelular, que es principalmente colágeno. Cuando se daña el tejido por estímulos tales como estrés oxidativo, hipoxia, inflamación o apoptosis, se repara el tejido dañado mediante reemplazo con la matriz extracelular, pero en el caso de que el daño sea grave o en el caso de que tal estimulación se vuelva crónica, la acumulación de matriz extracelular se vuelve excesiva, y el tejido no puede realizar su función suficientemente. Se observa fibrosis en diversos tipos de órganos, tales como el hígado, páncreas, pulmón, riñón, médula ósea y corazón, y se cree que las células que producen colágeno tales como los miofibroblastos están relacionadas con un estado patológico. De manera convencional, se cree que la fibrosis es un fenómeno irreversible y que una vez que el tejido se ha vuelto fibrótico, no regresa a su estado original, pero recientemente, ha habido algunos informes que sugieren que la fibrosis es reversible, y que cuando desaparece el estímulo fibrótico mencionado anteriormente, la matriz extracelular acumulada en el tejido disminuye (véanse los documentos no de patente 1 a 3).

20 Sin embargo, no ha habido informes detallados respecto a lo que ocurre específicamente en el tejido después de que la acumulación patológica de matriz extracelular disminuya, y hasta ahora se había desconocido completamente que se produzca regeneración de tejido normal en tal tejido fibrótico o que la regeneración de tejido normal fuera posible.

25 Además, la fibrosis de tejido no solo incluye fibrosis para las que la causa de la enfermedad está clara y pueden eliminarse, tales como fibrosis derivada de infección vírica, consumo de alcohol, fármacos, etc., sino que también incluye fibrosis para las que la causa directa de la enfermedad no está clara, tales como por ejemplo, cirrosis criptogénica, fibrosis pulmonar idiopática o mielofibrosis idiopática, y aquellas para las que la causa directa de la enfermedad se conoce pero el origen de la causa de la enfermedad no está claro o es difícil de eliminar, tales como por ejemplo, cirrosis biliar primaria, fibrosis hepática derivada de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y colangitis esclerosante primaria. El tejido que presenta tal fibrosis, para la que es difícil eliminar la causa de la enfermedad, está en un estado en el que siempre está expuesto a un estímulo fibrótico, pero se ha desconocido completamente hasta ahora que la acumulación patológica de matriz extracelular en tal tejido fibrótico puede reducirse, y ciertamente no se sabía que el tejido podía regenerarse.

30 El documento de patente 1 divulga un portador de fármaco específico de astrocitos que contiene un derivado de retinoide y/o un análogo de vitamina A como constituyente; un método de administración de fármacos con el uso del mismo; un fármaco que lo contiene; y un método terapéutico con el uso del fármaco. Al unir un portador de fármaco con un derivado de retinoide tal como vitamina A o un análogo de vitamina A o encapsulando el mismo en el portador de fármaco, puede administrarse específicamente un fármaco para uso terapéutico a los astrocitos. Como resultado, puede inhibirse o prevenirse de manera eficiente y eficaz una enfermedad relacionada con astrocitos mientras se minimizan los efectos secundarios. Como fármaco que inhibe la actividad o el crecimiento de astrocitos, por ejemplo, puede encapsularse un siRNA frente a HSP47 que es una chaperona molecular específica de colágeno en el portador de fármaco. Por tanto, la secreción de colágenos de tipo I a tipo IV puede inhibirse al mismo tiempo y, a su vez, puede inhibirse eficazmente la fibrosis. El documento de patente 2 divulga un método para tratar enfermedades hepáticas o daño hepático, incluyendo, pero sin limitarse a fibrosis hepática, y/o para ayudar en la recuperación de enfermedades hepáticas, incluyendo, pero sin limitarse a fibrosis hepática, o daño hepático en un sujeto, incluye trasplantar células madre mesenquimatosas umbilicales humanas (HUMSC) obtenidas de gelatina de Wharton a la zona de enfermedad o daño hepático del sujeto. El documento de patente 3, que es técnica anterior según el art. 54(3) EPC, divulga un portador de administración de sustancias para células que producen matriz extracelular en el riñón, incluyendo el portador un retinoide como agente de direccionamiento, un agente para tratar la fibrosis renal utilizando el portador, un procedimiento para producirlos, un kit de producción, un método para tratar la fibrosis renal usando el agente para tratar la fibrosis renal, etc.

60 **[Documentos de la técnica anterior]**60 **[Documentos no de patente]**

[Documento no de patente 1] Issa *et al.*, Gastroenterology. 2004; 126(7): 1795-808

[Documento no de patente 2] Iredale, J Clin Invest. 2007; 117(3): 539-48

65 [Documento no de patente 3] Sato *et al.*, Nat Biotechnol. 2008; 26(4): 431-42

[Documento de patente 1] EP 1 842 557 A1

[Documento de patente 2] US 2009/232781 A1

[Documento de patente 3] EP 2 583 691 A1

**[Sumario de la invención]**

**[Problemas que va a solucionar la invención]**

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para regenerar terapéuticamente tejido normal en tejido en el que está presente fibrosis.

**[Medios para solucionar los problemas]**

Mientras llevaban a cabo una investigación intensiva con el fin de resolver los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores han encontrado que incluso en tejido fibrótico que recibe continuamente un estímulo fibrótico, puede reducirse el colágeno acumulado en el tejido y, además, puede regenerarse tejido normal a partir del tejido fibrótico eliminando el colágeno acumulado en el tejido y garantizando que haya espacio en el que pueden crecer y diferenciarse células madre, y por tanto, se ha conseguido la presente invención. Tal como se describió anteriormente, aunque se sabe que cuando desaparece un estímulo fibrótico, la matriz extracelular acumulada en el tejido puede disminuir, se ha desconocido completamente hasta ahora que en tejido fibrótico que recibe continuamente un estímulo fibrótico, puede reducirse el colágeno acumulado en el tejido y que puede regenerarse tejido normal a partir de tejido fibrótico eliminando activamente colágeno acumulado en el tejido, y estos son hallazgos sorprendentes.

Por tanto, la presente invención se refiere a lo siguiente.

(1) Una composición farmacéutica para su uso en la regeneración de tejido normal mediante crecimiento y diferenciación de células madre en un espacio formado debido a una reducción de colágeno acumulado en tejido fibrótico, en la que el tejido fibrótico recibe continuamente un estímulo fibrótico, en la que la composición comprende una sustancia reductora de colágeno y un retinoide, en la que la sustancia reductora de colágeno se une a o se incluye en un portador seleccionado del grupo que consiste en una micela, un liposoma, una microesfera y una nanoesfera, en la que el retinoide se une al portador por medio de un método químico y/o físico, y en la que el retinoide administra específicamente la sustancia reductora de colágeno a células que producen colágeno.

(2) La composición farmacéutica para su uso según (1) anteriormente, en la que la sustancia reductora de colágeno se selecciona del grupo que consiste en un supresor de la producción de colágeno por células que producen colágeno, un promotor de la descomposición de colágeno y un supresor de un inhibidor de la descomposición de colágeno.

(2) La composición farmacéutica para su uso según (2) anteriormente, en la que el supresor de la producción de colágeno por células que producen colágeno se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de TGF $\beta$ , HGF o una sustancia que promueve la producción del mismo, un ligando de PPAR $\gamma$ , un inhibidor de angiotensina, un inhibidor de PDGF, relaxina o una sustancia que promueve la producción de la misma, una sustancia que inhibe la producción y secreción de un componente de matriz extracelular, un supresor de la actividad celular, un supresor del crecimiento celular y una sustancia que induce apoptosis.

(4) La composición farmacéutica para su uso según (2) anteriormente, en la que el promotor de la descomposición de colágeno es colagenasa o un promotor de la producción de colagenasa.

(5) La composición farmacéutica para su uso según (2) anteriormente, en la que el supresor de un inhibidor de la descomposición de colágeno es un inhibidor de TIMP.

**[Efectos de la invención]**

Según la presente invención, ha resultado evidente que puede regenerarse tejido normal a partir de tejido fibrótico, habiéndose creído hasta ahora que la regeneración de tejido normal a partir del mismo no se producía. Esto permite que se regenere terapéuticamente tejido normal a partir de tejido fibrótico, y se vuelve posible una nueva terapia regenerativa para una enfermedad fibrótica.

Además, según la presente invención, se vuelve posible tratar tejido fibrótico que está continuamente expuesto a un estímulo fibrótico, y puesto que se realiza un tratamiento médico para todos los tipos de enfermedades fibróticas incluyendo una enfermedad fibrótica para la que no hay terapia convencional efectiva y una enfermedad fibrótica para la que solo hay un tratamiento que implica el trasplante de órganos, puede anticiparse una enorme contribución

al tratamiento médico y veterinario.

**[Breve descripción de los dibujos]**

- 5 [Fig. 1] La figura 1 es un diagrama fotográfico que muestra el aspecto global de hígados obtenidos de ratas de prueba e imágenes teñidas con azán de secciones representativas de los mismos.
- [Fig. 2] La figura 2 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de  $\alpha$ -SMA en secciones representativas de hígado obtenido de ratas de prueba.
- 10 [Fig. 3] La figura 3 es una imagen de fluorescencia que muestra la localización de DAPI y GFP en sitios de trasplante de células madre hepáticas.
- [Fig. 4] La figura 4 muestra imágenes de campo claro e imágenes de fluorescencia de GFP de sitios de trasplante de células madre hepáticas.
- 15 [Fig. 5A] La figura 5A es un diagrama fotográfico que compara imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti-GFAP en un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub> (aumento de 200x).
- 20 [Fig. 5B] La figura 5B es un diagrama fotográfico que compara imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti-GFAP en un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub> (aumento de 400x).
- 25 [Fig. 6] La figura 6 es un diagrama fotográfico de aumento 200x que compara imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA en un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub>.
- 30 [Fig. 7] La figura 7 es un diagrama fotográfico de aumento 200x que compara imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti-albúmina en un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub>.
- [Fig. 8] La figura 8 es un diagrama fotográfico de aumento 200x que compara imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti-CK19 en un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub>.
- 35 [Fig. 9A] La figura 9A es un diagrama fotográfico que compara imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti-ve-CAD en un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub> (aumento de 200x).
- 40 [Fig. 9B] La figura 9B es un diagrama fotográfico que compara imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti-ve-CAD en un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub> (aumento de 400x).
- 45 [Fig. 10] La figura 10 es un diagrama fotográfico de aumento 200x que compara imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti-albúmina en un sitio de un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub> en el que no se trasplantan células madre hepáticas.
- 50 [Fig. 11] La figura 11 es una imagen de fluorescencia que muestra la distribución intracelular de siRNA marcado con FAM en células estrelladas pancreáticas de rata.
- [Fig. 12] La figura 12 es un gráfico que muestra el resultado de un análisis de FACS con respecto a siRNA incorporado en células estrelladas pancreáticas de rata. Se muestran respectivamente en secuencia desde arriba los resultados de un grupo sin tratar, un grupo tratado con Lip siRNA<sub>g46</sub>-FAM, un grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>g46</sub>-FAM, un grupo tratado con anticuerpos VA-lip siRNA<sub>g46</sub>-FAM + RBP, y un grupo tratado con anticuerpos Lip siRNA<sub>g46</sub>-FAM + RBP.
- 55 [Fig. 13] La figura 13 es una imagen de inmunotransferencia de tipo Western que muestra la supresión de la expresión de gp46 en células estrelladas pancreáticas de rata por siRNA<sub>g46</sub>. A muestra la diferencia en el efecto de supresión según la concentración de VA-lip siRNA<sub>g46</sub>, y B muestra la duración del efecto de supresión.
- 60 [Fig. 14] La figura 14 es un gráfico que muestra las cantidades cuantitativas de colágeno producido tras 72 horas por células no tratadas y células tratadas con cada uno de VA-lip siRNA<sub>g46</sub> y VA-lip siRNA al azar.
- 65 [Fig. 15] La figura 15 es un diagrama fotográfico que muestra la administración específica de VA-lip siRNA<sub>g46</sub> a células estrelladas pancreáticas en ratas tratadas con DBTC. A y B son imágenes de inmunotinción por un

anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA y un anticuerpo anti-FITC de secciones pancreáticas de rata que se habían tratado tres veces cada dos días con VA-lip siRNAgp46-FITC y Lip siRNAgp46-FITC respectivamente. Las imágenes de tinción a a d en el lado derecho son imágenes aumentadas de regiones denotadas por los símbolos correspondientes en la imagen de tinción en el lado izquierdo. C muestra imágenes de tinción mediante tinción de azán-Mallory, tinción de anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA, y tinción de anticuerpo anti-FITC de secciones de hígado de rata que se habían tratado tres veces cada dos días con VA-lip siRNAgp46-FITC. D a F son imágenes de tinción de una tinción con un anticuerpo anti-CD68 y un anticuerpo anti-FITC de pulmón, bazo y retina de rata 24 horas después de la administración intravenosa de VA-lip siRNAgp46-FITC.

[Fig. 16] La figura 16 es un diagrama que muestra la expresión de proteína gp46 en el páncreas 0, 1, 2, 3, y 4 días después de la administración de VA-lip siRNAgp46 a ratas a las que se les administró VA-lip siRNAgp46 (siRNA 0,75 mg/kg) el día 14 tras el tratamiento con DBTC. A muestra el resultado de inmunotransferencia de tipo Western de residuos de células pancreáticas, y B muestra el resultado de un análisis de concentración cuantitativo que usa  $\beta$ -actina para normalización.

[Fig. 17] La figura 17 es un diagrama que muestra el efecto de VA-lip siRNAgp46 en fibrosis pancreática inducida por DBTC. A muestra imágenes de tinción de azán-Mallory de secciones pancreáticas de rata tratada con DBTC a la que se le administró uno de VA-lip siRNAgp46, Lip siRNAgp46, y PBS 10 veces. B es un gráfico que muestra la cuantificación mediante análisis de imágenes computarizado de regiones que mostraron positivo en las imágenes de tinción de azán-Mallory de A. Se calcularon los datos a partir de 6 campos extraídos al azar de seis ratas de cada grupo y se expresan como valores promedio  $\pm$  desviación estándar. C es un gráfico que muestra el contenido de hidroxiprolina en el páncreas. Se expresan los datos como valores promedio  $\pm$  desviación estándar.

[Fig. 18] La figura 18 es un diagrama que muestra el efecto de VA-lip siRNAgp46 en fibrosis pancreática inducida por DBTC. A muestra imágenes de tinción de  $\alpha$ -SMA del páncreas de ratas tratadas con DBTC tras el tratamiento con VA-lip siRNAgp46. B es un gráfico que muestra la cuantificación mediante análisis de imágenes computarizado de regiones positivas para  $\alpha$ -SMA en A. Se calcularon los datos a partir de 6 campos extraídos al azar de seis ratas de cada grupo y se expresan como valores promedio  $\pm$  desviación estándar.

[Fig. 19] La figura 19 es un diagrama que muestra la regeneración de tejido normal a partir de tejido pancreático fibrótico mediante VA-lip siRNAgp46. A muestra imágenes de tinción de hematoxilina-eosina del páncreas de ratas tratadas con DBTC a las que se les había administrado VA-lip siRNAgp46 (derecha) y Lip siRNAgp46 (izquierda) 10 veces. Los diagramas inferiores son diagramas aumentados de cada región a y b de los diagramas superiores. B es un gráfico que muestra el peso del páncreas de ratas tratadas con DBTC.

[Fig. 20] La figura 20 es un gráfico que muestra el efecto sobre la diferenciación de células madre en presencia o ausencia de espacio alrededor de las células madre. La ordenada muestra el área de colonias positivas para albúmina.

[Fig. 21] La figura 21 es un gráfico que muestra el efecto sobre la diferenciación de células madre en presencia o ausencia de espacio alrededor de las células madre. La ordenada muestra un índice para la tasa de crecimiento de células madre.

**[Modos para llevar a cabo la invención]**

La presente invención se refiere a una composición, que contiene una sustancia reductora de colágeno, para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico.

En la presente invención, una "sustancia reductora de colágeno" significa cualquier sustancia que puede reducir la cantidad de colágeno acumulado en el tejido. Aunque no pretende limitarse a una teoría específica, puesto que se piensa que una de las causas de la acumulación de colágeno en tejido fibrótico es un desplazamiento en el equilibrio entre producción y descomposición de colágeno en el lado de producción, la sustancia reductora de colágeno puede incluir no solo un supresor de la producción de colágeno, sino también un promotor de la descomposición de colágeno y un supresor de un inhibidor de un promotor de la descomposición de colágeno. Por tanto, los ejemplos de la sustancia reductora de colágeno incluyen un supresor de la producción de colágeno por células que producen colágeno, un promotor de la descomposición de colágeno, y un supresor de un inhibidor de la descomposición de colágeno. Aunque no hay limitación particular, el colágeno en la presente invención es preferiblemente un colágeno implicado en fibrosis tales como por ejemplo colágeno de tipo I, III, o V, y de manera particularmente preferible, colágeno de tipo I, que está presente en tejido fibrótico en la mayor cantidad.

En la presente invención, las células que producen colágeno significan cualquier célula que produce colágeno en tejido fibrótico, y los ejemplos incluyen células estrelladas activadas y miofibroblastos. Se piensa que las células estrelladas activadas y los miofibroblastos son las principales fuentes que producen colágeno en tejido fibrótico, y se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -SMA (actina de músculo liso  $\alpha$ ). Por tanto, las células estrelladas activadas y los miofibroblastos en la presente invención se identifican por medio de inmunotinción, etc. usando un anticuerpo anti- $\alpha$ -

SMA que se marca de manera detectable.

5 El supresor de la producción de colágeno por células que producen colágeno incluye cualquier fármaco que suprime directa o indirectamente las acciones físicas, químicas y/o fisiológicas, etc. de las mismas células implicadas en la acumulación de colágeno en tejido fibrótico, y ejemplos de los mismos incluyen un inhibidor de TGF $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) o una sustancia que promueve la producción del mismo, un ligando de PPAR $\gamma$  (receptor del proliferador activado de peroxisoma gamma), un inhibidor de angiotensina, un inhibidor de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), relaxina o una sustancia que promueve la producción de la misma, una sustancia que inhibe la producción y secreción de un componente de matriz extracelular, un supresor de la actividad celular, supresor del crecimiento celular, y una sustancia que induce apoptosis.

15 Los ejemplos del inhibidor de TGF $\beta$  incluyen un receptor de tipo II de TGF $\beta$  truncado (Qi *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96 (5): 2345-9), un receptor de tipo II de TGF $\beta$  soluble (George *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96 (22): 12719-24), un inhibidor de la actividad de TGF $\beta$  tal como un anticuerpo anti-TGF $\beta$ , un inhibidor de la producción de TGF $\beta$  tal como una molécula de RNAi, ribozima, o ácido nucleico antisentido complementario a TGF $\beta$ , vectores que los expresan, y células así transformadas. En una realización de la presente invención, el inhibidor de TGF $\beta$  inhibe la actividad y/o producción de TGF $\beta$ 1.

20 Los ejemplos de sustancias que promueven la producción de HGF o relaxina incluyen un ácido nucleico que codifica para HGF o relaxina, un constructo de expresión que lo contiene, vectores de expresión que los contienen, y células así transformadas.

25 Los ejemplos del ligando de PPAR $\gamma$  incluyen un ligando endógeno tal como 15-desoxi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J2, ácido nitrolinoleico, LDL oxidada (lipoproteína de baja densidad), un ácido graso de cadena larga, o un eicosanoide, y un ligando exógeno tal como un agente médico de tiazolidindiona tal como troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, balaglitazona o rivoglitazona, o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.

30 Los ejemplos del inhibidor de angiotensina incluyen un antagonista del receptor de angiotensina tal como telmisartán, losartán, valsartán, candesartán cilexetilo, olmesartán medoxomilo o irbesartán. La angiotensina incluye angiotensinas I, II, III, y IV. Además, los ejemplos del receptor de angiotensina incluyen un receptor de angiotensina de tipo 1 (AT1).

35 Los ejemplos del inhibidor de PDGF incluyen un inhibidor de la actividad de PDGF tal como un anticuerpo anti-PDGF, un inhibidor de la producción de PDGF tal como una molécula de RNAi, ribozima, o ácido nucleico antisentido complementario a PDGF, vectores que los expresan, y células así transformadas.

40 Los ejemplos de la sustancia que inhibe la producción y secreción de un componente de matriz extracelular incluyen una sustancia, tal como una molécula de RNAi, una ribozima, o un ácido nucleico antisentido, que suprime la expresión de un componente de matriz extracelular tal como colágeno, proteoglicano, tenascina, fibronectina, trombospondina, osteopontina, osteonectina, o elastina, una sustancia que tiene un efecto negativo dominante tal como un mutante negativo dominante, vectores que los expresan, y células así transformadas. Los ejemplos de fármacos que inhiben la producción y secreción de colágeno incluyen inhibidores de HSP47 (proteína de choque térmico), que es una chaperona molecular específica para colágeno esencial para el transporte intracelular y maduración molecular común para los procesos sintéticos para los diversos tipos de colágeno, por ejemplo inhibidores de la expresión de HSP47 tales como una molécula de RNAi, ribozima, o ácido nucleico antisentido complementario a HSP47, una sustancia que tiene un efecto negativo dominante tal como un mutante negativo dominante de HSP47, vectores que los expresan, y células así transformadas.

50 Los ejemplos del supresor del crecimiento celular incluyen un agente alquilante (por ejemplo ifosfamida, nimustina, ciclofosfamida, dacarbazina, melfalán, ranimustina, etc.), un antibiótico antitumoral (por ejemplo idarubicina, epirubicina, daunorubicina, doxorubicina, pirarubicina, bleomicina, peplomycin, mitoxantrona, mitomicina C, etc.), un antagonista de metabolismo (por ejemplo gemcitabina, encitabina, citarabina, tegafur-uracilo, fármaco de combinación de tegafur-gimeracilo-oteracilo potasio, doxifluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, etc.), un alcaloide tal como etopósido, irinotecán, vinorelbina, docetaxel, paclitaxel, vincristina, vindesina, o vinblastina, un complejo de platino tal como carboplatino, cisplatino, o nedaplatino, y una estatina tal como lovastatina o simvastatina.

60 Los ejemplos del supresor de la actividad celular incluyen un inhibidor del canal de sodio.

Los ejemplos de la sustancia que induce apoptosis incluyen el compuesto 861, gliotoxina, y atorvastatina.

65 Los ejemplos del promotor de la descomposición de colágeno incluyen diversos tipos de colagenasa y una sustancia que promueve la producción del mismo. Los ejemplos de la colagenasa incluyen la familia de MMP, tal como MMP (metaloproteínasa de matriz) 1, 2, 3, 9, 13 y 14. Los ejemplos del promotor de la producción de colagenasa incluyen

un ácido nucleico que codifica para la colagenasa, un constructo de expresión que lo contiene, vectores de expresión que los contienen, y células así transformadas.

5 Los ejemplos del inhibidor de un promotor de la descomposición de colágeno incluyen TIMP (inhibidor tisular de metaloproteinasas, TIMP1 y TIMP2, etc.). Por tanto, los ejemplos del supresor del inhibidor anterior incluyen un inhibidor de la actividad de TIMP tal como un anticuerpo para TIMP, un inhibidor de la producción de TIMP tal como una molécula de RNAi, ribozima, o ácido nucleico antisentido complementario a TIMP, vectores que los expresan, y células así transformadas.

10 La molécula de RNAi en la presente invención incluye RNA tal como siRNA (RNA interferente pequeño), miRNA (micro RNA), shRNA (RNA de horquilla corta), ddRNA (RNA dirigido a DNA), piRNA (RNA de interacción de Piwi), rasiRNA (siRNA asociado a repetición), y modificaciones de estos. Además, el ácido nucleico en la presente invención incluye RNA, DNA, PNA, y compuestos de los mismos.

15 En la presente invención, "tejido fibrótico" significa tejido en el que la matriz extracelular, principalmente colágeno, se ha acumulado en una cantidad mayor a la normal. Además de colágeno, los ejemplos de la matriz extracelular incluyen proteoglicano, tenascina, fibronectina, trombospondina, osteopontina, osteonectina, y elastina. La cantidad de colágeno acumulado en el tejido puede cuantificarse, por ejemplo, usando la cantidad de hidroxiprolina en el tejido como indicador o sometiendo el tejido a tinción de colágeno (por ejemplo, tinción tricrómica de Masson, tinción de azán, tinción con rojo sirio, tinción de Elastica van Gieson, etc.) y llevando a cabo un análisis de imágenes. La cantidad de matriz extracelular en tejido fibrótico en la presente invención puede ser de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 100 %, al menos el 200 %, al menos el 300 %, al menos el 400 %, o al menos el 500 % en comparación con la de tejido normal. Puesto que se piensa que la producción de colágeno por células estrelladas activadas y/o miofibroblastos contribuye a la fibrosis del tejido, el tejido fibrótico en la presente invención contiene normalmente células estrelladas activadas y/o miofibroblastos. El tejido fibrótico puede ser cualquier tejido en el cuerpo siempre que tenga las características mencionadas anteriormente, y los ejemplos de los mismos incluyen el hígado, el páncreas, el pulmón, el riñón, la médula ósea, las cuerdas vocales, la laringe, la cavidad bucal, el corazón, el bazo, el mediastino, el retroperitoneo, el útero, la piel, la glándula mamaria, y el tubo intestinal.

20 Por tanto, el tejido fibrótico puede ser un área afectada en diversas fibrosis del órgano. Los ejemplos de las fibrosis del órgano incluyen fibrosis hepática, cirrosis hepática, cicatrización de las cuerdas vocales, fibrosis mucosa de las cuerdas vocales, fibrosis laríngea, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, mielofibrosis, infarto de miocardio, fibrosis del miocardio tras infarto de miocardio, fibrosis miocárdica, fibrosis endomiocárdica, fibrosis esplénica, fibrosis mediastínica, fibrosis submucosa lingual, fibrosis intestinal (por ejemplo la asociada con una enfermedad intestinal inflamatoria, etc.), fibrosis retroperitoneal, fibrosis uterina, esclerodermia, y una enfermedad fibrosa de la mama.

25 La fibrosis hepática y cirrosis hepática en la presente invención incluyen no solo las provocadas por una infección vírica con virus de la hepatitis B o C, consumo de alcohol, hígado graso, una infección parasitaria, una anomalía metabólica congénita, una sustancia hepatotóxica, etc., sino también aquellas cuya causa no está especificada. Por tanto, los ejemplos de la cirrosis hepática en la presente invención incluyen cirrosis de Charcot, cirrosis de Todd, cirrosis biliar primaria, cirrosis unilobular, cirrosis biliar secundaria, cirrosis obstructiva, cirrosis colangioliática, cirrosis biliar, cirrosis atrópica, cirrosis nutricional, cirrosis posnecrótica, cirrosis poshepática, cirrosis nodular, cirrosis mixta, cirrosis micronodular, cirrosis compensada, cirrosis macronodular, cirrosis séptica, cirrosis criptogénica, cirrosis descompensada, cirrosis periportal, cirrosis portal, y cirrosis alcohólica.

30 La fibrosis pulmonar en la presente invención incluye no solo fibrosis pulmonar en el sentido estricto si no también fibrosis pulmonar en un sentido amplio, incluyendo la coexistencia con neumonía intersticial. La fibrosis pulmonar en la presente invención puede estar provocada por cualquier neumonía intersticial tal como por ejemplo neumonía intersticial infecciosa asociada con neumonía vírica, neumonía fúngica, *Mycoplasma pneumoniae*, etc., neumonía intersticial asociada con una enfermedad del colágeno tal como artritis reumatoide, esclerodermia sistémica, dermatomiositis, polimiositis, una enfermedad de tejido conectivo mixta (MCTD, enfermedad de tejido conectivo mixta), neumonía intersticial asociada con exposición a radiación, neumonía intersticial inducida por un fármaco tal como un antineoplásico tal como bleomicina, una medicina herbal china tal como *Sho-saiko-to*, interferón, un antibiótico, o Paraquat, o neumonía intersticial idiopática tal como fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía intersticial aguda, neumonía organizada criptogénica, una enfermedad pulmonar intersticial respiratoria asociada con bronquiolitis, neumonía intersticial descamativa, o neumonía intersticial linfocítica, y la fibrosis pulmonar en la presente invención incluye, por tanto, aquellas en las que la neumonía intersticial anterior se ha vuelto crónica.

35 La mielofibrosis en la presente invención incluye no solo mielofibrosis primaria sino también mielofibrosis secundaria. Los ejemplos de la mielofibrosis secundaria incluyen las que son secundarias a una enfermedad tal como leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, policitemia verdadera, trombocitemia primaria, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, linfoma maligno, carcinoma, lupus eritematoso sistémico, o esclerosis sistémica progresiva, o a exposición a radiación.

La fibrosis renal en la presente invención puede estar causada por cualquier nefritis intersticial tales como por ejemplo nefritis intersticial infecciosa asociada con nefritis estreptocócica, nefritis estafilocócica, nefritis pneumocócica, nefritis vírica asociada con varicela, hepatitis B, hepatitis C, VIH, etc., nefritis debida a una infección parasitaria tal como malaria, nefritis fúngica, nefritis asociada a *Mycoplasma*, etc., nefritis intersticial asociada con una enfermedad del colágeno tal como lupus eritematoso sistémico (nefritis lúpica), esclerodermia sistémica (enfermedad de colágeno del riñón), o síndrome de Sjogren, nefritis asociada con una enfermedad inmunitaria de los vasos sanguíneos tal como nefritis purpúrica, poliarteritis, glomerulonefritis rápidamente progresiva, etc., nefritis intersticial asociada con exposición a radiación, nefritis intersticial inducida por un fármaco tal como un fármaco de referencia, un AINE, penicilamina, un antineoplásico tal como bleomicina, un antibiótico, o Paraquat, etc., una nefritis alérgica debido a una picadura de insecto, polen, o una planta de la familia *Anacardiaceae*, nefritis amiloidosis, nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefritis asociada con nefrosclerosis maligna o una enfermedad de riñón poliquistico, tubulonefritis intersticial, nefritis asociada con toxicosis gestacional o un cáncer, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefritis de nefropatía por IgA, nefritis crioglobulinémica mixta, nefritis de síndrome de Goodpasture, nefritis granulomatosa de Wegener, o una nefritis intersticial idiopática tal como nefritis intersticial aguda, etc., y la fibrosis renal en la presente invención incluye, por tanto, aquellas en las que la nefritis intersticial anterior se ha vuelto crónica.

En la presente invención, el tejido fibrótico es el que recibe continuamente un estímulo fibrótico. En la presente invención, el estímulo fibrótico significa cualquier estímulo que induce fibrosis, y los ejemplos incluyen estrés oxidativo, hipoxia, inflamación, y apoptosis (véase Ghiassi-Nejad *et al.*, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2008; 2(6): 803-16). Los ejemplos de tal tejido incluyen tejido fibrótico que experimenta inflamación crónica y tejido que está continuamente expuesto a una sustancia citotóxica (por ejemplo, tejido hepático en el que la colestasis está provocada por una enfermedad del conducto biliar, etc.). Además, tal tejido también incluye tejido afectado por fibrosis para la que la causa directa de la enfermedad no está clara, tal como por ejemplo cirrosis criptogénica, fibrosis pulmonar idiopática o mielofibrosis idiopática, etc., o afectada por aquellas para las que la causa directa de la enfermedad se conoce pero el origen de la causa de la enfermedad no está claro o es difícil de eliminar, tal como por ejemplo cirrosis biliar primaria, fibrosis hepática derivada de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), colangitis esclerosante primaria, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar derivada de neumonía intersticial idiopática, mielofibrosis primaria, fibrosis renal derivada de nefritis intersticial idiopática, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, etc.), o esclerodermia sistémica, etc.

En la presente invención, “regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico” significa lo siguiente: según avanza la fibrosis, el tejido se reemplaza por tejido fibroso, que es principalmente matriz extracelular, y la regeneración de tejido normal a partir de tejido fibrótico en la presente invención invierte el flujo anterior y reemplaza el tejido fibroso proliferado con el tejido normal original. Por tanto, la regeneración de tejido normal a partir de tejido fibrótico en la presente invención incluye no solo recuperar completamente el tejido fibrótico al estado original sino recuperar parcialmente el tejido fibrótico al estado original. El grado de regeneración de tejido normal puede evaluarse mediante un examen histológico de una muestra de biopsia, etc., basándose en la normalización de la estructura tisular, reducción en la región ocupada por tejido fibroso, aumento en la región ocupada por tejido normal, etc., o cuando se observa una anomalía de un índice bioquímico debido a fibrosis antes del tratamiento con la presente composición, la evaluación puede llevarse a cabo basándose en la mejora del índice, etc.

Según la presente invención, la regeneración de tejido normal se lleva a cabo mediante crecimiento y diferenciación de células madre en un espacio que se forma debido a la reducción de colágeno acumulado en tejido fibrótico. Por tanto, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica que es para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico en un espacio para el crecimiento y diferenciación de células madre, formándose el espacio por una reducción de colágeno acumulado en el tejido fibrótico. En este caso, los ejemplos de las células madre incluyen los que están originalmente presentes en el tejido que se ha vuelto fibrótico (células madre hepáticas, células madre pancreáticas, células madre de pulmón, células madre de riñón, células madre de médula ósea, células madre de corazón, células madre de bazo, células madre de útero, células madre de piel, células madre de mama, células madre de intestino, células madre mesenquimatosas, etc.), aquellas que se han movido de otro lugar en el cuerpo y, además, aquellas que se han administrado terapéuticamente. Además, el “espacio” incluye no solo una cavidad dentro del tejido sino también un espacio con sitio en el que las células pueden aumentar y crecer tal como por ejemplo un espacio en el que la presión entre células se disminuye o un espacio que tienen flexibilidad.

La composición de la presente invención contiene además un retinoide. Al contener el retinoide, se vuelve posible administrar específicamente a células que producen colágeno, que son células diana, una sustancia reductora de colágeno que selecciona como diana a células que producen colágeno tales como, por ejemplo, una sustancia que inhibe la producción y secreción de un componente de matriz extracelular, HGF o una sustancia que promueve la producción del mismo, MMP o una sustancia que promueve la producción del mismo, un inhibidor de TIMP, un inhibidor de la producción de TGFβ, relaxina o una sustancia que promueve la producción de la misma, etc., potenciando así el efecto de la sustancia reductora de colágeno usada.

Aunque el mecanismo en el que la selección como diana se lleva a cabo por medio de un retinoide aún no se ha aclarado, se resume, por ejemplo, que un retinoide unido específicamente a una RBP (proteína de unión a retinol) se incorpora en una célula que produce colágeno en tejido fibrótico mediante un determinado tipo de receptor situado

sobre la superficie de la célula. La capacidad de un retinoide para actuar como agente diana para células que producen colágeno se describe en los documentos WO 2006/068232, JP, A, 2009-221164, JP, A, 2010-59124, etc.

Un retinoide es un elemento de un grupo de compuestos que tiene un esqueleto en el que se conectan cuatro unidades de isoprenoide de manera de cabeza a cola (véase G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents", 2ª ed. Portland Press, págs. 247-251 (1992)), y vitamina A es un descriptor genérico para un retinoide que muestra cualitativamente la actividad biológica de retinol. Los ejemplos del retinoide que pueden usarse en la presente invención incluyen retinol (incluyendo holo-trans-retinol), retinal, ácido retinoico (incluyendo tretinoína), un éster de retinol y un ácido graso, un éster de un alcohol alifático y ácido retinoico, un derivado de retinoide tal como etretinato, isotretinoína, adapaleno, acitretina, tazaroteno, o palmitato de retinilo, y un análogo de vitamina A tal como fenretinida (4-HPR) o bexaroteno.

Entre ellos, retinol, retinal, ácido retinoico, un éster de retinol y un ácido graso (por ejemplo, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, estearato de retinilo, y laurato de retinilo, etc.), y un éster de un alcohol alifático y ácido retinoico (por ejemplo, retinoato de etilo, etc.) son preferibles en cuanto a eficiencia de administración específica de una sustancia a células que producen colágeno en tejido fibrótico.

Todos los isómeros, incluyendo los retinoides *cis/trans*, están incluidos en el alcance de la presente invención. Un retinoide puede sustituirse con uno o más sustituyentes. El retinoide en la presente divulgación incluye no solo uno en un estado aislado sino un retinoide en un estado en el que se disuelve o mezcla en un medio que puede disolverlo o retenerlo. Según la invención, el retinoide se une al portador que contiene la sustancia reductora de colágeno, tal como se define en las reivindicaciones.

La composición mencionada anteriormente de la presente divulgación puede contener un componente que constituye el portador distinto de lo anterior. El componente que constituye el portador en la presente divulgación no está particularmente limitado; puede usarse cualquier componente que es conocido en los campos medicinales y/o farmacéuticos, siempre que sea uno para el cual al menos la unión a un retinoide es posible.

Los ejemplos de un componente de este tipo 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 soja o aceite de semilla de amapola, un aceite mineral, una lecitina tal como lecitina de yema de huevo, y un polímero. Entre ellos, es preferible uno que puede formar un liposoma, tal como por ejemplo un fosfolípido natural tal como lecitina, un fosfolípido semisintético tal como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilaurilfosfatidilcolina (DLPC), o colesterol.

Se prefiere particularmente un componente que puede evitar la captura por el sistema reticuloendotelial, y ejemplos de los mismos incluyen lípidos catiónicos tales como cloruro de *N*-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamato (TMAG), *N,N',N'',N'''*-tetrametil-*N,N',N'',N'''*-tetrapalmitilespermina (TMTPS), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-*N*-[2(esperminacarboxamida)etil]-*N,N*-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de dioctadecildimetilamonio (DODAC), bromuro de didodecilamonio (DDAB), 1,2-dioleiloxi-3-trimetilamoniopropano (DOTAP), 3 $\beta$ -[*N*-(*N',N'*-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol), bromuro de 1,2-dimiristoiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), y cloruro de *O,O'*-ditetradecanoil-*N*-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil)dietafolamina (DC-6-14). Según la invención, el portador anterior tiene una forma tridimensional seleccionada del grupo que consiste en una micela, un liposoma, una microesfera, y una nanoesfera.

La unión de un retinoide al portador se efectúa por medio de un método químico y/o físico. La unión de un principio activo al portador o la inclusión del mismo en el portador también puede ser posible mezclando un principio activo y un componente que constituye el portador. La cantidad de retinoide en la composición de la presente invención puede ser, por ejemplo, de 0,01 a 1000 nmol/ $\mu$ l, y preferiblemente de 0,1 a 100 nmol/ $\mu$ l. Además, la cantidad de principio activo en la composición de la presente invención puede ser de, por ejemplo, 1 a 10000 ng/ $\mu$ l, y preferiblemente de 10 a 1000 ng/ $\mu$ l, o de 1 a 1000000  $\mu$ g/kg de peso corporal, y preferiblemente de 10 a 100000  $\mu$ g/kg de peso corporal. Las cantidades de retinoide y principio activo pueden, en algunos casos, encontrarse fuera de los intervalos anteriores según la actividad de estos componentes, la vía de administración de la composición, la frecuencia de administración, el sujeto al que se le administran, etc., y estos casos también están incluidos en el alcance de la presente invención. La unión de un retinoide y/o un principio activo a un portador o la inclusión de un principio activo en un portador puede llevarse a cabo antes de soportar un principio activo sobre el portador, puede llevarse a cabo mezclando simultáneamente un componente que constituye el portador, un retinoide, y un principio activo, o puede llevarse a cabo mezclando un portador que tiene un principio activo ya soportado en el mismo y un retinoide. Por tanto, también se describe en el presente documento un método para producir una composición farmacéutica para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico que incluye una etapa de unión de un retinoide a cualquier portador de unión a fármaco existente o portador que encapsula el fármaco, por ejemplo, una preparación de liposoma tal como DaunoXome<sup>(R)</sup>, Doxil, Caelyx<sup>(R)</sup>, o Myocet<sup>(R)</sup>.

La composición de la presente invención se encuentra en una forma tal que puede transportarse un principio activo

deseado a células que producen colágeno en tejido fibrótico como diana. La forma se selecciona del grupo que consiste en una micela, un liposoma, una microesfera, y una nanoesfera. En la presente invención, desde el punto de vista de una alta eficiencia de administración, amplia elección de sustancias a administrar, facilidad de preparación, etc., entre los anteriores, una forma de liposoma es preferible, y un liposoma catiónico que contiene un

5 lípido catiónico es particularmente preferible. Cuando la composición se encuentra en la forma de un liposoma, la razón molar de retinoide y lípido que constituye un liposoma es preferiblemente de 8:1 a 1:4, y más preferiblemente de 4:1 a 1:2, mientras se tiene en cuenta la eficiencia de la unión de un retinoide a un portador o la inclusión del mismo en un portador.

10 La composición de la presente invención puede contener un principio activo en el interior, puede tener un principio activo unido al exterior, o puede estar mezclado con un principio activo tal como se especifica en la reivindicación adjunta 1. Por tanto, la composición de la presente invención puede estar en forma de un complejo entre un liposoma y un principio activo, es decir, un *lipoplex*; según la vía de administración, la manera en la que se libera el fármaco, etc., la composición puede recubrirse con un material adecuado tal como por ejemplo un recubrimiento

15 entérico o un material de desintegración programada, o puede incorporarse en un sistema de liberación de fármaco adecuado.

El retinoide está presente en una forma en la que actúa de manera tal, que la composición que contiene un retinoide alcanza y/o se incorpora en una célula que produce colágeno, que es la célula diana, en tejido fibrótico a una

20 velocidad mayor y/o en una mayor cantidad que la de una composición que no contiene el retinoide, y esto puede confirmarse fácilmente, por ejemplo, añadiendo una composición marcada o que contiene marcador a un cultivo de células diana y analizando el sitio en el que el marcador está presente después de que haya transcurrido un tiempo predeterminado. En cuanto a la estructura, por ejemplo, si un retinoide se expone al menos parcialmente al exterior de la composición como muy tarde antes de que alcance la célula diana, pueden satisfacerse los requisitos

25 mencionados anteriormente. Puede evaluarse si un retinoide está expuesto o no al exterior de la composición poniendo en contacto la composición con una sustancia que se une específicamente a un retinoide, por ejemplo, una proteína de unión a retinol (RBP), etc., y examinando la unión a la composición.

Exponer un retinoide al menos parcialmente al exterior de la composición como muy tarde antes de que alcance una

30 célula diana puede llevarse a cabo, por ejemplo, ajustando la razón de composición del retinoide y el componente que constituye el portador. Además, cuando se utiliza una estructura lipídica tal como un liposoma como portador, por ejemplo, cuando se forma un complejo entre la estructura lipídica y el retinoide, puede usarse un método en el que la estructura lipídica se diluye en primer lugar en una disolución acuosa, y luego esto se pone en contacto, se mezcla, etc., con el retinoide. En este caso, el retinoide puede estar en un estado en el que se disuelve en un

35 disolvente, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como DMSO. La estructura lipídica a la que se hace referencia en este caso significa cualquier estructura tridimensional, por ejemplo, una estructura que tiene una forma lineal, de tipo película, esférica, etc. y que contiene un lípido como componente constituyente, y los ejemplos de la misma incluyen un liposoma, una micela, una microesfera lipídica y una nanoesfera lipídica. La posibilidad de aplicación a otro portador de fármaco del mismo agente diana que el que se usa para seleccionar como diana un liposoma se describe en, por ejemplo, Zhao y Lee, Adv Drug Deliv Rev. 2004; 56 (8): 1193-204, Temming *et al.*, Drug Resist

40 Updat. 2005; 8(6): 381-402, etc.

Además de una sustancia reductora de colágeno, la composición de la presente invención puede contener una sustancia que reduce un estímulo fibrótico como principio activo, o puede usarse en combinación con una sustancia

45 de este tipo. Los ejemplos de la sustancia que reduce un estímulo fibrótico incluyen un antioxidante, un promotor de la circulación sanguínea, un fármaco antiinflamatorio, un fármaco antivirico, un antibiótico, un agente antiparasitario, un fármaco de protección del hígado, un fármaco colerético, y un supresor de la apoptosis. Estas sustancias pueden seleccionarse según sea adecuado según el tejido que se seleccione como diana y el cuadro clínico.

La composición de la presente invención puede contener un marcador. El marcaje permite que se monitorice el éxito/fallo de la administración a células diana, el aumento/disminución de células diana, etc., y es útil no solo a nivel de prueba e investigación, sino también a nivel clínico. El marcador puede seleccionarse de cualquier marcador conocido para un experto en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier radioisótopo, material magnético, sustancia que se une a una sustancia marcada (por ejemplo, un anticuerpo), sustancia fluorescente, fluoróforo, sustancia quimioluminiscente, o enzima. El marcaje puede fijarse a al menos un componente constituyente de la composición

55 de la presente invención; por ejemplo, puede fijarse a uno o más de un principio activo, el retinoide, y un componente que constituye el portador, o el marcaje puede contenerse en la composición como componente distinto de lo anterior.

El término "para células que producen colágeno en tejido fibrótico" o "para la administración a células que producen colágeno en tejido fibrótico" en la presente invención significa que es adecuado usar células que producen colágeno en tejido fibrótico como células diana, y esto incluye por ejemplo ser capaz de administrar una sustancia a dichas células a una mayor velocidad, una mayor eficiencia, y/o en una mayor cantidad que para otras células, por ejemplo, células normales. Por ejemplo, el portador para células que producen colágeno en tejido fibrótico o el portador para la administración a células que producen colágeno en tejido fibrótico puede administrar un principio activo a células que producen colágeno en tejido fibrótico a una velocidad y/o eficiencia de al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces,

65

al menos 1,3 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces y, además, al menos 3 veces en comparación con otras células. Puesto que la composición de la presente invención contiene un agente diana para células que producen colágeno en tejido fibrótico, puede elaborarse como composición para células que producen colágeno en tejido fibrótico o para la administración a células que producen colágeno en tejido fibrótico.

5 La composición de la presente invención es una composición farmacéutica para su uso en medicina y puede administrarse por medio de diversos tipos de vías, incluyendo vías orales y parenterales; los ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, vías orales, entéricas, intravenosas, intramusculares, subcutáneas, locales, 10 intrahepáticas, intrabiliares, intrapulmonares, traqueobronquiales, intratraqueales, intrabronquiales, nasales, intrarrectales, intraarteriales, intraportales, intraventriculares, intramedulares, ganglio intralinfático, intralinfáticas, intracerebrales, intratecales, intracerebroventriculares, transmucosales, percutáneas, intranasales, intraperitoneales e intrauterinas, y puede formularse en una forma de dosificación que es adecuada para cada vía de administración. Una forma de dosificación y método de formulación de este tipo pueden seleccionarse según sea adecuado a partir 15 de cualquier forma y método conocidos (véase, por ejemplo, "Hyojun Yakuzaigaku" (Standard Pharmaceutical Science), ed. por Yoshiteru Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003).

Los ejemplos de formas de dosificación adecuadas para la administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, gránulo, comprimido, cápsula, líquido, suspensión, emulsión, gel y jarabe, y los ejemplos de formas de dosificación 20 adecuadas para la administración parenteral incluyen inyecciones tales como una disolución inyectable, una suspensión inyectable, una emulsión inyectable, y una inyección en una forma que se prepara en el momento de su uso. Las formulaciones para la administración parenteral pueden estar en una configuración tal como una suspensión o disolución aséptica, isotónica acuosa o no acuosa.

La composición de la presente invención puede proporcionarse en cualquier configuración, pero desde el punto de 25 vista de la estabilidad de almacenamiento, se proporciona en una configuración que puede prepararse en el momento de su uso, por ejemplo, en una configuración que permite que un médico y/o un farmacéutico, un enfermero, otro paramédico, etc., la prepare en el lugar de tratamiento o en las vecindades del mismo. En este caso, la composición de la presente invención se proporciona por medio de uno o más recipientes que contienen al menos 30 un elemento constituyente esencial de la misma, y se prepara antes de su uso, por ejemplo, dentro de las 24 horas antes de su uso, preferiblemente dentro de las 3 horas antes de su uso, y más preferiblemente inmediatamente antes de su uso. Cuando se lleva a cabo la preparación, puede usarse un reactivo, un disolvente, equipo de preparación, etc., que están normalmente disponibles en un lugar de preparación según sea adecuado.

También se describe en el presente documento un kit de preparación para la composición, incluyendo el kit uno o 35 más recipientes que contienen de manera individual o en combinación un principio activo y/o un agente diana o sustancia que constituye el portador opcional, y también se refiere a un elemento constituyente necesario para la composición proporcionado en forma de un kit de este tipo. El kit puede contener, además de lo anterior, instrucciones, un medio de registro electrónico tal como un CD o DVD, etc., relacionado con un método preparativo y 40 método de administración para la composición de la presente invención, etc. Además, el kit puede incluir todos los elementos constituyentes para completar la composición de la presente invención, pero no tiene por qué incluir siempre todos los elementos constituyentes. Por tanto, el kit no tiene por qué incluir un reactivo o un disolvente que está normalmente disponible en un lugar de tratamiento médico, una planta experimental, etc. tal como, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, o una disolución de glucosa.

45 También se describe en el presente documento un método para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico, incluyendo el método una etapa de administración de una cantidad eficaz de la composición o la sustancia reductora de colágeno de la presente invención a un sujeto que lo requiere. La cantidad eficaz a la que se hace referencia en este caso es una cantidad que provoca la regeneración de tejido normal en tejido fibrótico.

50 La cantidad de matriz extracelular puede determinarse cuantitativamente mediante diversos métodos tales como, por ejemplo, sin limitación, análisis de imágenes de una imagen especialmente teñida de matriz extracelular o medición de un marcador de matriz extracelular. Por ejemplo, puede determinarse cuantitativamente colágeno midiendo la cantidad de un marcador de colágeno tal como hidroxiprolina, o sometiendo tejido a tinción de colágeno (por 55 ejemplo, tinción tricrómica de Masson, tinción de azán, tinción con rojo sirio, tinción de Elastica van Gieson, etc.) y llevando a cabo un análisis de imágenes. La reducción en porcentaje de matriz extracelular en tejido fibrótico puede ser, por ejemplo, de al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 % y, además, al menos el 75 % en comparación con un caso en el que la composición de la presente invención no se ha administrado. En este caso, el caso en el que la composición de la presente invención no se ha administrado incluye no solo un caso en el que la administración en sí no se ha llevado 60 a cabo, sino también un caso en el que se ha administrado un vehículo solo, un caso en el que se ha administrado una composición correspondiente a la composición de la presente invención excepto porque no contiene el principio activo y un caso en el que se ha administrado una composición correspondiente a la composición de la presente invención excepto porque no contiene el retinoide (denominada controles negativos). Además, puede evaluarse la regeneración de tejido normal mediante observación histológica o mediante administración de células madre 65 marcadas a tejido fibrótico y llevando a cabo un estudio de seguimiento de la misma.

La cantidad eficaz es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que supera el beneficio de la administración. Tal cantidad puede determinarse según sea adecuado mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas o mediante una prueba en un animal modelo tal como un ratón, una rata, un perro, o un cerdo, y tales métodos de prueba los conoce bien un experto en la técnica. Además, la dosis del fármaco usada en el método descrito en el presente documento la conoce un experto en la técnica, o puede determinarse según sea adecuado mediante la prueba mencionada anteriormente, etc. Como animal modelo para fibrosis, pueden usarse diversos modelos tales como un modelo de cirrosis hepática obtenido por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), suero porcino, dimetilnitrosamina (DMN), una dieta deficiente en metionina-colina (MCDD), concanavalina A (Con A), ligadura de las vías biliares, etc., un modelo de fibrosis pulmonar obtenido por bleomicina (BLM), etc., un modelo de fibrosis pancreática obtenido por dicloruro de dibutilestano, etc., y un modelo de mielofibrosis tal como un ratón transgénico con trombopoyetina (TPO) (Leukemia Research 29: 761-769, 2005).

En el método descrito en el presente documento, la dosis específica de la composición o sustancia reductora de colágeno administrada puede determinarse mientras se tienen en cuenta diversas condiciones con respecto al sujeto que requiere el tratamiento, tales como por ejemplo la gravedad de los síntomas, el estado de salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de administración, un medicamento usado en combinación, reacción al tratamiento, cumplimiento con el tratamiento, etc.

Como vía de administración, existen diversas vías que incluyen tanto la administración oral como parenteral, y los ejemplos de las mismas incluyen vías orales, entéricas, intravenosas, intramusculares, subcutáneas, locales, intrahepáticas, intrabiliares, intrapulmonares, traqueobronquiales, intratraqueales, intrabronquiales, nasales, intrarrectales, intraarteriales, intraportales, intraventriculares, intramedulares, ganglio intralinfático, intralinfáticas, intracerebrales, intratecales, intracerebroventriculares, transmucosales, percutáneas, intranasales, intraperitoneales e intrauterinas.

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

En el método descrito en el presente 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 algún trastorno, pero normalmente significa un sujeto que tiene tejido fibrótico o tejido que tiene el riesgo de volverse fibrótico. Los ejemplos de un sujeto de este tipo incluyen, pero no se limitan a, un sujeto afectado por la fibrosis de órgano anterior o que tiene el riesgo de verse afectado y un sujeto cuyo tejido recibe un estímulo fibrótico o tiene el riesgo de recibirlo.

Se describe adicionalmente en el presente documento un método para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico, incluyendo el método una etapa de reducción de colágeno en el tejido fibrótico y una etapa de formación de un espacio para crecimiento y diferenciación celular en el tejido fibrótico.

En el presente método, la reducción de colágeno en tejido fibrótico y la formación de un espacio para crecimiento y diferenciación celular pueden llevarse a cabo administrando la composición de la presente invención a tejido fibrótico.

### [Ejemplos]

La presente invención se explica en más detalle por medio de los ejemplos a continuación, pero solo son ilustraciones de la presente invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas. En los ejemplos a continuación, se expresan los datos como valores promedio ( $\pm$  desviación estándar). Se llevaron a cabo múltiples comparaciones entre un grupo de control y otro grupo por medio de la prueba de Dunnett.

#### Ejemplo 1. Preparación de VA-lip siRNA

##### (1) Preparación de siRNA

Como cadena sentido y cadena antisentido de siRNA (Hokkaido System Science Co., Ltd., Sapporo, Japón) dirigidas a la secuencia de bases de gp46 (n.º de registro GenBank M69246), que es el homólogo de rata de HSP47 humana, una chaperona molecular común a los colágenos (tipos I a IV), se usaron las siguientes a continuación.

A: GUUCCACCAUAAGAUGGUAGACAACAG (siRNA de cadena sentido empezado por la base 757 en la secuencia de bases de gp46, SEQ ID NO: 1)

B: GUUGUCUACCAUCUUAUGGUGGAACAU (siRNA de cadena antisentido, SEQ ID NO: 2)

Como siRNA aleatorio (también denominado siRNA reorganizado al azar), se usaron los siguientes a continuación.

C: CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUGCAG (siRNA de cadena sentido, SEQ ID NO: 3)

D: GCAAUGAAGCCGGUCUAGCGAAUCGAU (siRNA de cadena antisentido, SEQ ID NO: 4)

5 En algunos experimentos, se usaron cadenas codificantes que tenían 6'-carboxifluoresceína (6-FAM) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugados al extremo 5'. Se confirmó mediante una búsqueda BLAST que estas secuencias no tenían homología con otro mRNA de rata conocido.

## 10 (2) Preparación de VA-lip siRNA

Como lípido catiónico, se adquirió un liposoma catiónico (LipoTrust) que contenía cloruro de *O,O'*-ditetradecanoil-*N*-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil) dietanolamina (DC-6-14), colesterol, y dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) a una razón molar de 4:3:3 de Hokkaido System Science Co., Ltd. (Sapporo, Japón). Antes de su uso, se preparó el liposoma a una concentración de 1 mM (DC-6-14) añadiendo agua doblemente destilada (DDW) a una mezcla de lípidos liofilizada con agitación. Con el fin de preparar un liposoma acoplado a VA, se mezclaron 200 nmol de vitamina A (retinol, Sigma, EE. UU.) disueltos en DMSO con una suspensión de liposoma (100 nmol como DC-6-14) en un tubo de 15 1,5 ml con agitación a 25 °C. Con el fin de preparar un liposoma acoplado a VA que soporta siRNA<sub>Agp46</sub> (VA-lip-siRNA<sub>Agp46</sub>), se añadió una disolución de siRNA<sub>Agp46</sub> (580 pmol/ml en DDW) a la disolución de liposomas acoplada a retinol con agitación a temperatura ambiente. La razón molar de siRNA y DC-6-14 fue de 1:11. Con el fin de 20 obtener una dosis deseada *in vitro*, se reconstituyó el VA-lip siRNA usando solución salina tamponada con fosfato (PBS).

## 25 Ejemplo 2. Experimento de terapia regenerativa usando una rata modelo de fibrosis hepática

### 25 (1) Preparación de rata modelo de fibrosis hepática

Se preparó una rata modelo de fibrosis hepática sometiendo una rata SD macho (peso corporal de 150 a 200 g) (Slc Japan, Shizuoka, Japón) a una ligadura de las vías biliares común, y se sometió un individuo el día 28 tras la 30 ligadura al presente experimento. La rata modelo presente estaba en un estado en el que se provocó colestasis mediante la ligadura de las vías biliares común y se expuso continuamente el tejido hepático a un estímulo fibrótico.

### (2) Preparación de células madre hepáticas de rata marcadas con GFP

35 Se recogieron células madre hepáticas de rata marcadas con GFP del hígado de una rata transgénica con GFP de 4 semanas de edad (Slc Japan). En primer lugar, se perfundieron una disolución de EGTA y una disolución de colagenasa en toda la rata transgénica con GFP, entonces se extrajo el hígado, y se cortó finamente el hígado extraído y luego se filtró usando un filtro de células (diámetro de poro 100  $\mu$ m). Se añadieron disolución salina equilibrada de Hank (HBSS) + disolución de albúmina sérica bovina al 0,25 % (BSA) a la suspensión de células 40 obtenida, y se sometió la mezcla a centrifugación a 4 °C y 500 rpm durante 2 minutos. Se recogió el sobrenadante y se sometió a centrifugación a 4 °C y 1300 rpm durante 5 minutos. Después de que se eliminara el sobrenadante, se añadió tampón MACS<sup>®</sup> (separación magnética de células activadas) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EE. UU.) al precipitado y se mezcló. Después de que se contara el número de células, se llevó a cabo MACS<sup>®</sup> usando un anticuerpo anti-CD45 de ratón conjugado con FITC (BD Pharmingen), un anticuerpo anti-CD133 policlonal de conejo 45 (Abcam), y un anticuerpo anti-EpCAM monoclonal de ratón (Santa Cruz), y CD133-positivo, se obtuvieron células positivas para EpCAM y negativas para CD45 y se usaron como células madre hepáticas de rata en el presente experimento.

### 50 (3) Tratamiento de rata modelo de fibrosis hepática

Se trasplantaron localmente las células madre hepáticas marcadas con GFP preparadas en (2) en ratas modelo de fibrosis hepática preparadas en (1) a una concentración de  $2 \times 10^6$  recuentos en 200  $\mu$ l de medio de DME/F12.

55 A partir de las 24 horas después del trasplante de las células madre hepáticas, se administró siRNA<sub>Agp46</sub> encapsulado en liposoma acoplado a vitamina A (VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub>) o VA-lip siRNA reorganizado al azar como simulación por medio de la vena de la cola cada dos días un total de 12 veces. La concentración de siRNA administrado fue de 0,75 mg/kg de peso corporal de rata. La razón molar de vitamina A, liposoma (LipoTrust, Hokkaido System Science Co., Ltd., Sapporo, Japón), y siRNA fue de 11,5:11,5:1.

### 60 (4) Tinción tisular

65 24 horas después de la 12<sup>a</sup> administración de VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> en (3) (es decir, el día 52 después de la ligadura de las vías biliares común), se extrajo el hígado de la rata con ligadura de las vías biliares a la que se le habían trasplantado las células madre hepáticas que expresaban GFP. Después de que el hígado extraído se incrustara usando compuesto OCT, se prepararon secciones congeladas. Se fijaron las secciones de hígado usando paraformaldehído al 4 %. Se sometieron algunas de las secciones a tinción de azán mediante un método

convencional. Se sometieron algunas de las secciones a bloqueo con PBS que contenía suero de cabra al 5 %, se lavaron con PBS, y luego se hicieron reaccionar a 4 °C durante la noche usando un anticuerpo anti-actina de músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) monoclonal de ratón (Sigma), un anticuerpo anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) monoclonal de ratón (Sigma), un anticuerpo anti-albúmina policlonal de conejo (MP Biomedicals), un anticuerpo anti-CK19 monoclonal de ratón (Novocastra), y un anticuerpo anti-cadherina endotelial vascular (ve-CAD, cadherina endotelial vascular) monoclonal de ratón (Santa Cruz). Después de lavar con PBS, se hicieron reaccionar con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa555 y un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con Alexa555 (ambos de Invitrogen) a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de lavar con PBS, se incrustaron usando ProLong<sup>(R)</sup> Gold con DAPI (Invitrogen) y se examinaron por medio de un microscopio de fluorescencia. En lugar de la reacción con anticuerpo de cabra anti-conejo, se hicieron reaccionar algunas porciones de las secciones con un anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA (Dako) y luego se sometieron a coloración por medio de diaminobencidina (DAB) y además a tinción nuclear por medio de hematoxilina.

### Resultados

La figura 1 muestra el aspecto de hígados extraídos de las ratas de prueba e imágenes teñidas con azán de secciones representativas del mismo. En el grupo al que se le había administrado VA-lip siRNA reorganizado al azar, el hígado se contrajo, la superficie fue irregular, se observó ampliamente la acumulación de matriz extracelular que se había teñido de azul en el tejido en la imagen teñida con azán, y se alteró la estructura lobular hepática. Por otro lado, en el grupo al que se le había administrado VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub>, no hubo contracción evidente, la superficie fue lisa, apenas hubo acumulación de matriz extracelular en el tejido, y hubo una reducción obvia en el tamaño de la región fibrótica en comparación con el grupo tratado con VA-lip siRNA reorganizado al azar. Además, se observó claramente que se había recuperado una estructura lobular hepática normal, en la que los sinusoides discurren radialmente desde la vena central.

La figura 2 muestra imágenes teñidas con DAB de anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA. Las porciones azules son núcleos teñidos con hematoxilina y las porciones marrón oscuro son regiones positivas para  $\alpha$ -SMA. La  $\alpha$ -SMA es conocida como marcador para células estrelladas activadas, y se piensa que en las regiones positivas para  $\alpha$ -SMA están presentes células estrelladas activadas. En el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> hubo una marcada reducción en las células estrelladas activadas en comparación con VA-lip siRNA reorganizado al azar.

La figura 3 muestra imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP de sitios de trasplante de células madre hepáticas marcadas con GFP. En el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub>, se observó coloración con GFP en aproximadamente el 80 % de la región, mientras que en el grupo tratado con VA-lip siRNA reorganizado al azar apenas hubo coloración.

La figura 4 muestra imágenes de campo claro y de fluorescencia de GFP de sitios de trasplante de células madre hepáticas marcadas con GFP. En el grupo tratado con VA-lip siRNA reorganizado al azar, la forma de las células se volvió borrosa debido a la acumulación de matriz extracelular, particularmente en áreas unidas a vasos sanguíneos, y los sinusoides discurren de modo aleatorio, mientras que en el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> la forma de las células era clara y se observó una estructura de sinusoides en la que discurren radialmente desde la vena central. Además, en el grupo tratado con VA-lip siRNA reorganizado al azar no hubo coloración con GFP, mientras que en el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> se observó coloración con GFP en todo el tejido.

La figura 5 es una comparación entre imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente por un anticuerpo anti-GFAP en el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> (figura 5A es un aumento de 200x y la figura 5B es un aumento de 400x). GFAP es una proteína conocida como marcador para células estrelladas hepáticas en un estado de reposo. Las células que expresaban GFAP no expresaban GFP.

La figura 6 es una comparación entre imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente mediante un anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA en el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> a un aumento de 200x. Las células que expresaban  $\alpha$ -SMA no expresaban GFP. Los resultados de las figuras 5 y 6 sugieren que no se derivan células estrelladas hepáticas a partir de células madre hepáticas.

La figura 7 es una comparación entre imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente mediante anticuerpo anti-albúmina en el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> a un aumento de 200x. La albúmina es un marcador para hepatocitos, y muchas de las células que expresaban GFP expresaban albúmina.

La figura 8 es una comparación entre imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente mediante anticuerpo anti-CK19 en el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> a un aumento de 200x. CK19 es un marcador para células epiteliales de las vías biliares, y células positivas para CK-19 que formaban las vías biliares expresaban GFP.

La figura 9 es una comparación entre imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente mediante anticuerpo anti-ve-CAD en el grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> (figura 9A es un aumento

de 200x y la figura 9B es un aumento de 400x). La ve-CAD es conocida como marcador para células endoteliales de vasos sanguíneos, y en algunas de las células que expresaban GFP, se observaron células que expresaban ve-CAD.

- 5 La figura 10 es una comparación entre imágenes de fluorescencia de DAPI y GFP y una imagen teñida de manera fluorescente mediante anticuerpo anti-albúmina en un sitio del grupo tratado con VA-lip siRNA<sub>gp46</sub> en el que las células no se habían trasplantado a un aumento de 200x. En el sitio en el que las células no se habían trasplantado, no hubo células que expresaban GFP.

## 10 Discusión

Puesto que las células que expresaron GFP eran células derivadas de las células madre hepáticas trasplantadas, debido a la administración de VA-lip siRNA<sub>gp46</sub>, en el sitio de trasplante de células la región fibrótica se redujo en tamaño y las células madre hepáticas se diferenciaron para dar hepatocitos, células epiteliales de las vías biliares, y células endoteliales de vasos sanguíneos, mostrando por tanto que se regeneró tejido hepático normal. Es decir, ha quedado claro que el tratamiento que implica la administración de VA-lip siRNA<sub>gp46</sub> no solo cura la fibrosis hepática, sino que también induce la regeneración del hígado. Además, el resultado de que no pudieron detectarse células madre hepáticas en el grupo tratado con VA-lip siRNA reorganizado al azar (figura 3) sugiere que la reducción en tamaño de la región fibrótica debido a VA-lip siRNA<sub>gp46</sub> está plenamente implicada en el crecimiento y la diferenciación de células madre hepáticas.

### Ejemplo 3. Administración específica de células estrelladas por medio de VA

#### (1) Aislamiento de células estrelladas pancreáticas de rata (PSC)

25 Se aislaron células estrelladas pancreáticas de rata (PSC) usando un método de centrifugación de gradiente de densidad según un informe previo (Apte *et al.* Gut 1998; 43: 128-133). Se sometió a ensayo la pureza mediante examen microscópico, autofluorescencia de VA endógena, y un método inmunocitoquímico que usa un anticuerpo monoclonal (1:25, Dako) para desmina, que es una proteína de reticulación de actina de músculo. Se sometió a ensayo la viabilidad de células mediante exclusión con azul de tripano. Tanto la pureza como la viabilidad celular superaron el 95 %. Se cultivaron las células en medio de Iscove modificado con Dulbecco (medio de Iscove modificado con Dulbecco: IMDM) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) a 37 °C con el 95 % de aire/el 5 % de CO<sub>2</sub> en un ambiente humidificado.

#### 35 (2) Análisis de distribución intracelular de VA-lip siRNA<sub>gp46</sub>-FAM

Se sembraron pPSC de rata (células estrelladas pancreáticas primarias, PSC primarias) de manera que hubo  $1 \times 10^4$  células por cámara en un cubreobjetos de cámara Lab-Tek. Se añadió VA-lip siRNA<sub>gp46</sub>-FAM o Lip siRNA<sub>gp46</sub>-FAM a las células de manera que la concentración de siRNA final fue de 50 nM. Se cultivaron las células en DMEM que contenía FBS al 10 % durante 30 minutos, y se intercambié el medio con medio nuevo. 30 minutos después y 2 horas después del tratamiento, se lavaron las células con PBS tres veces, y se fijaron tratando con paraformaldehído al 4 % a 25 °C durante 15 minutos. Después de la fijación, se lavaron las células con PBS tres veces y se expusieron a ProLong<sup>(R)</sup> Gold con DAPI (Invitrogen) durante 1 minuto para teñir así el núcleo. Se sometió a ensayo la ubicación intracelular de siRNA<sub>gp46</sub> marcado con FAM usando un microscopio de fluorescencia (Keyence, BZ-8000).

#### 45 (3) Análisis de FACS de VA-lip siRNA<sub>gp46</sub>-FAM

Se trataron pPSC de rata ( $1 \times 10^4$  células) con VA-lip siRNA<sub>gp46</sub>-FAM (siRNA 50 nM) en presencia de FBS al 10 % y se cultivaron durante 30 minutos. Para un ensayo de bloqueo, antes de que se añadiera VA-lip siRNA<sub>gp46</sub>-FAM, se trataron  $1 \times 10^4$  células con un anticuerpo anti-RBP de ratón (10 µg/ml, BD Pharmingen), o IgG<sub>1</sub> de ratón (10 µg/ml, Dako) como control negativo, durante 30 minutos. Se sometió a ensayo la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células VA-lip siRNA<sub>gp46</sub> tratadas con FAM usando FACScalibur con software CellQuest (Becton Dickinson).

#### 55 (4) Inmunotransferencia de tipo Western

Con el fin de evaluar el efecto de atenuación de siRNA<sub>gp46</sub>, se llevó a cabo un experimento de inmunotransferencia de tipo Western. Específicamente, se separaron extractos de proteína de PSC tratados respectivamente con VA-lip siRNA<sub>gp46</sub> (1 nM, 5 nM, 50 nM), VA-lip-siRNA aleatorio (50 nM), y Lip-siRNA<sub>gp46</sub> (50 nM) durante 30 minutos por medio de gel de poliacrilamida-SDS 4/20, se transfirieron a película de nitrocelulosa, se sondearon con un anticuerpo (Stressgen) para HSP47 (gp46) o un anticuerpo (Cell Signaling) para β-actina, y se marcaron con un anticuerpo unido a peroxidasa (Oncogene Research Products, Boston, MA) como anticuerpo secundario. Finalmente, se visualizaron las células por medio de un sistema de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL).

65 Además, con el fin de confirmar la duración de la supresión de la expresión de gp46, se trataron PSC con VA-lip

siRNAgp46 (50 nM) durante 30 minutos y luego se cultivaron durante 24 horas, 48 horas, 72 horas, y 96 horas, y tras esto se extrajo la proteína y se sometió a un experimento de inmunotransferencia de tipo Western de la misma manera tal como se describió anteriormente, junto con uno 30 minutos tras el tratamiento con VA-lip-siRNA aleatorio (50 nM).

5

#### (5) Determinación cuantitativa de la producción de colágeno

Se sembraron pPSC de rata sobre una placa de cultivo tisular de 6 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo en DMEM que contenía FBS al 10 %. Después de cultivar durante 24 horas, se trataron las pPSC de rata con VA-lip siRNAgp46 (siRNA 50 nM) y VA-lip siRNA aleatorio (siRNA 50 nM). Se cultivaron las células en DMEM que contenía FBS al 10 % durante 30 minutos, y luego se intercambió el medio con medio nuevo. 72 horas después del tratamiento, se lavaron las células con PBS tres veces, y se tiñó colágeno depositado en el pocillo usando rojo sirio (Bicolor, Belfast, R. U.) según un informe previo (Williams *et al.* Gut 2001; 49: 577-583). Se eliminó tinte sin unir mediante lavado, y se disolvió el complejo unido en hidróxido de sodio al 0,5 %. Se llevó a cabo un análisis cuantitativo de colágeno mediante análisis de intensidad de absorción a 540 nm, y se expresó el resultado como porcentaje relativo a un control no tratado.

10

15

#### Resultados

La figura 11 muestra imágenes de fluorescencia de la distribución intracelular de siRNA marcado con FAM. Las dos imágenes a la izquierda son imágenes de fluorescencia de PSC tratadas con VA-lip siRNAgp46-FAM, y las dos imágenes a la derecha son imágenes de fluorescencia de PSC tratadas con Lip siRNAgp46-FAM. Las dos imágenes superiores son imágenes 30 minutos después del tratamiento, y las dos imágenes inferiores son imágenes 2 horas después del tratamiento. 30 minutos después del tratamiento con VA-lip siRNAgp46-FAM, se observó una leve fluorescencia verde debido a FAM en un patrón granular dentro del citoplasma, y 2 horas después del tratamiento, se observó un patrón granular más oscuro en una región alrededor del núcleo. En comparación con ello, en el grupo tratado con Lip siRNAgp46-FAM, no se observó fluorescencia verde 30 minutos después del tratamiento, y la fluorescencia alrededor del núcleo 2 horas después del tratamiento fue leve.

20

25

La figura 12 muestra gráficos de los resultados de los análisis de FACS. Se muestran los resultados del grupo no tratado, el grupo tratado con Lip siRNAgp46-FAM, el grupo tratado con VA-lip siRNAgp46-FAM, el grupo tratado con VA-lip siRNAgp46-FAM + anticuerpo anti-RBP, y el grupo tratado con Lip siRNAgp46-FAM + anticuerpo anti-RBP en secuencia desde arriba. En los resultados de los análisis de FACS, en comparación con el grupo tratado con VA-lip siRNAgp46-FAM, en el grupo tratado con VA-lip siRNAgp46-FAM + anticuerpo anti-RBP, se suprimió la intensidad de fluorescencia al mismo nivel que la del grupo tratado con Lip siRNAgp46-FAM, lo que sugiere que la incorporación de VA-lip siRNAgp46 en PSC está mediada por un receptor de RBP.

30

35

La figura 13A muestra los resultados de inmunotransferencia de tipo Western, que muestran la diferencia en el efecto de supresión según la concentración. En las células tratadas con VA-lip siRNAgp46, se observó que la supresión de la expresión de gp46 dependía de la concentración de VA-lip siRNAgp46, estando la expresión casi completamente suprimida a 50 nM, mientras que no se observó supresión de la expresión con VA-lip siRNA aleatorio o Lip siRNAgp46.

40

La figura 13B muestra el resultado de inmunotransferencia de tipo Western para determinar la duración del efecto de supresión. Cuando se trata con VA-lip siRNAgp46, en células cultivadas durante 72 horas después del tratamiento, se observó una supresión marcada de gp46. Por tanto, se confirmó que el efecto de suprimir la expresión de gp46 continuó durante al menos 72 horas después del tratamiento.

45

La figura 14 es un gráfico que muestra la determinación cuantitativa de la cantidad de colágeno producida después de 72 horas en células no tratadas y células tratadas con VA-lip siRNAgp46 y VA-lip siRNA aleatorio respectivamente. En comparación con las células no tratadas y las células tratadas con VA-lip siRNA aleatorio, cuando se tratan con VA-lip siRNAgp46, se confirmó una supresión marcada de la producción de colágeno.

50

#### Discusión

A partir de los resultados anteriores puede observarse que, *in vitro*, se incorpora VA-lip siRNAgp46 específicamente en PSC mediante incorporación mediada por receptor de RBP para, por tanto, suprimir la expresión de gp46, y como resultado, la producción de colágeno se suprime marcadamente. Esto sugiere que, en páncreas afectado por fibrosis pancreática, VA-lip siRNAgp46 puede reducir colágeno.

55

60

#### Ejemplo 4. Experimento de terapia regenerativa de rata modelo de fibrosis pancreática

##### (1) Preparación de rata modelo de fibrosis pancreática

Se usaron ratas Lewis macho que tenían un peso corporal de 150 a 200 g (Charles River). Según un informe previo (Inoue *et al.* Páncreas 2002; 25: e64-70), se disolvió dicloruro de dibutilestaño (dicloruro de dibutilestaño, DBTC) en

65

1 parte de etanol y luego se mezcló con 2 partes de glicerol y 2 partes de sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar así una disolución (disolución de DBTC), y se administró una cantidad correspondiente a 5 mg (DBTC)/kg (peso corporal) a la arteria carótida derecha de la rata por medio de una jeringa.

#### 5 (2) Localización *in vivo* de VA-lip siRNAg46-FITC en páncreas de rata y otros tejidos

Después de 43 días desde el inicio de la administración de DBTC, en el momento en el que se observó fibrosis pancreática grave, se administró 1  $\mu$ l/g de peso corporal de VA-lip siRNAg46-FITC o Lip siRNAg46-FITC a la rata tratada con DBTC por medio de la vena de la cola. Se llevó a cabo la administración a presión normal tres veces cada dos días con 0,75 mg/kg de siRNA cada vez. 24 horas después de la administración final, se sacrificó la rata mediante perfusión con solución salina fisiológica, y se extrajeron el páncreas y otros órganos (el hígado, el pulmón, el bazo, y la retina). Se fijaron las muestras de órgano con paraformaldehído al 10 %, y se tiñeron secciones incrustadas en parafina usando tinción de azán-Mallory. Se llevó a cabo tinción inmunohistoquímica mediante el método de polímero de dextrano que usa cada uno de un anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA monoclonal (1:1000, Sigma), un anticuerpo anti-CD68 (1:500, Dako), y un anticuerpo anti-FITC (1:500, Abcam) y por medio de un kit Envision (Dako), y se llevaron a cabo la coloración por medio de DAB (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y la tinción nuclear por medio de disolución de hematoxilina de Gill (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) posteriores.

#### 20 (3) Inmunotransferencia de tipo Western

Con el fin de evaluar la duración de la supresión de la expresión por medio de siRNAg46 *in vivo*, se sometieron extractos de proteína del páncreas 0, 1, 2, 3, y 4 días después de la administración intravenosa de VA-lip siRNAg46 a inmunotransferencia de tipo Western de la misma manera que en el ejemplo 3.

#### 25 (4) Tratamiento de siRNAg46 *in vivo*

Se usaron tres grupos de ratas ( $n = 6$  por grupo) para la evaluación histológica. 43 días después de la administración de DBTC, se trató cada grupo con administración de PBS, VA-lip siRNA aleatorio, y VA-lip siRNAg46 10 veces respectivamente (0,75 mg/kg de siRNA, administrado 10 veces cada dos días). Se llevaron a cabo todas las administraciones por medio de la vena de la cola a presión normal con una cantidad de 1  $\mu$ l/g de peso corporal. Se fijó el páncreas con paraformaldehído al 10 % y se incrustó en parafina, y luego se tiñó una sección usando tinción de azán-Mallory y tinción de hematoxilina-eosina. Se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica mediante el método de polímero de dextrano usando un anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA monoclonal (1:1000, Sigma) y por medio de un kit Envision (Dako), y posteriormente se llevaron a cabo la coloración por medio de DAB (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) y la tinción nuclear por medio de disolución de hematoxilina de Gill (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Con el fin de llevar a cabo una determinación cuantitativa precisa de regiones teñidas por medio de azán-Mallory, hematoxilina-eosina, y  $\alpha$ -SMA, se seleccionaron aleatoriamente seis campos de bajo aumento (100x) para cada sección pancreática de rata y se examinaron usando un microscopio (Axioplan 2; Carl Zeiss, Inc). Se tomó una imagen digital por medio de un sistema de grabación de vídeo que usaba un sistema de cámara de TV digital (Axiocam High Resolution color, Carl Zeiss, Inc.). Se determinó la proporción de la región teñida por azán-Mallory y  $\alpha$ -SMA en una fotografía de microscopio digital usando un programa de análisis de software automático (KS400, Carl Zeiss, Inc.).

#### 45 (5) Ensayo de hidroxiprolina

Se determinó el contenido de hidroxiprolina mediante el método de Weidenbach según un informe previo (Weidenbach *et al.* Digestion 1997; 58: 50-57). Resumidamente, se centrifugaron residuos de células pancreáticas a 3000 rpm durante 15 minutos, se hidrolizó completamente un sedimento en HCl 6 N a 96 °C durante 16 horas, se ajustó el pH a de 6,5 a 7,5, y se sometió de nuevo a centrifugación (a 3000 rpm durante 15 minutos). Se secaron 25  $\mu$ l de una alícuota a 60 °C, y se disolvió el precipitado en 1,2 ml de isopropanol al 50 % y se incubó en 200 ml de tampón de ácido acético/ácido cítrico (pH 6,0) que contenía disolución de cloramina T al 0,56 % (Sigma). Después de incubar a 25 °C durante 10 minutos, se añadió 1 ml de reactivo de Ehrlich, y se incubó la mezcla a 50 °C durante 90 minutos. Después de enfriar, se midió la absorción a una longitud de onda de 560 nm.

#### 55 (6) Actividad colagenasa de residuos de células pancreáticas

Se llevó a cabo la medición de la actividad colagenasa mediante un método modificado de un informe previo (Iredale *et al.* J. Clin. Invest. 1998; 102: 538-549). Resumidamente, se trituró páncreas extraído de una rata de tipo natural y una rata modelo de fibrosis pancreática y se congeló con nitrógeno líquido en hielo en un tampón de muestra (50 mM Tris, pH 7,6, Triton X-100 al 0,25 %, NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM) que contenía un inhibidor de proteasa de serina y tiol (PMSF 0,1 mM, leupeptina 10  $\mu$ M, pepstatina A 10  $\mu$ M, aprotinina 25  $\mu$ g/ml, yodoacetamida 0,1 mM). Se centrifugó el residuo celular a 4 °C y 14000 g durante 30 minutos, eliminando así el residuo celular y agregado de proteína. Se determinó la actividad colagenasa en los residuos de células pancreáticas usando un kit conjugado de colágeno de ensayo de colagenasa EnzCheck (Molecular Probes) según el manual de instrucciones. En paralelo a lo mismo, se llevó a cabo un análisis usando un control negativo y control positivo adecuados (colagenasa bacteriana),

y se expresaron los resultados como fluorescencia de colágeno degradado por mg de proteína (determinado mediante densidad óptica a 280 nm en comparación con patrón de albúmina sérica).

### Resultados

5 En secciones del páncreas consecutivas, se inmunotñieron células estrelladas activadas y siRNAgp46-FITC, y los resultados fueron los que en el grupo tratado con VA-lip siRNAgp46-FITC, en una región en la que se agregaron células estrelladas activadas (células positivas para  $\alpha$ -SMA), se identificaron células positivas para FITC, mientras que en el grupo tratado con Lip siRNAgp46-FITC, el número de células positivas para FITC identificadas en una  
10 región positiva para  $\alpha$ -SMA fue muy pequeño (figura 15 A y B).

También se observaron células positivas para FITC en una región positiva para  $\alpha$ -SMA en una muestra de hígado (figura 15C). Este resultado coincide con el conocimiento de que DBTC no solo induce fibrosis pancreática sino también cirrosis hepática. En otros órganos de rata, incluyendo el pulmón y el bazo, se tiñeron pocas células con FITC en una región con infiltración de macrófagos (células positivas para CD68) (figura 15D y E), lo que sugería la  
15 incorporación no específica de siRNAgp46-FITC mediante macrófagos. La retina fue negativa en la tinción de FITC (figura 15F), y esto coincide con el conocimiento obtenido en VA-lip siRNAgp46-FAM en cirrosis hepática. Se piensa que el globo ocular constituye probablemente un sistema independiente debido a la baja permeabilidad de la barrera sangre-retina.

20 Se confirmó a partir de los resultados de inmunotransferencia de tipo Western que, también *in vivo*, el efecto de siRNAgp46 en la supresión de la expresión de gp46 continuó durante al menos 3 días (figura 16A y B).

25 Se evaluó una rata tratada con DBTC a la que se le había administrado VA-lip siRNAgp46 10 veces mediante tinción de azán-Mallory (figura 17 A). La región fibrótica tal como se determinó mediante análisis de imágenes computarizado estaba marcadamente reducida en una muestra del grupo tratado con VA-lip siRNAgp46 en comparación con una muestra de control ( $P < 0,01$ ) (figura 17B). Este resultado coincidió con datos que mostraban una clara supresión de hidroxiprolina en el páncreas del grupo tratado con VA-lip siRNAgp46 (figura 17C).

30 Con el fin de evaluar el cambio en células estrelladas en el páncreas de rata tras el tratamiento con VA-lip siRNAgp46, se sometió una muestra de páncreas de rata tras el tratamiento con VA-lip siRNAgp46 a tinción de  $\alpha$ -SMA, y el resultado mostró que el número de células positivas para  $\alpha$ -SMA disminuyó marcadamente en comparación con el de una rata tratada con Lip siRNAgp46 y PBS (figura 18A y B).

35 Se midió la actividad colagenasa en residuos de células pancreáticas de una rata de tipo natural y una rata tratada con VA-lip siRNAgp46 tratada con DBTC basándose en el supuesto de que la mejora de fibrosis posterior a la supresión de la secreción de colágeno nuevo de PSC mediante administración de VA-lip siRNAgp46 implica colagenasa derivada de células inflamatorias y PSC por sí mismas, y los resultados se muestran en la tabla a continuación.

40 [Tabla 1]

Tabla 1. Actividad colagenasa en residuos de células pancreáticas de rata	
	Actividad colagenasa (unidades arbitrarias de fluorescencia/mg proteína)
Rata normal	20500±300
Rata DBTC (día 29)	26300±700
Rata DBTC (día 57)	25400±1000

Los valores numéricos son valores promedio  $\pm$  desviación estándar (n=5 para cada grupo)

45 Tal como se muestra en la tabla, la actividad colagenasa en la rata tratada con DBTC fue casi la misma que la de la rata de tipo natural.

50 Cuando se comparan las imágenes de tinción de hematoxilina-eosina de las muestras pancreáticas de las ratas tratadas con VA-lip siRNAgp46 y Lip siRNAgp46 tratadas con DBTC en el día 65, en la rata tratada con VA-lip siRNAgp46, se observó una clara normalización de tejido pancreático, aunque no fue completa, mientras que en el tejido de rata tratada con Lip siRNAgp46 no se observó normalización (figura 19 A). Esto coincidió con la normalización del peso pancreático de la rata tratada con VA-lip siRNAgp46 tratada con DBTC (figura 19 B).

### Discusión

55 A partir de los resultados mencionados anteriormente, puede observarse que debido al tratamiento con VA-lip siRNAgp46, siRNAgp46 se incorpora específicamente en células estrelladas pancreáticas activadas (aPSC) para, por tanto, suprimir la expresión de gp46; como resultado, se suprime la secreción de colágeno de aPSC, y se presenta así un marcado efecto en la mejora de fibrosis pancreática. Además, se observó una marcada disminución

en aPSC, que se debe probablemente a una reducción en la secreción de colágeno. Es de especial mención que el tratamiento con VA-lip siRNAg46 no solo mejora la fibrosis pancreática, sino que también induce la regeneración de tejido pancreático. Teniendo esto en cuenta junto con los resultados del ejemplo 2 anterior, estos resultados sugieren que reducir el colágeno acumulado en tejido fibrótico permite que se regenere tejido normal de manera no específica de tejido a partir de tejido fibrótico.

#### Ejemplo 5. Importancia de espacio para el crecimiento y la diferenciación de células madre

Se cocultivaron células estrelladas hepáticas activadas (aHSC) con diversas densidades de células progenitoras hepáticas, y se examinó el efecto de la existencia de espacio alrededor de las células en la diferenciación de células progenitoras hepáticas. Como células progenitoras hepáticas, se usaron células madre hepáticas de rata marcadas con GFP obtenidas en el ejemplo 2 (2) anterior, y como aHSC, se usaron HSC obtenidas de una rata SD, cultivadas y a las que se les sometió a un pase. Se obtuvieron las aHSC y se cultivaron tal y como sigue. En primer lugar, se perfundió una rata SD con disolución de EGTA y una disolución de colagenasa, se extrajo el hígado, y se cortó finamente el hígado extraído y se filtró usando un filtro de células (diámetro de poro 100  $\mu\text{m}$ ). Se añadió una disolución HBSS + BSA al 0,25 % a la suspensión celular así obtenida, y se centrifugó la mezcla a 4 °C y 500 rpm durante 2 minutos. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 4 °C y 1300 rpm durante 5 minutos. Después de que se eliminara el sobrenadante, se añadió una HBSS + BSA al 0,25 %, y se añadió una disolución de Nycodenz al 28,7 % (Axis Shield, Oslo, Noruega) de manera que la concentración de Nycodenz fue del 13,2 %, y se mezcló. Después de poner en capas una disolución de HBSS + BSA al 0,25 %, se llevó a cabo centrifugación a 4 °C y 1400xg durante 20 minutos. Después de que se completara la centrifugación, se recogió una capa intermedia y se cultivó usando medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + medio de suero bovino fetal al 10 % (FBS) durante 5 días. Se llevó a cabo el pase el quinto día de cultivo, y se usaron las células en el presente experimento.

Se sembraron aHSC en insertos de cultivo celular (diámetro de poro 0,4  $\mu\text{m}$ , BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo y se cultivaron en una incubadora a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub> usando DMEM + FBS al 10 % durante 48 horas. 2 días después de sembrar las aHSC, se sembraron células progenitoras hepáticas en una placa de 24 pocillos (BD Falcon) equipada con un cubreobjetos recubierto con colágeno de tipo I (IWAKI, Tokio, Japón) a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo (baja densidad) y  $5 \times 10^5$  células/pocillo (confluente). Posteriormente, se insertaron los insertos de cultivo celular mencionados anteriormente que contenían aHSC en los pocillos de una placa de 24 pocillos y se cocultivaron en una incubadora a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub> durante 10 días (como medio, DME/F12 (medio de Eagle modificado con Dulbecco/nutriente F-12 Ham) + FBS al 10 % + ITS (se usó insulina 10 mg/l, transferrina 5,5 mg/l, selenio 0,67  $\mu\text{g/l}$ ) + dexametasona 0,1  $\mu\text{M}$  + nicotinamida 10 mM +  $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu\text{g/ml}$  + L-glutamina 2 mM + Hepes 5 mM).

En el día 10 día de cocultivo, se llevó a cabo una inmunotinción usando un anticuerpo anti-albúmina (policlonal de conejo, MP Biomedicals), se obtuvieron imágenes de colonias positivas para albúmina usando un microscopio invertido (Nikon) a un aumento de 100x, y se calculó el área de colonias positivas para albúmina basándose en la imagen obtenida usando el software NIS-Elements (Nikon). Los resultados se muestran en la figura 20.

En un experimento diferente, en el día 10 de cocultivo, se llevó a cabo la medición de crecimiento celular usando un sistema de ensayo de proliferación celular Premix WST-1 (Takara, Tokio, Japón) con un lector de microplaca (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Los resultados se muestran en la figura 21.

A partir de los resultados mostrados en la figura 20, fue evidente que, cuando se cocultivaron aHSC con células progenitoras hepáticas sembradas a una baja densidad, las células progenitoras hepáticas se diferenciaban para dar un gran número de hepatocitos positivos para albúmina, pero cuando las células progenitoras hepáticas fueron confluyentes, solo un número muy pequeño se diferenció para dar hepatocitos. Cuando se monocultivaron células progenitoras hepáticas, no se diferenciaron para dar hepatocitos positivos para albúmina. Además, tal como se muestra en la figura 21, cuando se sembraron las células progenitoras hepáticas a la misma densidad que antes, la potencia de proliferación de las mismas fue menor en condiciones confluyentes que en condiciones de baja densidad.

A partir de los resultados anteriores, se ha encontrado que las células estrelladas activadas inducen el crecimiento y la diferenciación de células madre, y la existencia de un espacio físico alrededor de las células madre tiene un importante efecto sobre el crecimiento y la diferenciación de células madre. Cuando esto se tiene en cuenta junto con los resultados de los ejemplos anteriores, se muestra que una sustancia reductora de colágeno provoca una reducción de tejido fibroso en tejido fibrótico, se forma un espacio alrededor de las células madre, y como resultado las células crecen y se diferencian regenerando así tejido normal.

#### **Lista de secuencias**

<110> NITTO DENKO CORPORATION

<120> Composición para regenerar tejido normal a partir de tejido fibrótico

<130> Documento PCT2468ND  
 <150> Documento JP2010-175920  
 <151> 05-08-2010  
 5  
 <150> Documento JP2010-230020  
 <151> 12-10-2010  
 <160> 4  
 10  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 27  
 15  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> hebra sentido de gp46 siRNA  
 20  
 <400> 1  
**guuccaccau aagaugguag acaacag** 27  
 <210> 2  
 25  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30  
 <223> hebra antisentido de gp46 siRNA  
 <400> 2  
**guugucuacc aucuuauggu ggaacau** 27  
 35  
 <210> 3  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40  
 <223> hebra sentido de siRNA aleatorio  
 <400> 3  
**cgauucgcua gaccggcuuc auugcag** 27  
 45  
 <210> 4  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> hebra antisentido de siRNA aleatorio  
 <400> 4  
 55  
**gcaaugaagc cggucuagcg aaucgau** 27

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica para su uso en la regeneración de tejido normal mediante crecimiento y diferenciación de células madre en un espacio formado debido a una reducción de colágeno acumulado en tejido fibrótico, en la que el tejido fibrótico recibe continuamente un estímulo fibrótico, en la que la composición comprende una sustancia reductora de colágeno y un retinoide, en la que la sustancia reductora de colágeno se une a o se incluye en un portador seleccionado del grupo que consiste en una micela, un liposoma, una microesfera y una nanoesfera, en la que el retinoide se une al portador por medio de un método químico y/o físico, y en la que el retinoide administra específicamente la sustancia reductora de colágeno a células que producen colágeno.
2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la sustancia reductora de colágeno se selecciona del grupo que consiste en un supresor de la producción de colágeno por células que producen colágeno, un promotor de la descomposición de colágeno y un supresor de un inhibidor de la descomposición de colágeno.
3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que el supresor de la producción de colágeno por células que producen colágeno se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de TGF $\beta$ , HGF o una sustancia que promueve la producción del mismo, un ligando de PPAR $\gamma$ , un inhibidor de angiotensina, un inhibidor de PDGF, relaxina o una sustancia que promueve la producción de la misma, una sustancia que inhibe la producción y secreción de un componente de matriz extracelular, un supresor de la actividad celular, un supresor del crecimiento celular y una sustancia que induce apoptosis.
4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que el promotor de la descomposición de colágeno es colagenasa o un promotor de la producción de colagenasa.
5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que el supresor de un inhibidor de la descomposición de colágeno es un inhibidor de TIMP.

FIG. 1

TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS A RATA CON LIGADURA DE LAS VÍAS BILIARES Y TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNAg46

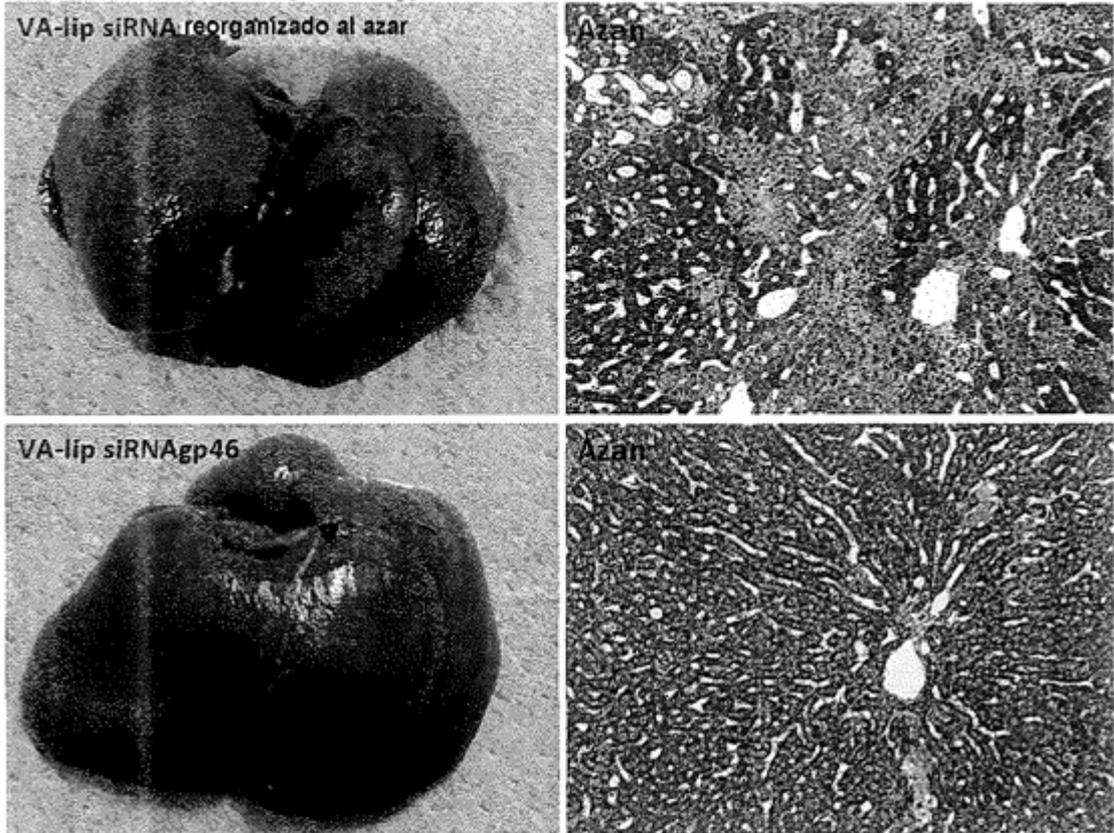


FIG. 2

TINCIÓN DE  $\alpha$ -SMA

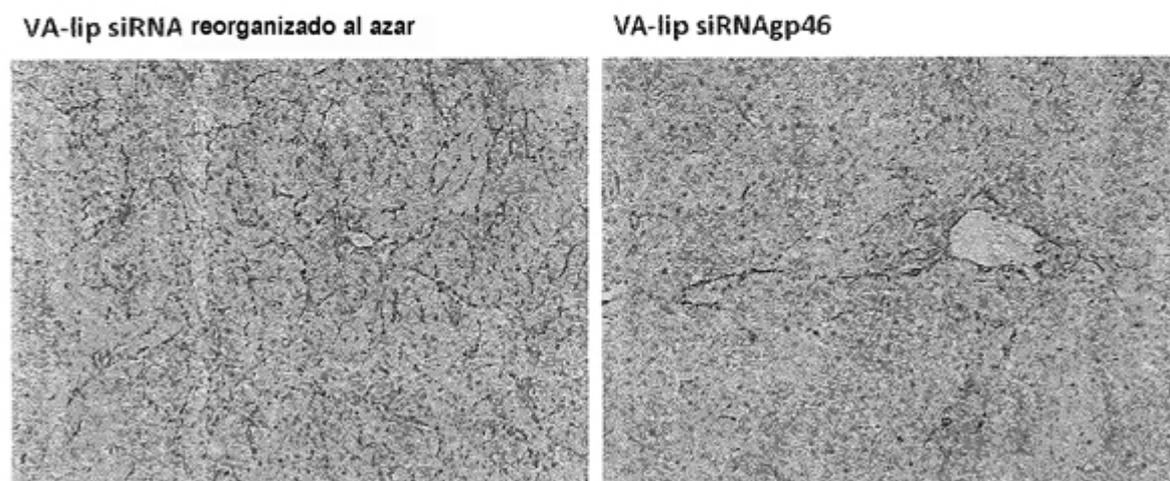


FIG. 3

**TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg**

Animal: ratas con BDL (una a la que se le habían trasplantado células madre hepáticas separadas de rata GFP-tg)

siRNA: siRNA<sub>Agp46</sub>, siRNA reorganizado al azar

Número de administraciones de siRNA: 12 veces

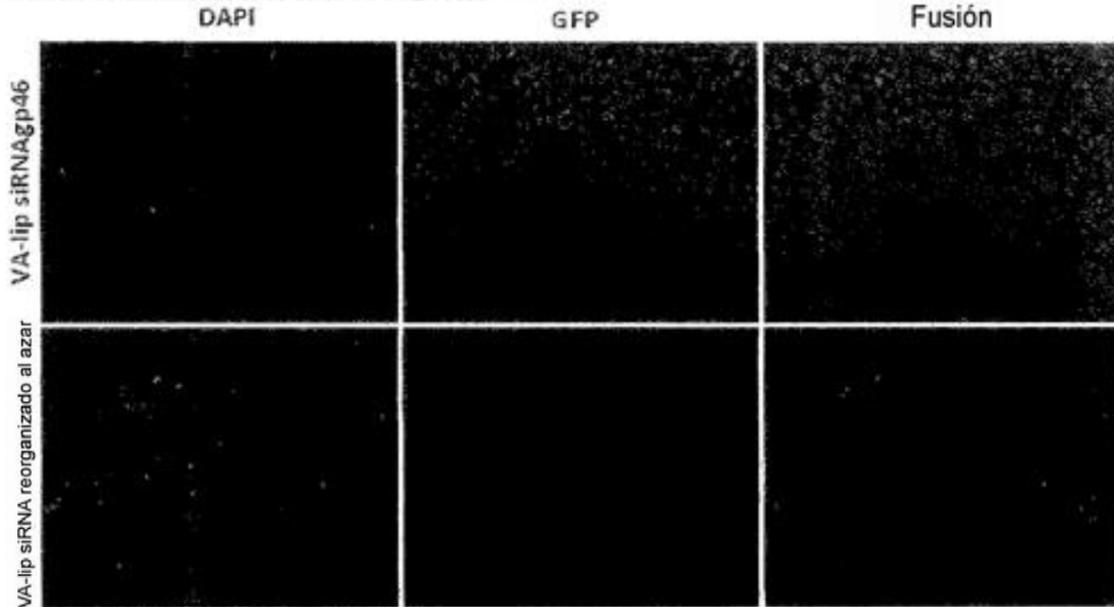


FIG. 4

**TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS A RATA CON LIGADURA DE LAS VÍAS BILIARES Y TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>Agp46</sub>**

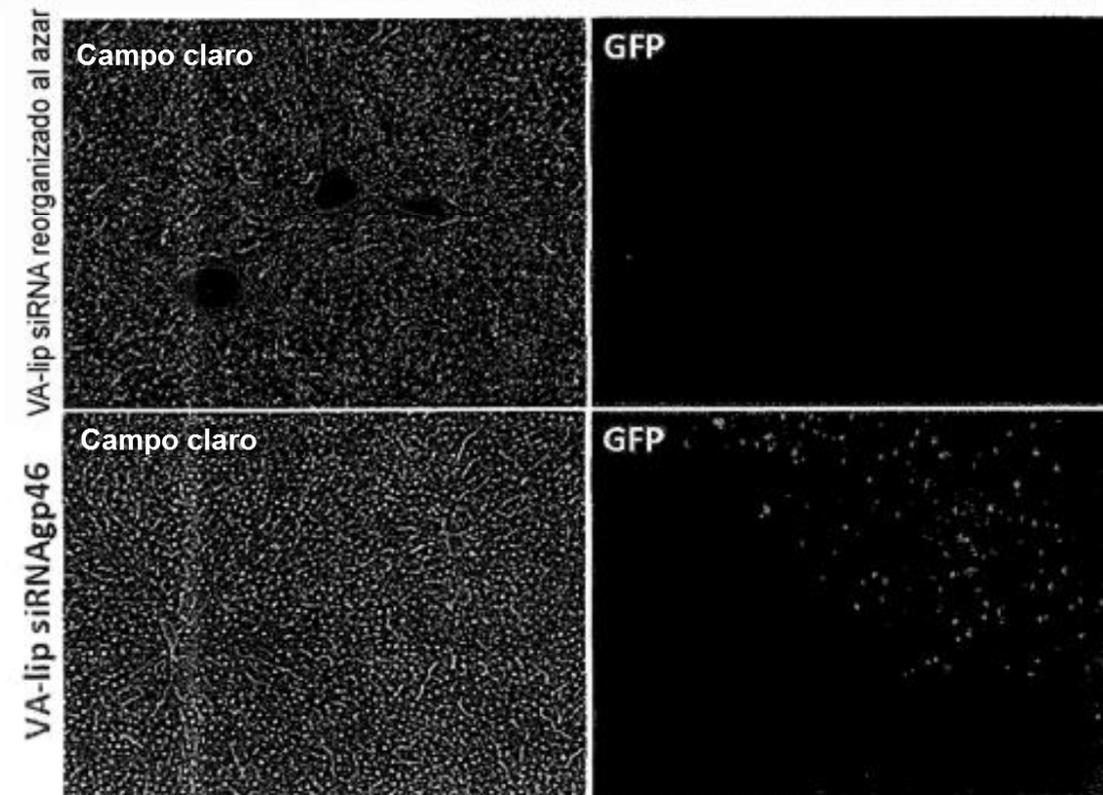


FIG. 5A

TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>gfp46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg

VA-lip siRNA<sub>gfp46</sub> (× 200) Sitio de trasplante de células: GFAP (marcador de HSC quiescentes)

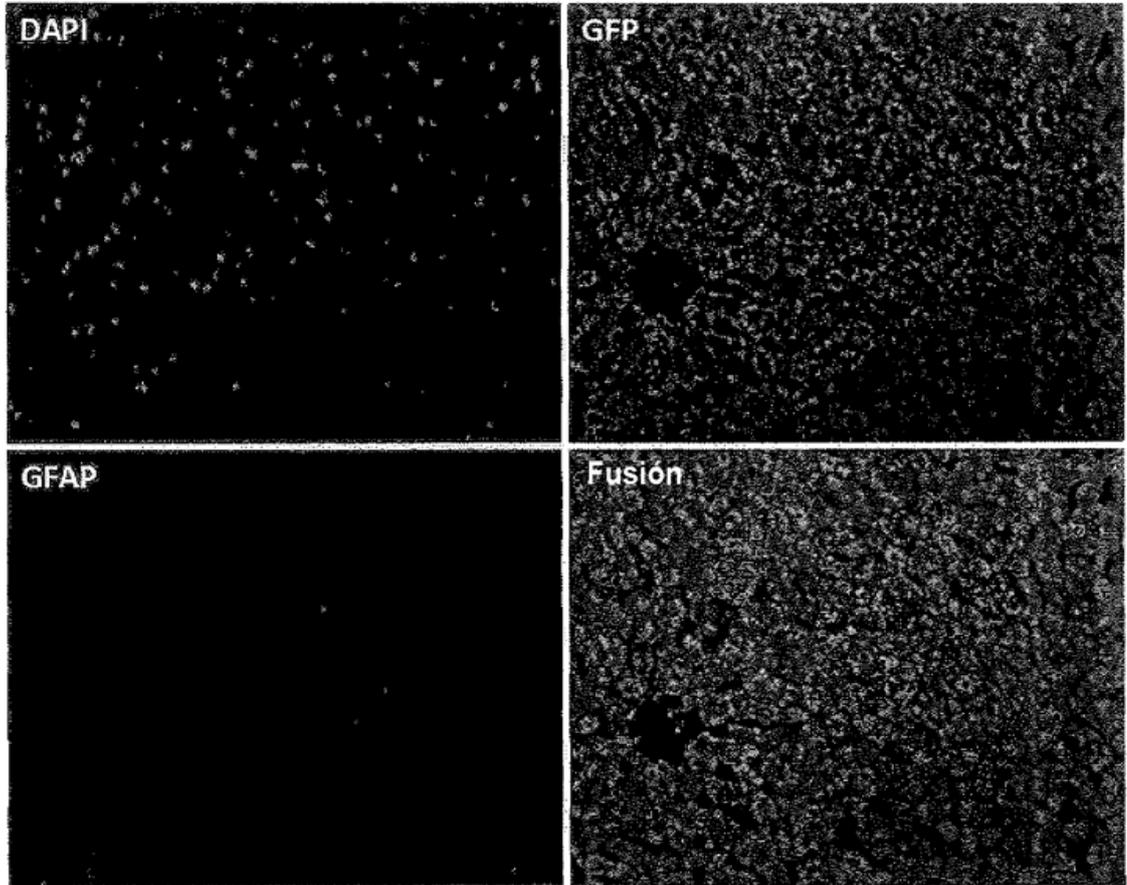


FIG. 5B

TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>gfp46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg

VA-lip siRNA<sub>gfp46</sub> (× 400) Sitio de trasplante de células: GFAP (marcador de HSC quiescentes)

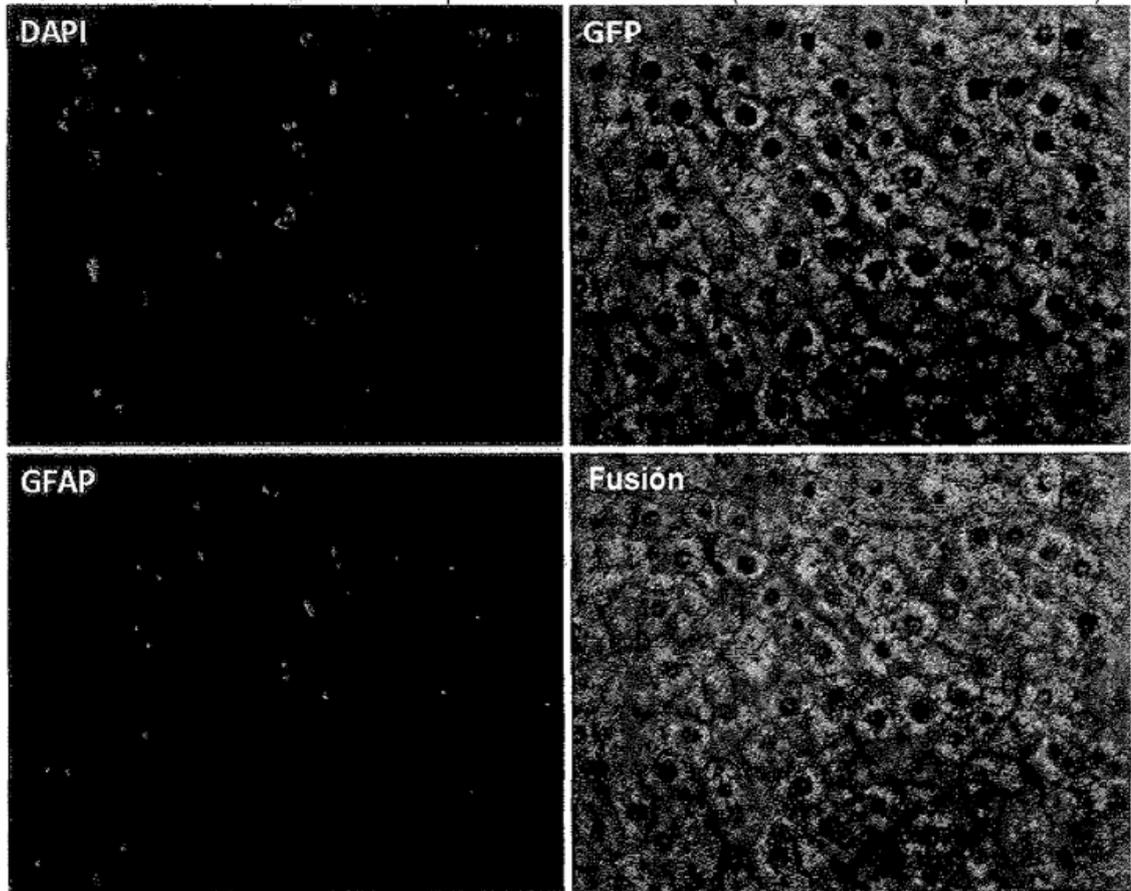


FIG. 6

TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>gfp46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg

VA-lip siRNA<sub>gfp46</sub> (× 200) Sitio de trasplante de células:  $\alpha$ -SMA (marcador de HSC activadas)

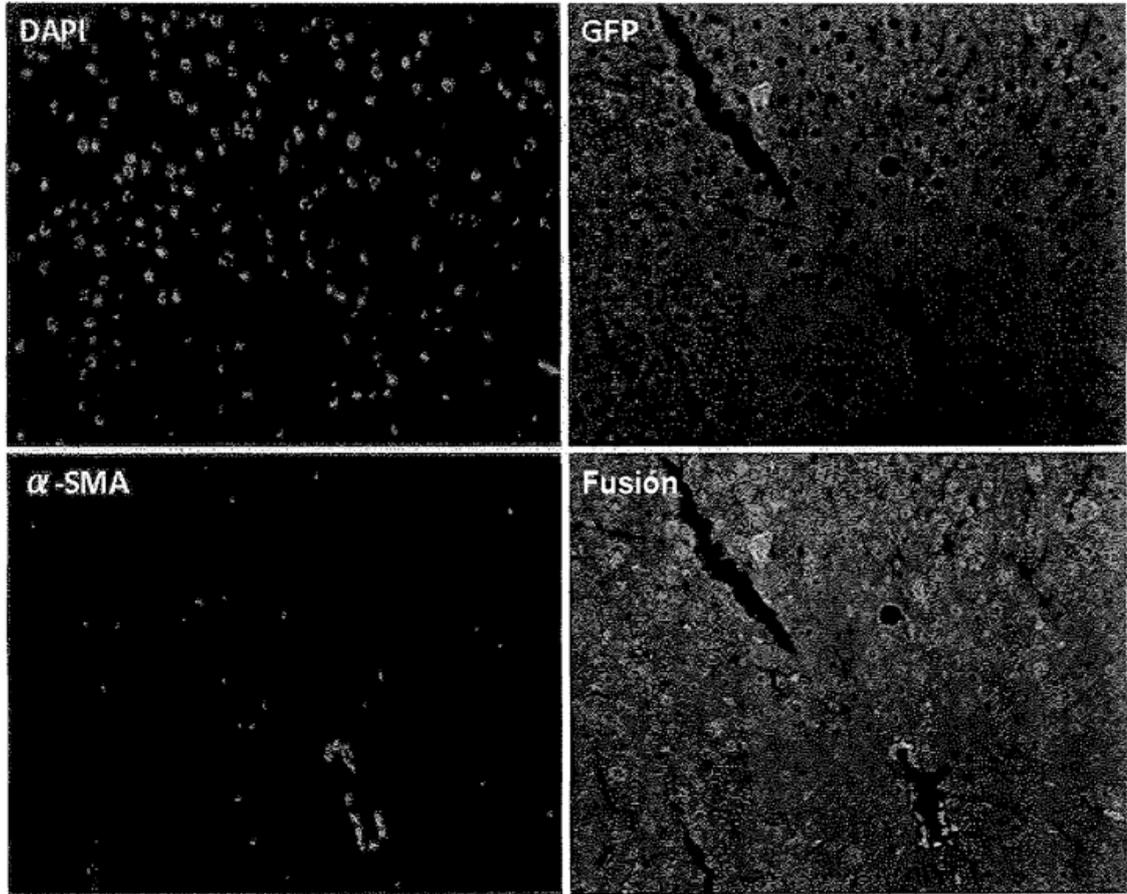


FIG. 7

TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>g46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg

VA-lip siRNA<sub>g46</sub> (×200) Sitio de trasplante de células: Albúmina (marcador de hepatocitos)

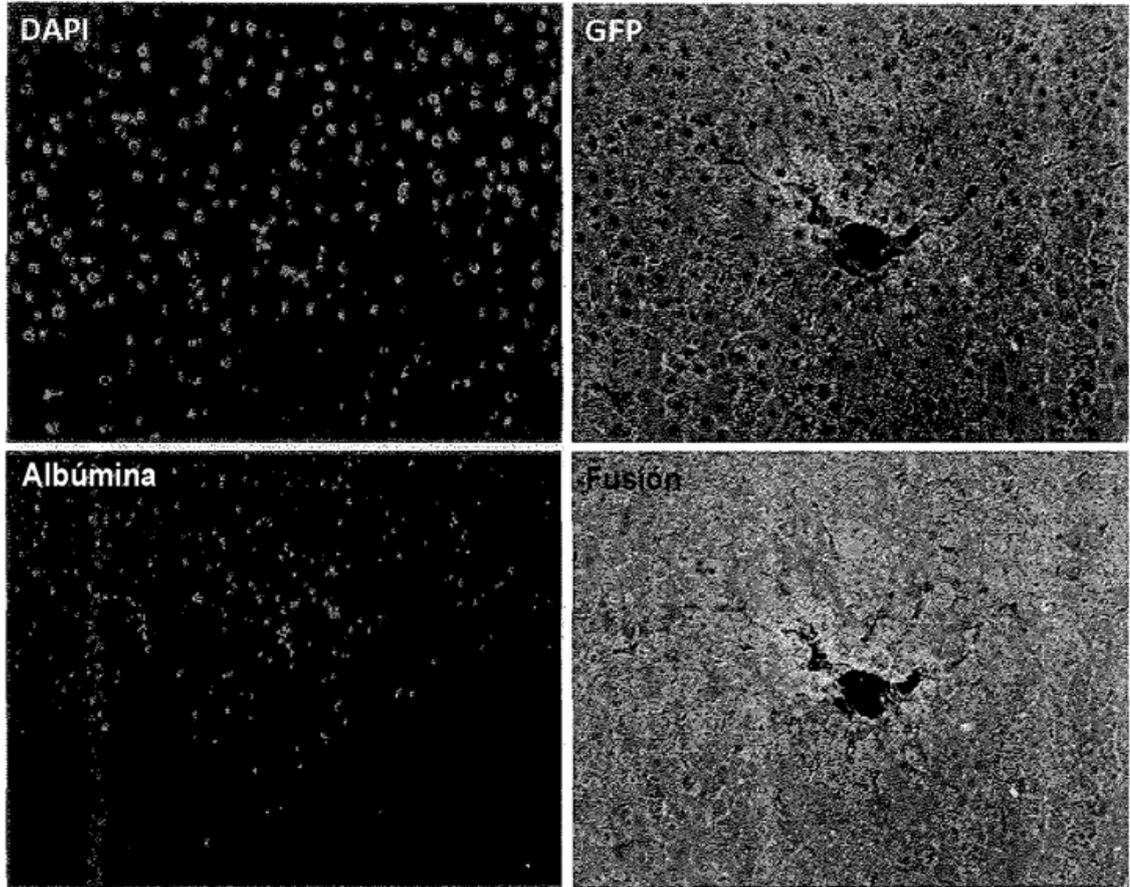


FIG. 8

TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>gfp46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg

VA-lip siRNA<sub>gfp46</sub> (×200) Sitio de trasplante de células: CK19 (marcador de células epiteliales de las vías biliares)

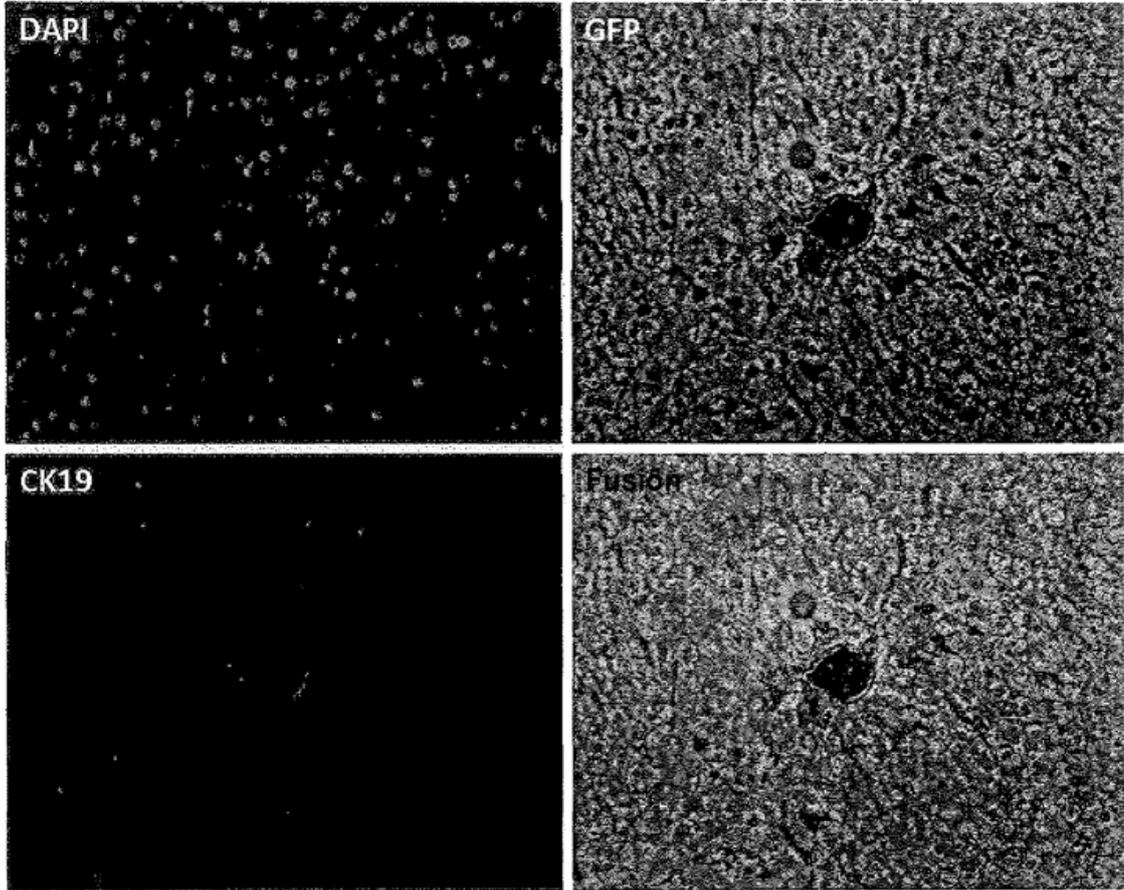


FIG. 9A

TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>g46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg

VA-lip siRNA<sub>g46</sub> (×200) Sitio de trasplante de células: ve-CAD (marcador de células endoteliales de vasos sanguíneos)

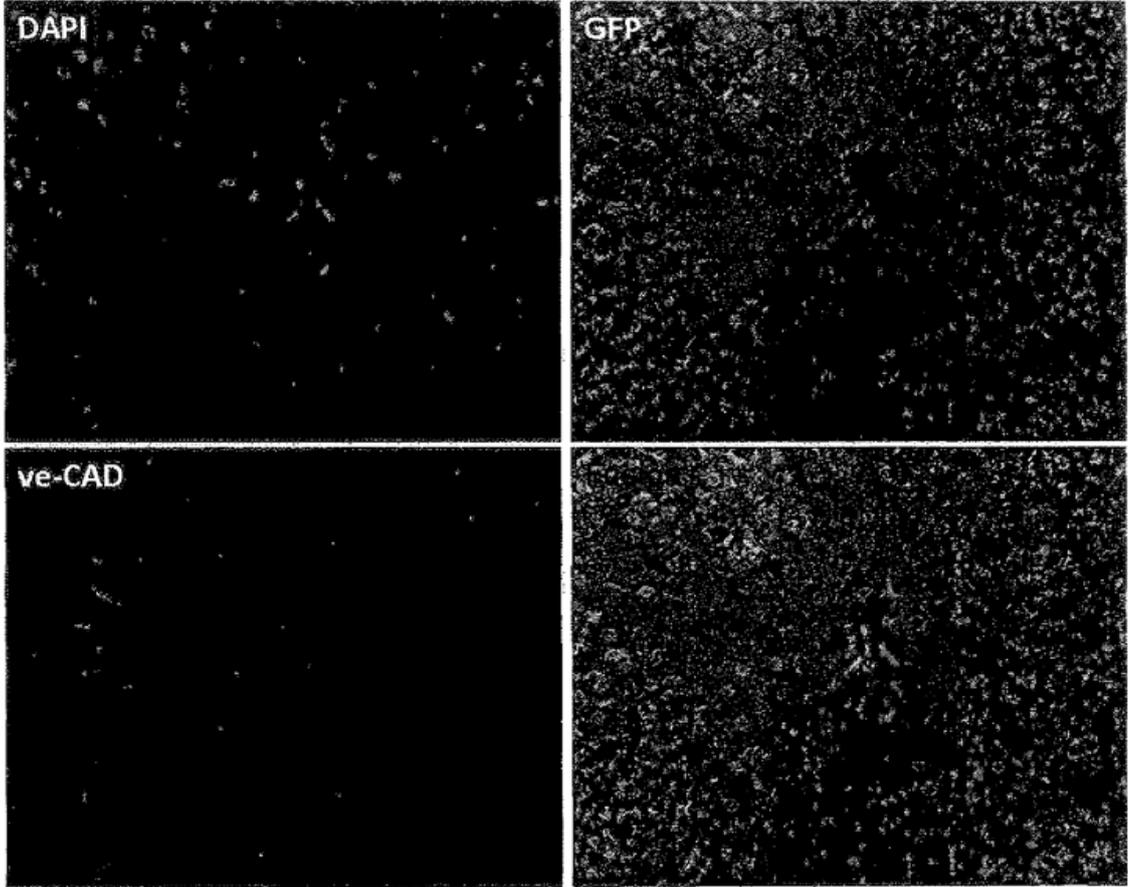


FIG. 9B

TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>g46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg

VA-lip siRNA<sub>g46</sub> (× 400) Sitio de trasplante de células: ve-CAD (marcador de células endoteliales de vasos sanguíneos)

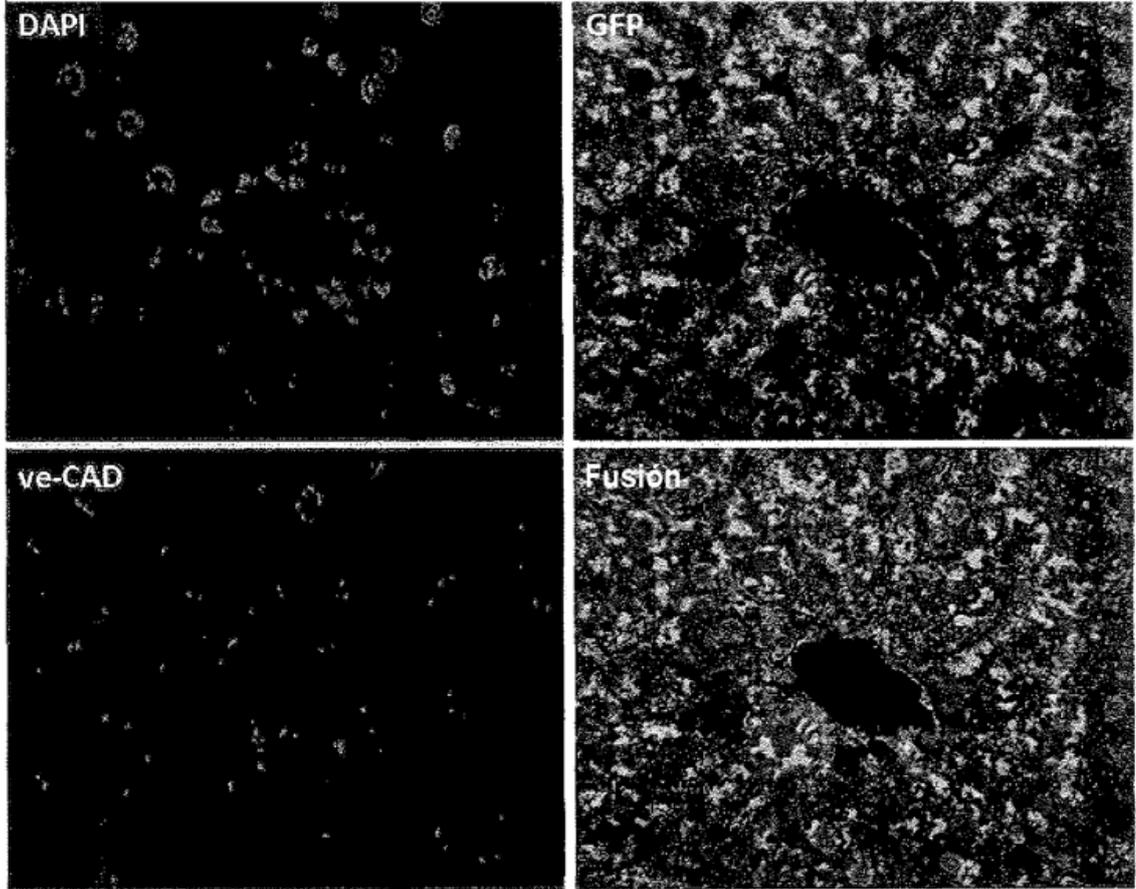


FIG. 10

TRATAMIENTO USANDO VA-lip siRNA<sub>g46</sub> DE RATA CON BDL A LA QUE SE LE HABÍAN TRASPLANTADO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DERIVADAS DE RATA GFP-tg

VA-lip siRNA<sub>g46</sub> (× 200) Región distinta al sitio de trasplante de células

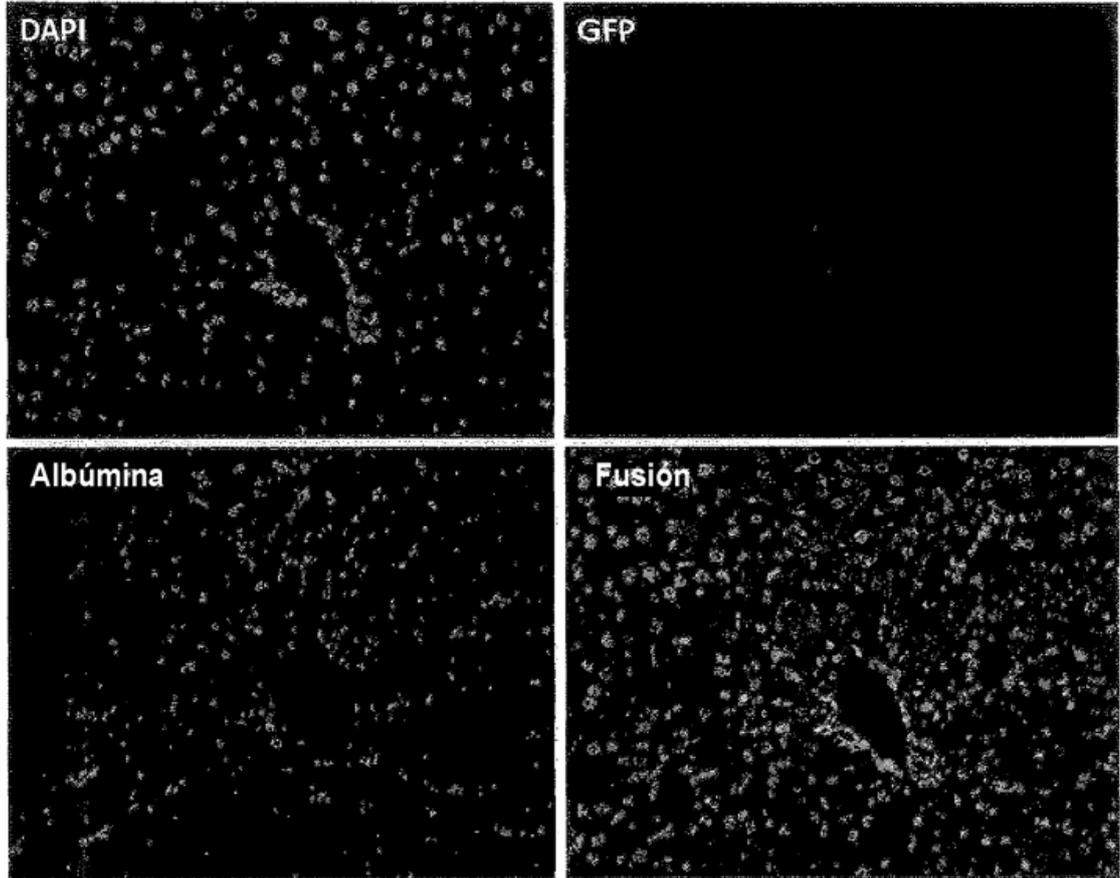


FIG. 11

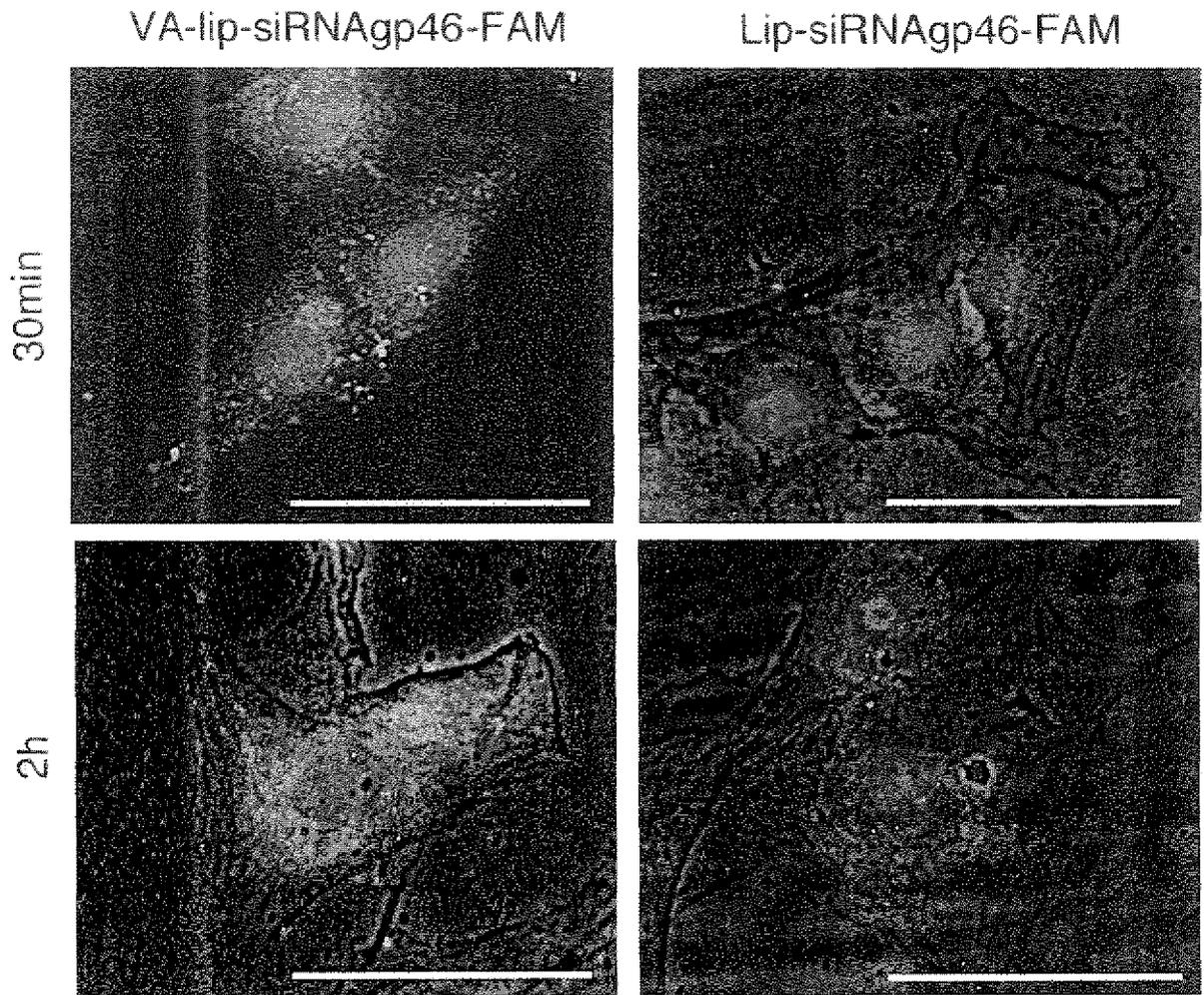


FIG. 12

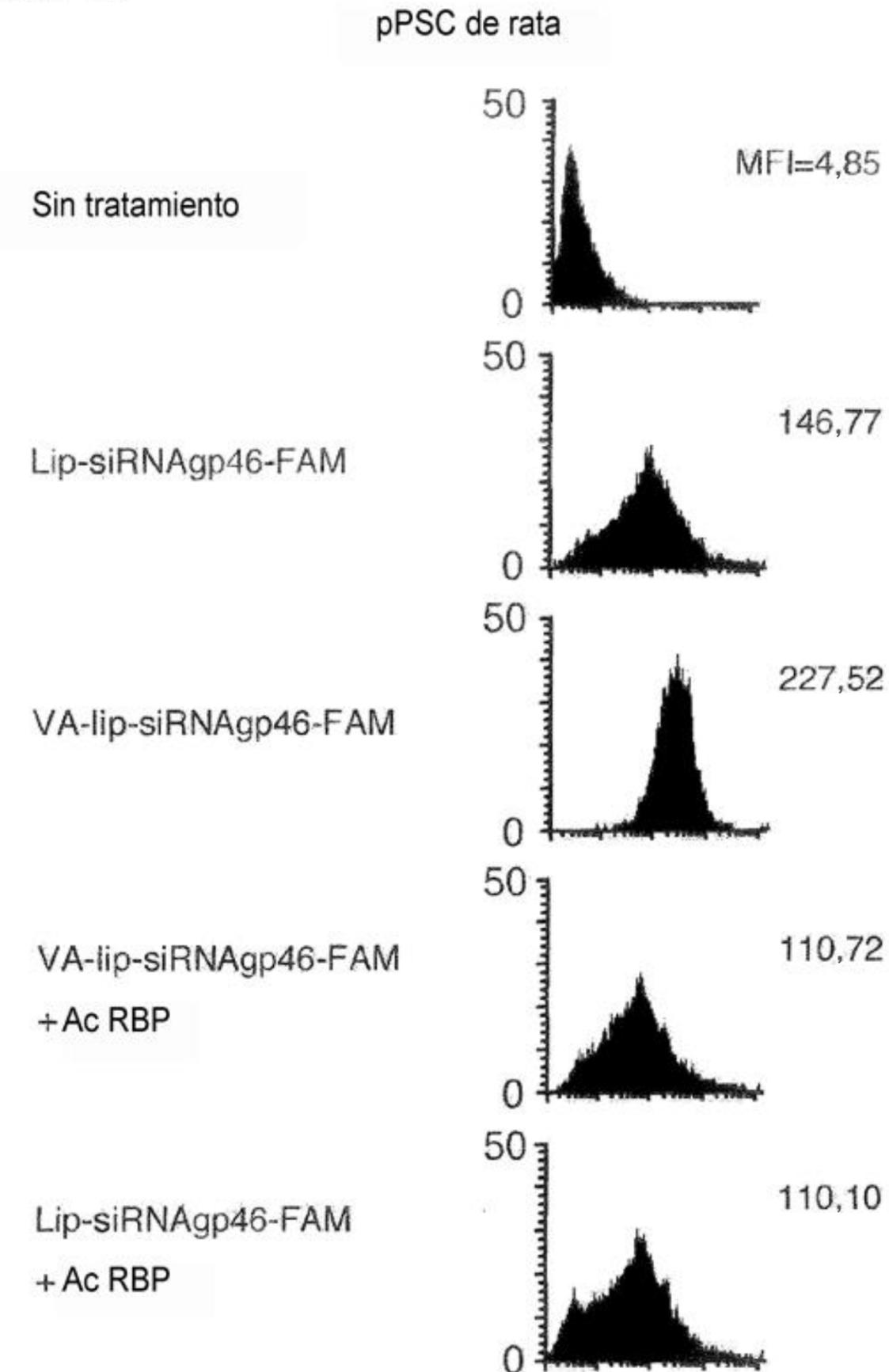
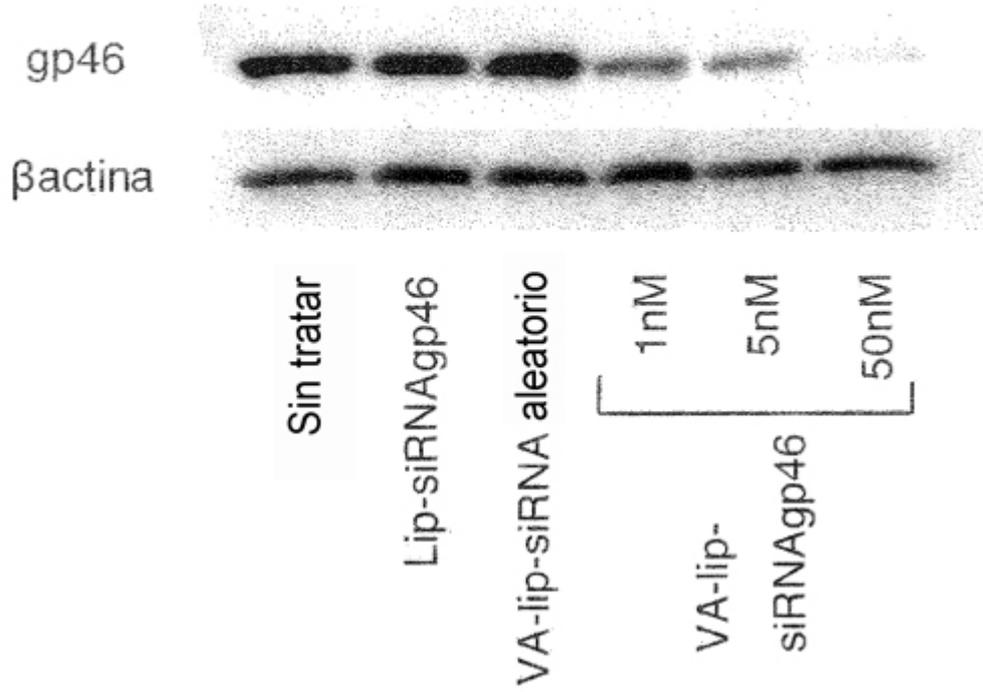


FIG. 13

**A**



**B**

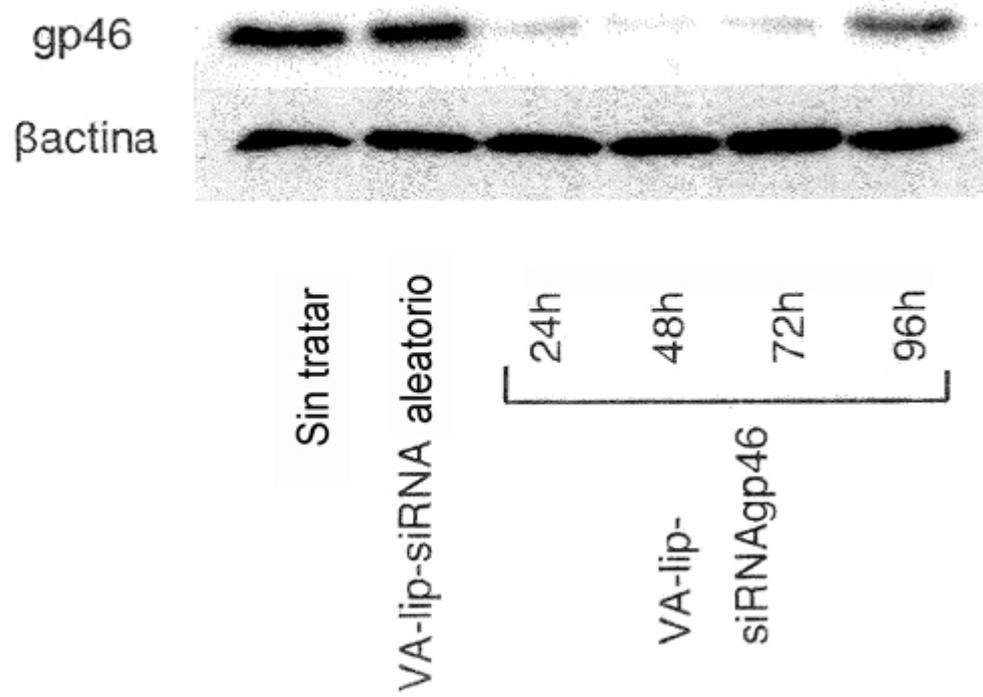


FIG. 14

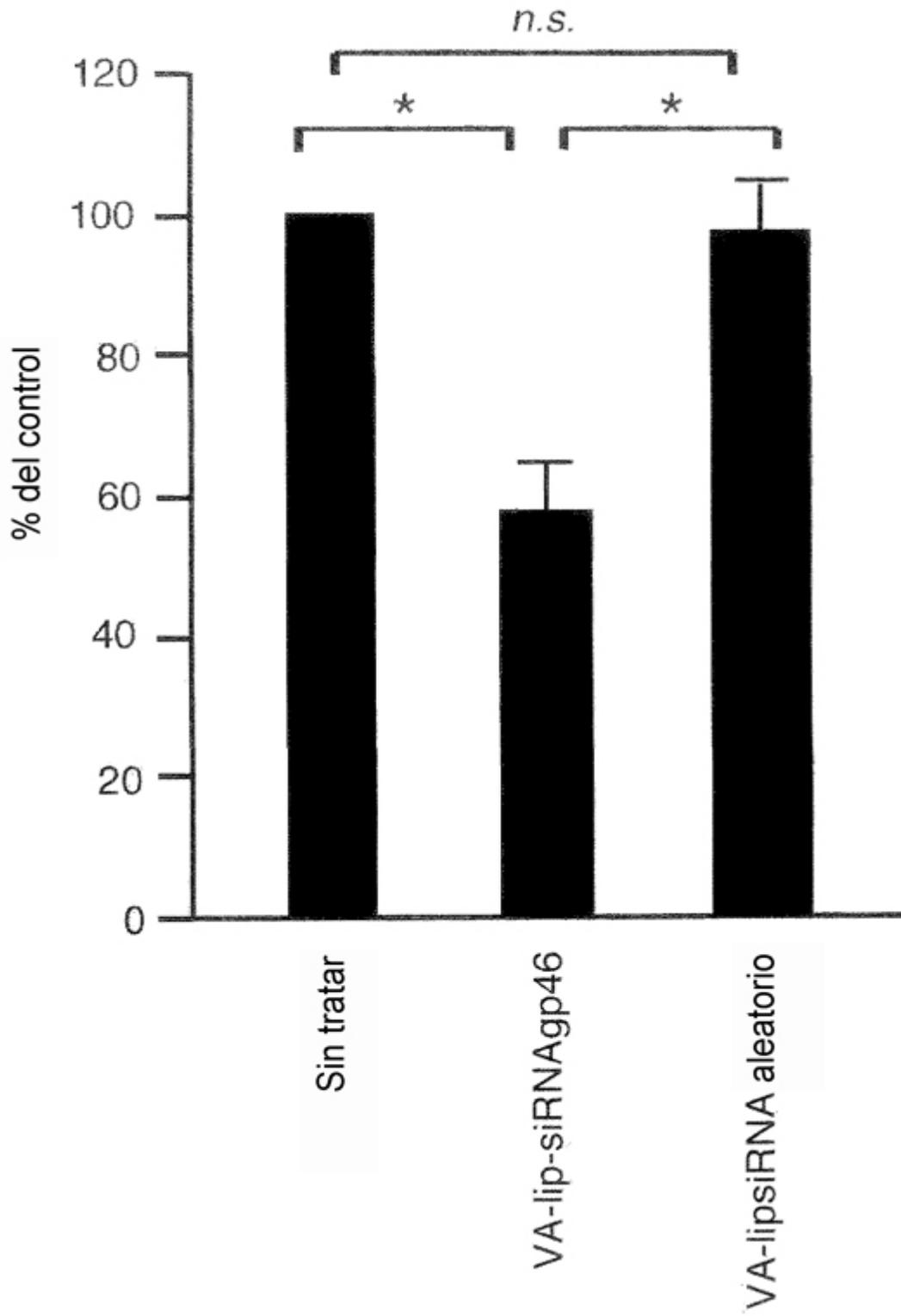


FIG. 15

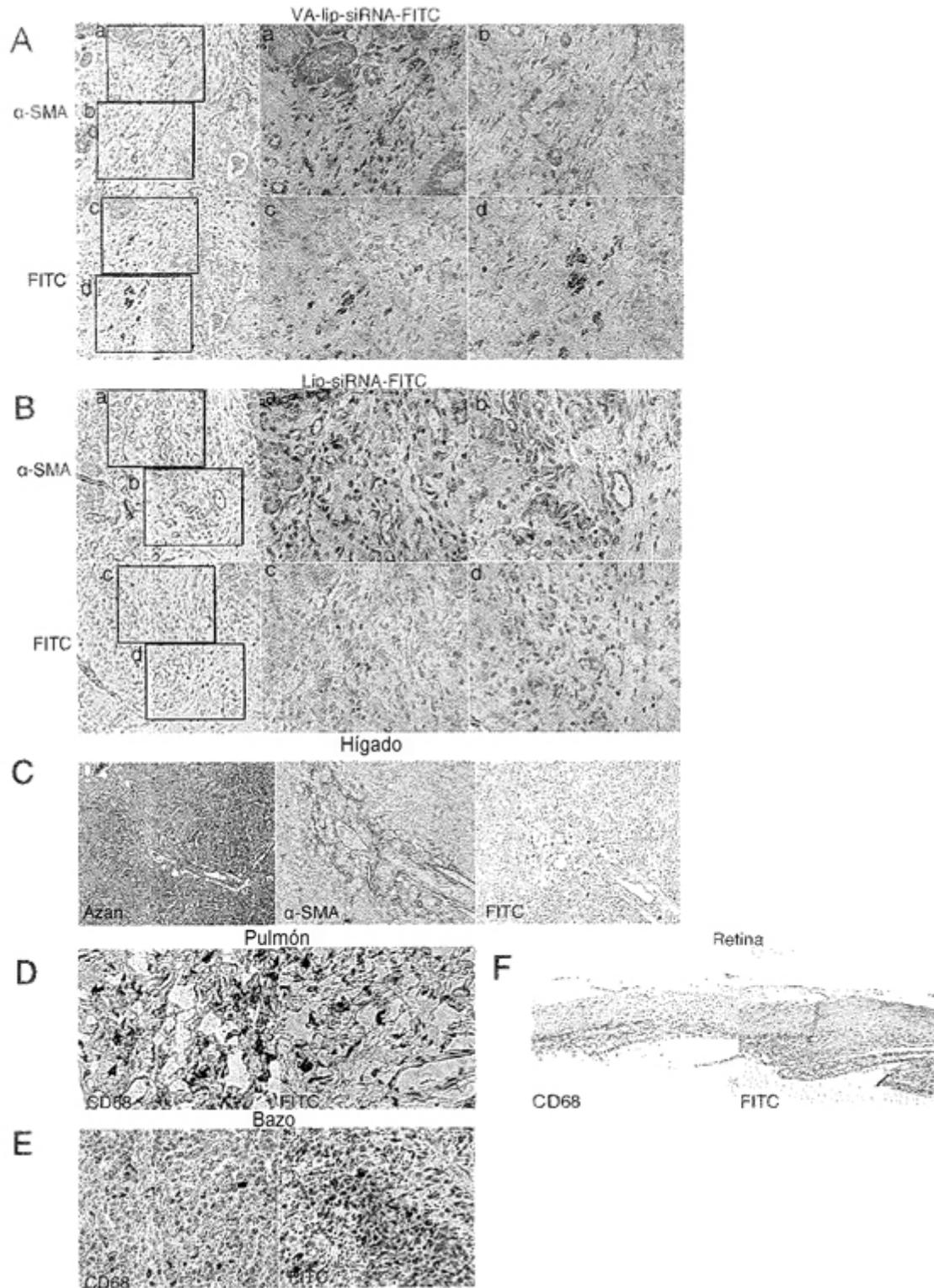
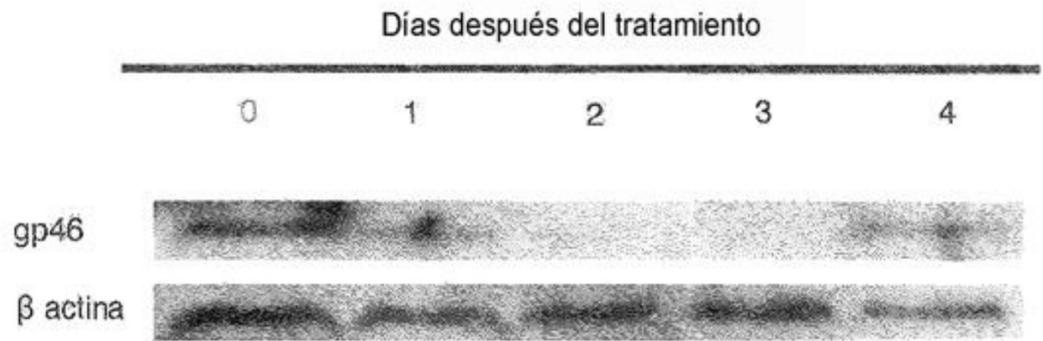


FIG. 16

**A**



**B**

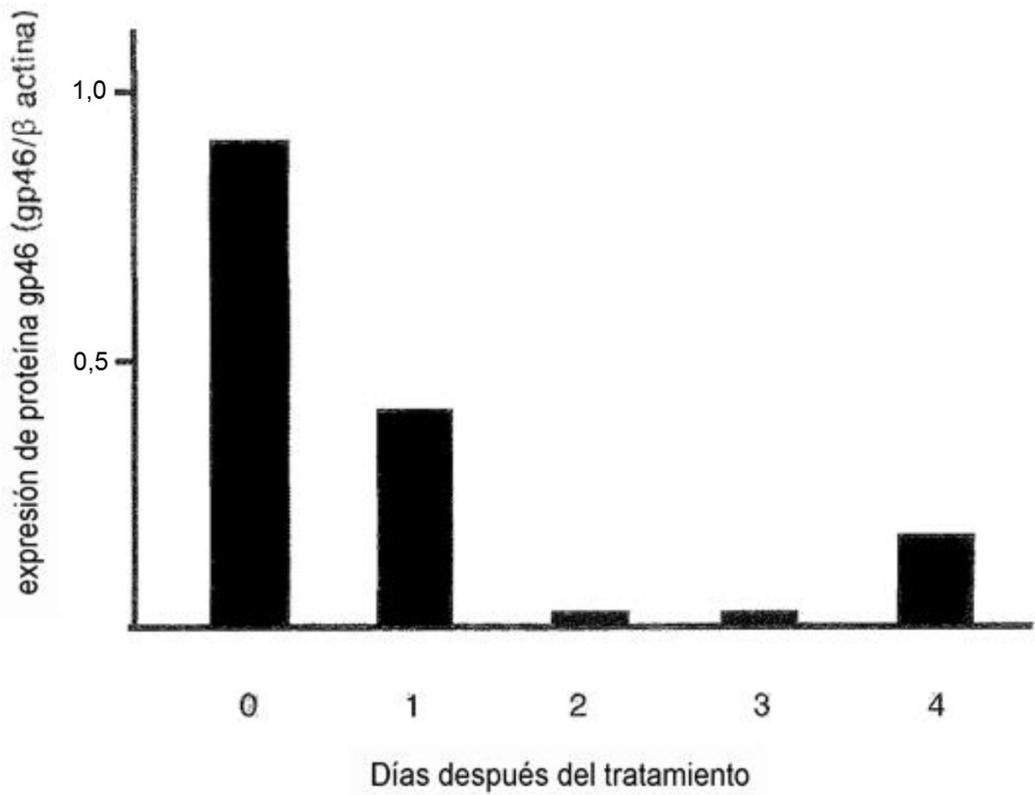


FIG. 17

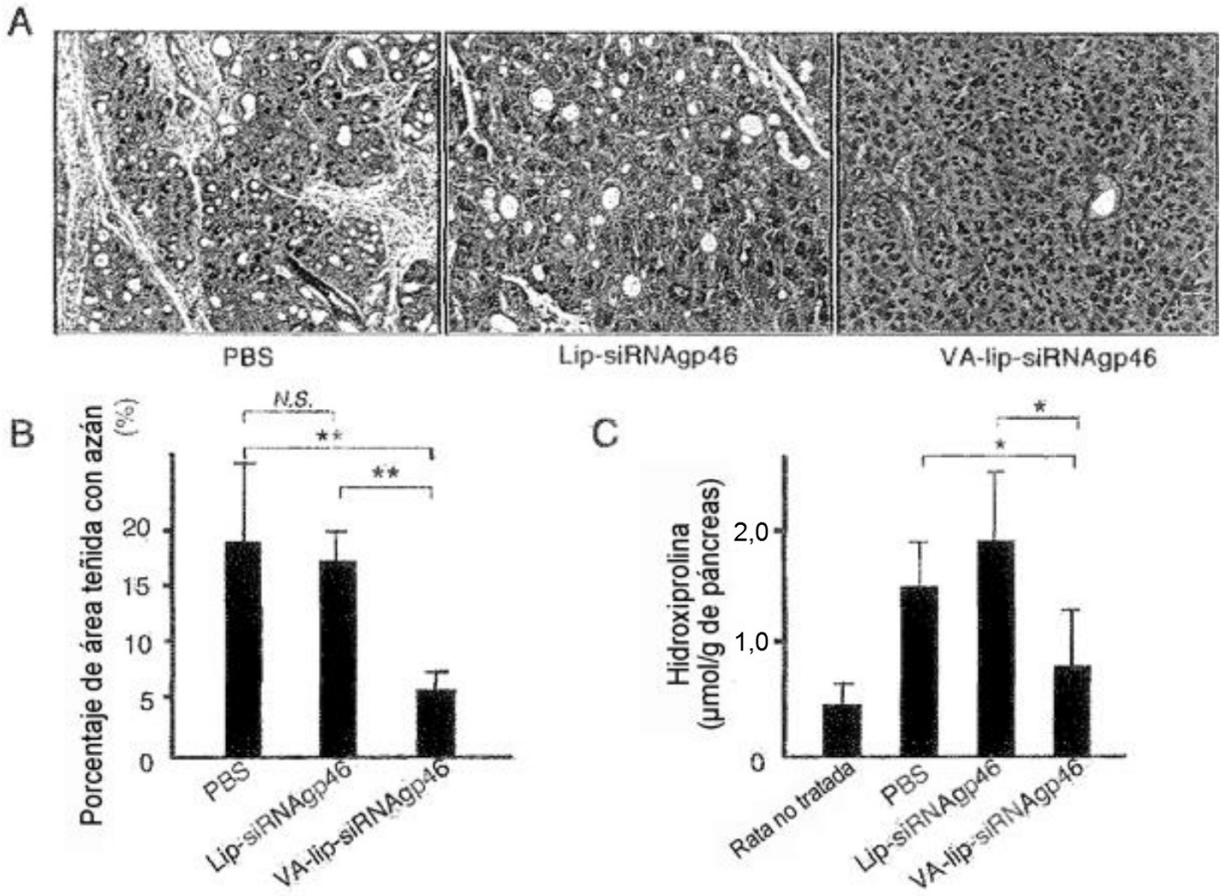


FIG. 18

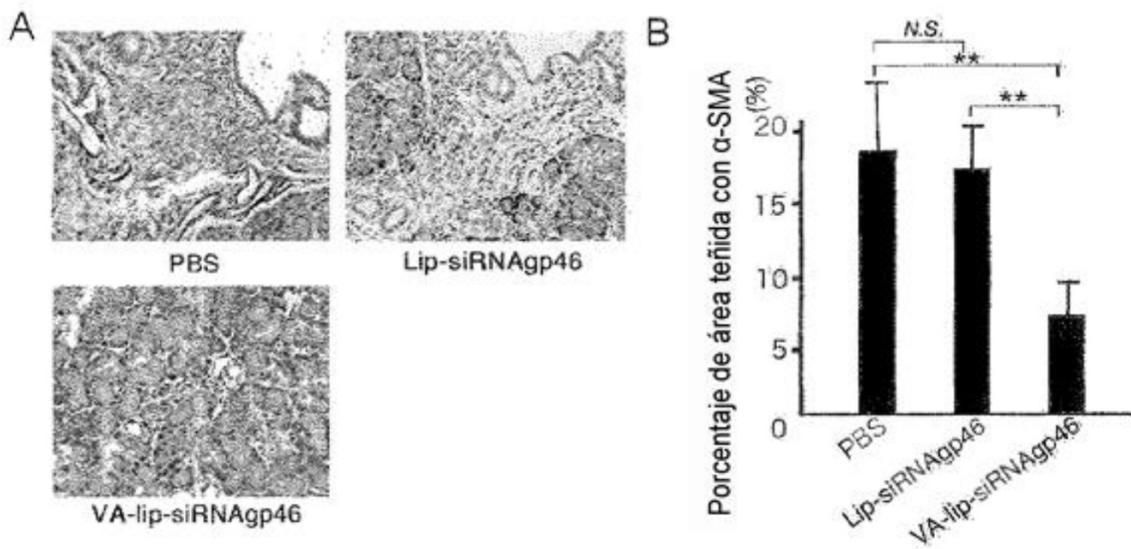


FIG. 19

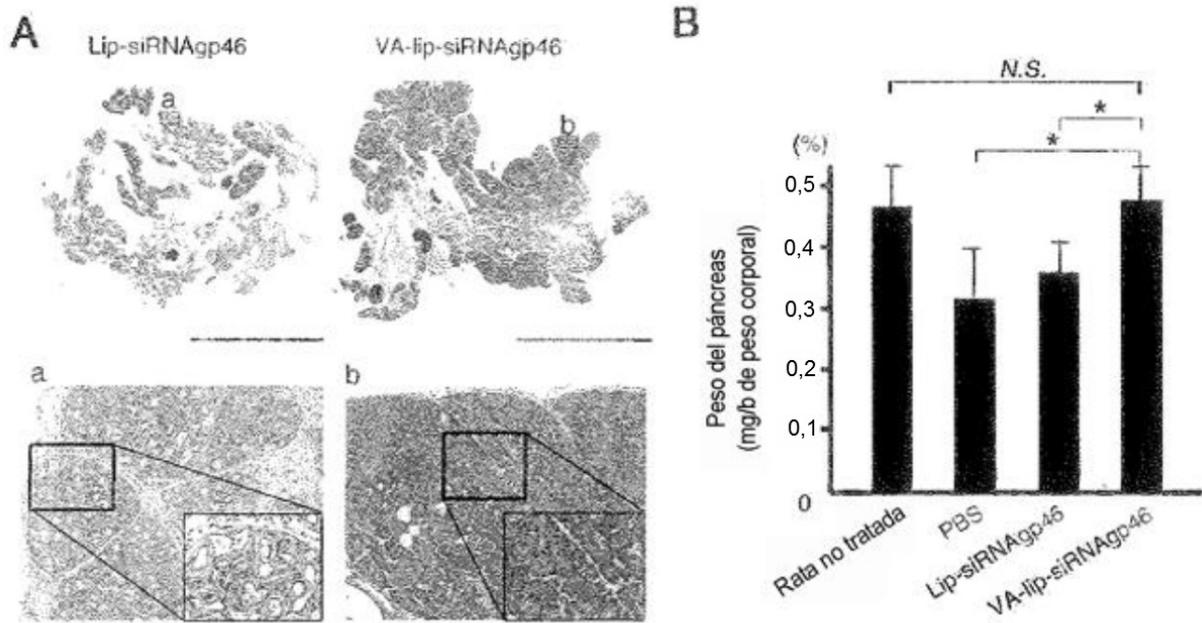


FIG. 20

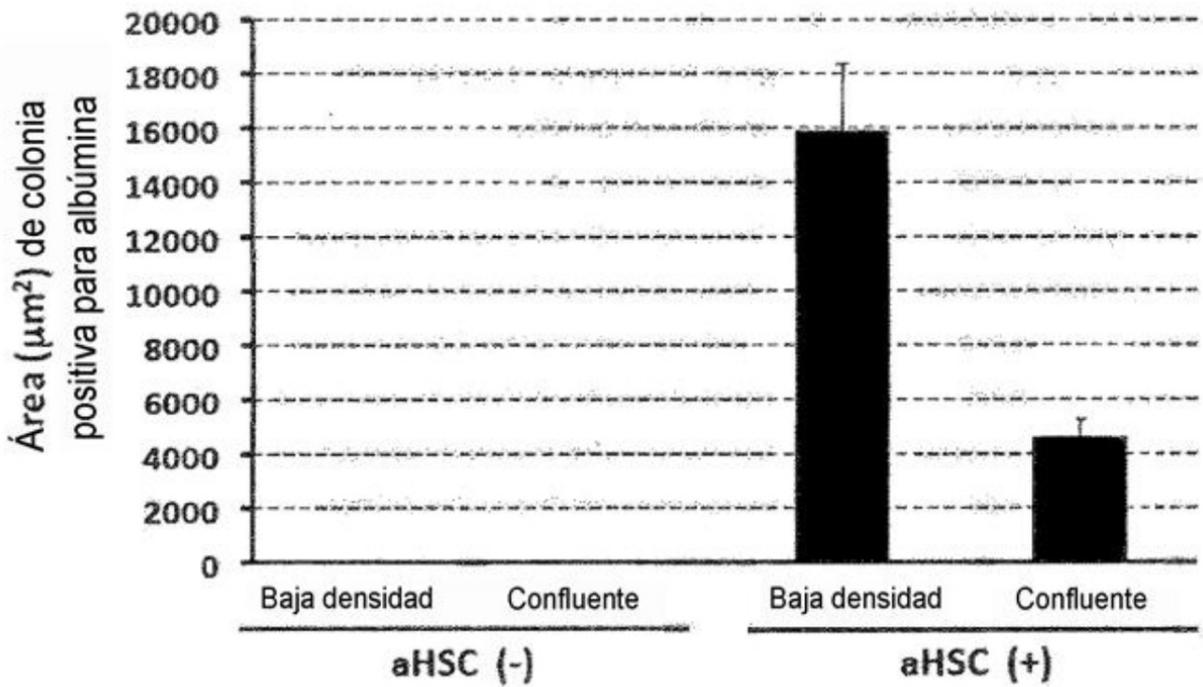


FIG. 21

