

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 086**

51 Int. Cl.:

A61K 47/10 (2007.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/07 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 47/69 (2007.01)

A61K 47/54 (2007.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2011 PCT/JP2011/063910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11158933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11795835 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2583691**

54 Título: **Agente para tratar la fibrosis renal**

30 Prioridad:

17.06.2010 JP 2010138070

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

09.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NIITSU, YOSHIRO;
KAJIWARA, KEIKO;
TANAKA, YASUNOBU y
MIYAZAKI, MIYONO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 712 086 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

Agente para tratar la fibrosis renal

5 **[Campo técnico]**

La presente invención se refiere a una composición para tratar la nefritis diabética utilizando un portador dirigido a células productoras de matriz extracelular en el riñón.

10 **[Antecedentes de la técnica]**

En los últimos años, debido a grandes cambios en el estilo de vida, principalmente con respecto a los hábitos alimenticios, ha aumentado la prevalencia de enfermedades relacionadas con el estilo de vida como hipertensión arterial y diabetes, y acompañando a esto, ha ido aumentando el riesgo de enfermedad renal y, por consiguiente, insuficiencia renal.

El riñón es un órgano importante para mantener la homeostasis del medio interno mediante excreción de productos de desecho o regulación de líquidos corporales / electrolitos / equilibrio ácido-base, etc. El riñón controla las concentraciones de diversos compuestos en la sangre, tales como las de hidrógeno, sodio, potasio y silicio, y excreta los productos de desecho en forma de orina. Cualquier deterioro de la función renal da lugar a la posibilidad de interferencia en la capacidad del cuerpo para eliminar suficientemente metabolitos de la sangre y también la posibilidad de destrucción del equilibrio hidroelectrolítico en el cuerpo. En su forma más grave, el deterioro o fallo de la función renal puede ser mortal.

Además, aparte de las funciones mencionadas anteriormente, el riñón tiene otras funciones tales como inmunidad celular, secreción endocrina y metabolismo. El riñón como órgano endocrino lleva a cabo la producción de eritropoyetina, que regula la producción de glóbulos rojos o de 1,25-dihidroxitamina D3, que es una forma activa de la vitamina D3, la secreción de renina y eritropoyetina, que son factores de regulación de la presión sanguínea, y la secreción de cinina, caliceína, prostaglandina, etc.

La insuficiencia renal crónica significa un estado en el que las funciones renales anteriores gradualmente se deterioran irreversiblemente y no puede mantenerse la homeostasis de un organismo vivo. Se sabe que la insuficiencia renal crónica está provocada por nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefrosclerosis maligna, poliquistosis renal, etc. Todas las enfermedades renales están acompañadas de fibrosis del riñón y conducen finalmente a la insuficiencia renal terminal. En particular, ya que el deterioro crónico de la función renal depende fuertemente de la evolución de la fibrosis del riñón, se piensa que inhibir la evolución de la fibrosis puede dar como resultado la supresión de la evolución de la insuficiencia renal crónica.

En general, la fibrosis renal está acompañada de una respuesta inflamatoria debido a disfunción de células endoteliales, y la matriz extracelular que finalmente se produce en exceso provoca fibrosis. Por ejemplo, en la glomeruloesclerosis, debido a la disfunción de células endoteliales glomerulares, se secreta una citocina tal como una quimiocina o un factor de crecimiento, y monocitos o macrófagos migran para realizar una mejora de la respuesta inflamatoria. Por consiguiente, se produce activación, proliferación y transformación de células mesangiales, se produce una cantidad en exceso de matriz extracelular a partir de células productoras de matriz extracelular tales como células mesangiales, se produce fibrosis, y esto conduce a glomeruloesclerosis.

En particular, la nefropatía diabética es el mayor factor que conduce a insuficiencia renal crónica, y una de las complicaciones de la diabetes. La nefropatía diabética se caracteriza por hiperplasia e hipertrofia del mesangio glomerular, y esto se debe principalmente a un aumento de la acumulación de una proteína ECM tal como colágeno tipo I o tipo IV, fibronectina o laminina.

Una vez que se produce un grado grave de insuficiencia renal crónica, es imposible la recuperación, y se producirá uremia a no ser que se lleve a cabo un tratamiento tal como diálisis. Como terapia contra la insuficiencia renal crónica, se lleva a cabo una dieta tal como una dieta baja en proteínas o una dieta con restricción de sal, la administración de un fármaco antihipertensor con el fin de aliviar la carga en el glomérulo, etc.

Además, para la insuficiencia renal crónica, según sea necesario, se lleva a cabo un tratamiento de complementación con 1,25-dihidroxitamina D3 o eritropoyetina, que secreta el riñón, o un tratamiento para mantener apropiadamente la regulación de la presión sanguínea, que es una función importante del riñón.

Como quimioterapia, con el fin de suprimir la evolución de la insuficiencia renal, se usa un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina o un antagonista del receptor de la angiotensina II. Se supone que tienen un efecto protector renal *per se* además de suprimir la evolución de la insuficiencia renal disminuyendo la presión sanguínea glomerular. Sin embargo, es necesario cuidar su administración ya que cuando desciende demasiado la presión sanguínea glomerular, la cantidad de flujo sanguíneo glomerular en cambio disminuye y se produce insuficiencia renal prerrenal.

Como inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina existen captoril, enalapril, delapril, imidapril, quinapril, temocapril, perindopril erbumina, lisinopril, etc., y como antagonistas del receptor de la angiotensina II existen losartán, valsartán, candesartán cilexetilo, telmisartán, olmesartán medoxomilo, irbesartán, etc.

Distinto de lo anterior, con el fin de mejorar los síntomas de uremia y retrasar el comienzo de la diálisis, se usa Kremezin como carbono adsorbente que adsorbe sustancias dañinas en el intestino. Además, con el fin de evitar la disnea, entumecimiento en las extremidades, arritmia, etc. debido a un aumento de potasio en la sangre, se usa poliestirensulfonato de calcio como resina de intercambio iónico que adsorbe potasio en el intestino y se excreta en las heces.

Cuando la concentración en suero de creatinina, que es un metabolito derivado de músculo esquelético, supera de 5 a 7 mg/dl, puede considerarse una terapia de diálisis artificial tal como diálisis peritoneal, hemofiltración, o diálisis sanguínea, o un trasplante de riñón. Sin embargo, la diálisis sanguínea impone una gran carga en la vida de una persona debido a tener que visitar un hospital tres veces a la semana y estar allí confinado durante de 4 a 5 horas por tratamiento, y con respecto al trasplante de riñón, ya que hay pocos donantes de riñón, solo un número muy reducido de los pacientes que desean uno pueden recibir un trasplante de riñón. Además, el promedio de esperanza de vida de pacientes con insuficiencia renal después de comenzar la diálisis es aproximadamente solo la mitad de la población normal.

En estas circunstancias, se ha puesto gran cantidad de esfuerzo en investigación en el desarrollo de un agente para tratar la fibrosis renal. Como resultado, se ha informado que, por ejemplo, un agente medicinal que actúa sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona tal como un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un antagonista del receptor de la angiotensina II AT1, un antagonista de aldosterona, o un inhibidor de renina, un agente medicinal que actúa sobre el sistema óxido nítrico tal como un antagonista del receptor de endotelina, un bloqueante α , un bloqueante β , un agente inmunosupresor, un inhibidor del metabolismo de matriz extracelular, un inhibidor del sistema de complemento, un inhibidor de quimiocina, o un inhibidor de fosfodiesterasa 5, y un agente medicinal tal como un inhibidor de NF κ B, un inhibidor de Rho, un inhibidor de p38 MAPK, un inhibidor de PI3K γ , un inhibidor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), calcitreína, relaxina, un antagonista del receptor de interleucina 1, factor morfogenético de hueso 7 (BMP- 7), anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral α (anticuerpo anti-TNF α), o anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de las plaquetas D (anticuerpo anti-PDGF-D) tienen un cierto grado de éxito en un ensayo clínico o en un animal modelo de fibrosis renal (Documento distinto a patente 1).

Además, ha habido muchas solicitudes de patente y, por ejemplo, se han solicitado como fármacos para tratar la fibrosis renal patentes referidas a un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (Documento de patente 1), un antagonista del receptor de la angiotensina II (Documento de patente 2), un inhibidor del factor de crecimiento β (TGF- β) transformador (Documento de patente 3), un inhibidor de la producción de activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (Documento de patente 4), un agonista selectivo del receptor de prostaglandina 4 (Documento de patente 5), un inhibidor de la síntesis de colágeno tipo I (Documento de patente 6), un inhibidor de sulfotransferasa de proteoglicano de sulfato de condroitina (Documento de patente 7), un inhibidor de reductasa de epóxido de vitamina K (Documento de patente 8), un inhibidor de la formación de productos finales de glicación (Documento de patente 9), un agonista del receptor 2A de adenosina A2A (Documento de patente 10), un antagonista del receptor de endotelina (Documento de patente 11), un inhibidor del VEGF (Documento de patente 12), etc. Sin embargo, ninguno de estos agentes medicinales es satisfactorio, y se necesita un desarrollo adicional de agentes para tratar la fibrosis renal. Los documentos de patente 16 y 17 describen composiciones que pueden incluir un portador, agente seleccionador de dianas y agente terapéutico. El agente terapéutico puede tener una actividad terapéutica tal como inhibir fibrosis dentro de un órgano o tejido seleccionados como diana o inhibir el crecimiento de una célula cancerosa. El documento de patente 18 describe un portador de fármaco específico para astrocitos que contiene un derivado retinoide y/o un análogo de vitamina A como constituyente; un método de suministro de fármacos con el uso de los mismos; un fármaco que contiene los mismos; y un método terapéutico con el uso del fármaco. Uniendo un portador de fármaco a un derivado retinoide tal como vitamina A o un análogo de vitamina A o encapsulando el mismo en el portador de fármaco, puede suministrarse un fármaco para uso terapéutico específicamente para astrocitos. Como resultado, una enfermedad relacionada con astrocitos puede prevenirse o inhibirse de manera eficiente y eficaz al tiempo que se minimizan los efectos secundarios. Como fármaco que inhibe la actividad o el crecimiento de astrocitos, por ejemplo, puede encapsularse en el portador de fármaco un ARNip contra HSP47, que es una chaperona molecular específica para colágeno. 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 19 proporciona composiciones, métodos y kits para modular la expresión de genes diana, particularmente proteína de choque térmico 47 (hsp47). Las composiciones, métodos y kits pueden incluir moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico interferente pequeño (ANip), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN (miARN) o ARN en horquilla corto (ARNhc)) que modulan un gen que codifica hsp47, por ejemplo, el gen que codifica hsp47 humana. La composición y métodos divulgados a este respecto también pueden usarse en trastornos y condiciones de tratamiento asociados con hsp47 tal como fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis peritoneal y fibrosis renal.

[Documentos relacionados con la técnica]

[Documento de patentes]

- 5 [Documento de patente 1] Patente estadounidense n.º 5238924
 [Documento de patente 2] Documento JP, A, 07-002667
 [Documento de patente 3] Documento JP, A, 2004-043459
 [Documento de patente 4] Documento JP, A, 2009-007258
 [Documento de patente 5] Documento JP, A, 2001-233792
 10 [Documento de patente 6] Documento JP, A (PCT) 2004-534760
 [Documento de patente 7] Documento JP, A, 2009-292725
 [Documento de patente 8] Documento JP, A, 2010-077101
 [Documento de patente 9] Documento JP, A, 2009-029750
 [Documento de patente 10] Documento JP, A (PCT) 2007-536241
 [Documento de patente 11] Documento JP, A (PCT) 2006-519817
 15 [Documento de patente 12] Documento JP, A, 2007-099641
 [Documento de patente 13] Solicitud de patente internacional WO 2006/068232
 [Documento de patente 14] Documento JP, A, 2009-221164
 [Documento de patente 15] Documento JP, A, 2010-59124
 [Documento de patente 16] Documento WO 2010/014117 A1
 20 [Documento de patente 17] Documento WO 2009/036368 A2
 [Documento de patente 18] Documento EP 1 842 557 A1
 [Documento de patente 19] Documento WO 2011/072082 A2

[Documento distinto a patentes]

- 25 [Documento distinto a patente 1] Nephrology, dialysis, transplantation 2007; 22(12): 3391-407

[Sumario de la invención]

30 **[Problemas a resolver por la invención]**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente para tratar la nefritis diabética utilizando un portador que pueda suministrar específicamente una sustancia tal como un fármaco a células productoras de matriz extracelular en el riñón.

35 **[Medios para solucionar los problemas]**

Los inventores han descubierto, durante una investigación de un agente novedoso para tratar la fibrosis renal, que la fibrosis renal y especialmente la nefritis diabética puede tratarse eficazmente administrando una composición en la que un inhibidor de producción de matriz extracelular se transporta mediante un portador que incluye un retinoide como agente que estimula el suministro de una sustancia a las células productoras de matriz extracelular en el riñón, completando así la invención.

45 Se sabe que un portador que incluye vitamina A puede suministrar un fármaco a células estrelladas que almacenan vitamina A (Documento de patente 13), y que una composición en la que se soporta ARNip para HSP47 en el portador anterior puede mejorar la fibrosis hepática (Documento de patente 13), fibrosis pulmonar (Documento de patente 14), y mielofibrosis (Documento de patente 15), pero cualquier relación con fibrosis renal, tejido intersticial renal o el mesangio es hasta la fecha completamente desconocido.

50 Es decir, la presente invención se refiere a lo siguiente.

(1) Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de nefritis diabética, comprendiendo la composición un portador que comprende un retinoide que estimula el suministro de una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el riñón y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón, en la que el portador tiene la forma de un liposoma, y la razón molar de retinoide y lípido contenidos en el liposoma es de 8:1 a 1:4.

(2) La composición farmacéutica para su uso según el (1) anterior, en el que el retinoide incluye retinol.

60 (3) La composición farmacéutica para su uso según uno cualquiera de los (1) o (2) anteriores, en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de actividad o producción de PAI-1, un inhibidor de actividad celular, un inhibidor de crecimiento, un inductor de apoptosis, y una molécula de iARN, ribozima, ácido nucleico antisentido, o polinucleótido quimérico de ADN/ARN que seleccionan como diana al menos una de las moléculas constituyentes de la matriz extracelular o moléculas involucradas en la producción o secreción de las moléculas constituyentes de la matriz extracelular o un vector que expresa las mismas.

(4) La composición farmacéutica para su uso según los (1) o (2) anteriores, en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular es un inhibidor de HSP47.

5 (5) La composición farmacéutica para su uso según uno cualquiera de los (1) a (4) anteriores, en la que el fármaco y el portador se mezclan en un lugar de tratamiento médico o en sus alrededores.

[Efectos de la invención]

10 Mientras que el modo de acción exacto de la composición para tratar la nefritis diabética de la presente invención todavía no se ha clarificado completamente, se cree que el retinoide funciona como un agente que selecciona como diana células productoras de matriz extracelular en el riñón tal como fibroblastos o miofibroblastos, y administra un principio activo, concretamente un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón a dichas células, mostrando así un efecto contra fibrosis renal y especialmente nefritis diabética.

15 Por tanto, ya que puede administrarse eficazmente un principio activo al sitio de acción y, además, a las células diana, usando la composición farmacéutica de la presente invención, se hace posible el tratamiento, la supresión de evolución, y la prevención de aparición de nefritis diabética, cuyo tratamiento ha sido difícil hasta la fecha, y la presente composición farmacéutica contribuye por tanto significativamente a la medicina humana y medicina veterinaria.

20 Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede combinarse con cualquier agente farmacéutico (por ejemplo, un agente terapéutico existente contra fibrosis renal) para aumentar su eficacia de acción; por tanto también es ventajosa para su amplia gama de aplicaciones en términos de formulación, permitiendo facilitar la producción de agentes terapéuticos eficaces.

[Breve descripción de dibujos]

30 [Figura 1] La figura 1 es una imagen microscópica representativa del glomérulo mediante tinción con rojo sirio de una sección del córtex renal de un ratón de cada grupo. Las imágenes se tomaron con un aumento de 800x usando un lente de inmersión en aceite.

35 [Figura 2] La figura 2 es un gráfico que muestra la proporción de la región fibrótica del córtex renal determinada cuantitativamente mediante tinción con rojo sirio. Se tomaron aleatoriamente 20 campos de visión en la región de córtex renal por ratón individual, y se calculó la proporción de la región fibrótica ((%) de área de fibrosis) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

40 [Figura 3] La figura 3 es un gráfico que muestra silenciamiento génico mediante de unión a VA, que contiene ARNip, en células productoras de matriz extracelular renal de ratón. El nivel de expresión génica de HSP47 en las células productoras de matriz extracelular recogidas del riñón de ratón se corrigió con el nivel de expresión de GAPDH, que es un gen de control interno, y la proporción de expresión génica de HSP47 ((%) de expresión génica de HSP47) se representó gráficamente mientras que se definió "Sin tratamiento" (no tratado) como el 100 %. VA-lip indica liposoma de unión a VA-ARNip de Hsp47C, lip significa liposoma-ARNip de Hsp47C, VA + ARNip significa VA + ARNip de Hsp47C, y NT significa sin tratamiento.

[Modos para llevar a cabo la invención]

50 En la presente invención, las células productoras de matriz extracelular en el riñón no se limitan particularmente siempre que sean células presentes en el riñón que tienen la capacidad de producir matriz extracelular, y ejemplos de las mismas presentes en el riñón incluyen células mesangiales, células tubulointersticiales, pericitos, fibroblastos, fibrocitos, que son células precursoras de fibroblastos, y miofibroblastos. Las células productoras de matriz presentes en el riñón pueden incluir no solo aquellas derivadas de células presentes en el riñón sino también aquellas derivadas de fibrocitos en sangre circulante y aquellas transformadas de células endoteliales mediante transdiferenciación endotelial-mesenquimatosas. Los miofibroblastos se caracterizan por la expresión de α -SMA (alfa actina del músculo liso). Los miofibroblastos en la presente invención son aquellos identificados mediante por ejemplo inmunotinción usando anticuerpos anti- α -SMA marcados de manera detectable. Además, ya que los fibroblastos expresan vimentina, que es característica de células mesenquimatosas, pero no expresan α -SMA, pueden identificarse mediante tinción doble de vimentina y α -SMA, etc. Además, las células productoras de matriz extracelular en el riñón pueden obtenerse tratando tejido renal con colagenasa y proteasa y luego llevando a cabo aislamiento mediante centrifugación por gradiente de densidad (por ejemplo en Nycodenz® que tiene una concentración final del 8 %).

65 El retinoide empleado en la presente invención funciona como un agente de selección como diana (agente de selección como diana) a células productoras de matriz extracelular en el riñón, y estimula la administración específica de una sustancia a estas células. El mecanismo de fomento de la administración de sustancia por el

retinoide todavía no se ha clarificado completamente; sin embargo, por ejemplo, se piensa que un retinoide que se ha unido específicamente a una proteína de unión a retinol (RBP) se lleva dentro de una célula productora de matriz extracelular en el riñón a través de determinado receptor presente en la superficie de dicha célula.

5 Un retinoide es un miembro de una clase de compuestos que tienen una estructura principal en la que cuatro unidades isoprenoides se unen de manera cabeza con cola (véase G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents", 2.^a Ed. Portland Press, págs. 247-251 (1992)). La vitamina A es un descriptor genérico de un retinoide que muestra cualitativamente la actividad biológica de retinol. El retinoide que puede usarse en la presente invención no está limitado particularmente, y ejemplos del mismo incluyen retinol (que incluye retinol solo trans),
10 retinal, ácido retinoico (que incluye tretinoína), derivados retinoides tales como un éster de retinol y un ácido graso, un éster de un alcohol alifático y ácido retinoico, etretinato, isotretinoína, adapaleno, acitretina, tazaroteno, y palmitato de retinilo, y análogos de vitamina A tales como fenretinida (4-HPR) y bexaroteno.

15 De estos, retinol, retinal, ácido retinoico, un éster de retinol y un ácido graso (tal como acetato de retinilo, palmitato de retinilo, estearato de retinilo y laurato de retinilo) y un éster de un alcohol alifático y ácido retinoico (tal como retinoato de etilo) son preferibles desde el punto de vista de la eficacia de la administración específica de una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el riñón.

20 Todos los isómeros de retinoides incluyendo isómeros cis-trans están incluidos en el alcance de la presente invención. El retinoide puede sustituirse con uno o más sustituyentes.

El portador que está presente en la composición farmacéutica de la presente invención puede constituirse uniendo el retinoide a un componente constituyente del portador distinto al retinoide, o incluyéndolos allí dentro. Por tanto, el portador empleado en la presente invención incluye un componente constituyente del portador distinto al retinoide.

25 Ejemplos de un componente de este tipo incluyen un lípido, por ejemplo, un fosfolípido tal como glicerosfosfolípido, un esfingolípido tal como esfingomielina, un esteroide tal como colesterol, un aceite vegetal tal como aceite de soja o aceite de semillas de amapola, un aceite mineral, una lecitina tal como lecitina de yema de huevo, y un polímero, pero los ejemplos no se limitan a ello. Entre ellos, son adecuados aquellos que pueden formar un liposoma, por
30 ejemplo, un fosfolípido natural tal como lecitina, un fosfolípido semisintético tal como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilauroilfosfatidilcolina (DLPC) y colesterol.

35 Un componente particularmente preferido es un componente que puede evitar la captura por el sistema reticuloendotelial sistema, incluyendo ejemplos de los mismos lípidos catiónicos tales como cloruro de *N*-(α -trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamato (TMAG), *N,N,N',N''*-tetrametil-*N,N',N'',N'''*-tetrapalmitilespermina (TMTPS), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-*N*-[2-(espermincarboxamido)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), 3β -[*N*-(*N',N'*-
40 dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol), 1,2-dimiristoiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), y cloruro de *O,O'*-ditetradecanoil-*N*-(α -trimetilamonioacetil)diolanolamino (DC-6-14).

El portador empleado en la presente invención tiene la forma de un liposoma.

45 En la presente invención, unir el retinoide al portador o incluirlo allí dentro se hace posible uniendo el retinoide a o incluirlo en un constituyente de portador distinto al retinoide mediante un método químico y/o físico. Alternativamente, el retinoide puede unirse a o incluirse en el portador mezclando el retinoide y los constituyentes de portador distintos al retinoide durante la preparación del portador. En la presente invención, la cantidad del retinoide en el portador puede ser por ejemplo de 0,01 a 1000 nmol/ μ l, y es preferiblemente de 0,1 a 100 nmol/ μ l. El retinoide
50 puede unirse a o incluirse en el portador antes de soportar un fármaco en el portador; o el portador, retinoide y fármaco pueden mezclarse simultáneamente; o el retinoide puede mezclarse con el portador que ya está soportando el fármaco, etc. Esto puede hacerse mediante un procedimiento para producir una formulación específica para células productoras de matriz extracelular en el riñón, incluyendo el procedimiento una etapa de unión de un retinoide a una formulación liposomal tal como DaunoXome®, Doxil, Caelyx® o Myocet®.

55 El portador empleado en la presente invención es un liposoma. En la presente invención, se usa ventajosamente una forma liposomal desde el punto de vista de alta eficacia de administración, amplia selección de sustancias a administrar, y facilidad de formulación, etc., y un liposoma catiónico que contiene un lípido catiónico es particularmente preferible. La razón molar del retinoide respecto a otros constituyentes del liposoma es de 8:1 a 1:4, y preferiblemente de 4:1 a 1:2, desde el punto de vista de eficacia de unión del retinoide al portador o incluirlo allí dentro.

60 El empleado en la composición farmacéutica de la presente invención contiene una sustancia a transportar en su interior, puede unirse al exterior de una sustancia a transportar, o puede mezclarse con una sustancia a transportar, siempre que contenga un retinoide en una forma tal que el retinoide pueda funcionar como un agente de selección como diana. "Funcionar como un agente de selección como diana" en el presente documento significa que el
65

portador que incluye un retinoide alcanza y/o es captado por las células diana, es decir, células productoras de matriz extracelular en el riñón, más rápidamente y/o en una cantidad mayor que con un portador que no incluye el retinoide, y esto puede confirmarse fácilmente, por ejemplo, añadiendo un portador marcado o un portador que contiene marcador a un cultivo de células diana y analizando la distribución del marcador después de un período de tiempo predeterminado. Estructuralmente, puede satisfacerse este requisito, por ejemplo, si un retinoide se expone al menos parcialmente en el exterior de la formulación que contiene el portador como muy tarde para cuando alcanza las células diana. La "formulación" mencionada aquí es un concepto que incluye la composición de la presente invención, que se describe más adelante, y que además tiene una forma. Si el retinoide está expuesto o no en el exterior de una formulación puede evaluarse poniendo en contacto la formulación con una sustancia que se une específicamente a un retinoide, tal como por ejemplo una proteína de unión al retinol (RBP), y examinando su unión a la formulación.

Exponer un retinoide al menos parcialmente al exterior de la formulación como muy tarde para cuando alcanza las células diana puede conseguirse por ejemplo ajustando la razón de composición del retinoide y componentes constituyentes del portador distinto al retinoide. Además, como el portador tiene la forma de un liposoma, si por ejemplo se forma un complejo a partir de un retinoide y un componente constituyente del portador distinto al retinoide, puede usarse un método en el que primero una estructura de lípido formada a partir del componente constituyente del portador distinto al retinoide se diluye en una disolución acuosa, y esto entonces se pone en contacto y se mezcla con el retinoide, etc. En este caso, el retinoide puede estar en un estado en el que se disuelve en un disolvente, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como DMSO. La estructura de lípido mencionada aquí, significa una estructura de liposoma tridimensional que contiene un lípido como componente constituyente. La aplicación a otro portador de fármaco del mismo agente de selección como diana que el usado con un liposoma en selección como diana se describe por ejemplo en Zhao y Lee, *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56(8): 1193-204, Temming *et al.*, *Drug Resist Updat.* 2005; 8(6): 381-402.

La estructura de lípidos puede estabilizarse por ejemplo ajustando la presión osmótica mediante el uso de un agente de ajuste de presión osmótica tal como una sal, un sacárido tal como sacarosa, glucosa o maltosa, o un alcohol polihidroxilado tal como glicerol o propilenglicol, y preferiblemente sacarosa o glucosa. Además, puede ajustarse el pH añadiendo una cantidad apropiada de un agente de ajuste tal como una sal o un tampón. Por tanto, es posible llevar a cabo la producción, almacenamiento, etc. de una estructura de lípido en un medio que contiene las sustancias anteriores. En este caso, la concentración del agente de ajuste de presión osmótica se ajusta preferiblemente para que sea isotónico con la sangre. Por ejemplo, en el caso de sacarosa, la concentración de la misma en un medio es, aunque no se limita a, del 3 al 15 % en peso, preferiblemente del 5 al 12 % en peso, más preferiblemente del 8 al 10 % en peso, y particularmente el 9 % en peso, y en el caso de glucosa, la concentración de la misma en un medio es, aunque no se limita a, del 1 al 10 % en peso, preferiblemente del 3 al 8 % en peso, más preferiblemente del 4 al 6 % en peso, y particularmente el 5 % en peso.

También se divulga un procedimiento para producir un portador para suministrar una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el riñón, incluyendo el procedimiento una etapa de formular un retinoide como un agente de selección como diana a células productoras de matriz extracelular en el riñón. El método de formular el retinoide no está particularmente limitado siempre que, en el portador en el que se formula, el retinoide pueda funcionar como un agente que selecciona como diana células productoras de matriz extracelular en el riñón, y por ejemplo pueden usarse diversos métodos descritos en la presente memoria descriptiva. Por tanto, puede llevarse a cabo la formulación del retinoide uniendo el retinoide a o incluirlo en otro componente constituyente del portador mediante un método químico y/o físico o mezclando el retinoide con otro componente constituyente del portador cuando se prepara el portador. La cantidad de retinoide formulado, etc. es tal como se describió anteriormente.

La sustancia u objeto que suministra el portador descrito en el presente documento no está particularmente limitado, y tiene preferiblemente un tamaño de manera que pueda moverse físicamente dentro del cuerpo de un organismo desde el sitio de administración hasta el sitio de una lesión donde están presentes las células diana. Por tanto, el portador descrito en el presente documento puede transportar no solo una sustancia tal como un átomo, una molécula, un compuesto, una proteína o un ácido nucleico, sino también un objeto tal como un vector, una partícula de virus, una célula, un sistema de liberación de fármacos que incluye uno o más elementos, o una micromáquina. La sustancia u objeto tiene preferiblemente la propiedad de tener algún efecto sobre las células diana, y los ejemplos incluyen aquellos que marcan las células diana o controlan (por ejemplo aumentando o reduciendo) la actividad o el crecimiento de las células diana.

En la presente invención, el portador suministra "un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón". La actividad de las células productoras de matriz extracelular en el riñón en el presente documento se refiere a diversas actividades tales como secreción, captación o migración mostrada por células productoras de matriz extracelular en el riñón, y en la presente invención, en particular, entre éstas, normalmente significa una actividad involucrada en la aparición, evolución y/o recaída de fibrosis renal y especialmente nefritis diabética. Ejemplos de tal actividad incluyen, pero no se limitan a, la producción/secreción de una sustancia biológicamente activa tal como PAI-1, y de un componente de matriz extracelular tal como colágeno, proteoglicano, tenascina, fibronectina, trombospondina, osteopontina, osteonectina o elastina, y la supresión de la actividad de descomposición de estos componentes de matriz extracelular.

Por tanto, el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón mencionado en la presente memoria descriptiva puede ser cualquier fármaco que directamente o indirectamente suprime las acciones físicas, químicas y/o fisiológicas, etc. de dichas células relacionadas con la aparición, evolución y/o recaída de fibrosis renal, y ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan a, un fármaco que inhibe la actividad o producción de la sustancia biológicamente activa anterior, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que neutralizan la sustancia biológicamente activa anterior, una sustancia que suprime la expresión de la sustancia biológicamente activa anterior, tal como una molécula de iARN (por ejemplo ARNip, ARNhc, ARNdd, miARN, piARN, ARNipar), una ribozima, un ácido nucleico antisentido (incluyendo ARN, ADN, APN, o un material compuesto de los mismos), o una sustancia que tiene un efecto dominante negativo tal como un mutante dominante negativo, o un vector que los expresa, o un fármaco que inhibe la producción y secreción del componente de matriz extracelular anterior, por ejemplo, una sustancia que suprime la expresión del componente de matriz extracelular, tal como una molécula de iARN (por ejemplo ARNip, ARNhc, ARNdd, miARN, piARN, ARNipar), una ribozima, un ácido nucleico antisentido (incluyendo ARN, ADN, APN, o un material compuesto de los mismos), o una sustancia que tiene un efecto dominante negativo tal como a un mutante dominante negativo, o un vector que los expresa, un inhibidor de actividad celular tal como un bloqueante de canales de sodio, un inhibidor de crecimiento celular tal como un agente alquilante (tal como ifosfamida, nimustina, ciclofosfamida, dacarbazina, melfalán o ranimustina), un antibiótico antitumoral (tal como idarubicina, epirubicina, daunorubicina, doxorubicina, pirarubicina, bleomicina, peplomicina, mitoxantrona o mitomicina C), un antimetabolito (tal como gemcitabina, enocitabina, citarabina, tegafur/uracilo, una mezcla tegafur/gimeracilo/oteracilo potásico, doxifluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato o mercaptopurina), un alcaloide tal como etopósido, irinotecán, vinorelbina, docetaxel, paclitaxel, vincristina, vindesina o vinblastina, y un complejo de platino tal como carboplatino, cisplatino o nedaplatino, así como un inductor de apoptosis tal como ciclosporina.

Ejemplos del fármaco para inhibir la producción / secreción de un componente de matriz extracelular incluyen, pero no se limitan a, HSP47, que es una chaperona molecular específica para colágeno esencial para transporte intracelular y maduración de moléculas, que son comunes a los procesos sintéticos de diversos tipos de colágeno.

Además, el "fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón" en la presente invención puede ser cualquier fármaco que directamente o indirectamente estimula las acciones físicas, químicas y/o fisiológicas de células productoras de matriz extracelular en el riñón directamente o indirectamente relacionadas con la supresión de la aparición, evolución y/o recaída de fibrosis renal, por ejemplo, la producción/secreción de MMP (incluyendo MMP1, MMP2), activador del plasminógeno (PA). Ejemplos de fármaco de este tipo incluyen, pero no se limitan a, un activador o un potenciador de expresión de estas sustancias. La composición farmacéutica de la presente invención puede suministrar uno o más tipos de los fármacos mencionados anteriormente.

El ARNip (ARN interferente pequeño) que puede usarse en la presente invención incluye, además de ARNip en sentido estricto, ARN dúplex y formas modificadas de los mismos tales como miARN (micro ARN), ARNhc (ARN en horquilla corto), piARN (ARN de interacción con Piwi), y ARNipar (ARNip asociado a repetición). Pueden usarse un ARNip como un ARN pequeño funcional en un sentido amplio y un vector que expresa el ARNip por ejemplo según instrucciones en un texto convencional (Experimental Medicine Special Edition, Revised RNAi Experimental Protocol 2004, Yodosha, RNAi Experimental Frequently Asked Questions 2006, Yodosha).

Puede llevarse a cabo el diseño de estos ARNip apropiadamente por un experto en la técnica según instrucciones en un texto convencional (Experimental Medicine Special Edition, Revised RNAi Experimental Protocol 2004, Yodosha, RNAi Experimental Frequently Asked Questions 2006, Yodosha) mediante referencia a una secuencia de ARN mensajero de un gen diana y una secuencia de ARNip conocida.

La sustancia que suministra la composición farmacéutica de la presente invención puede ser, pero no se limita a, un fármaco para suprimir la aparición, evolución y/o recaída de fibrosis renal distinto a los fármacos mencionados anteriormente, y ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, un agente medicinal que actúa sobre el sistema de óxido nítrico tal como un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un antagonista del receptor de la angiotensina II AT1, un antagonista de aldosterona, un antagonista del receptor de endotelina, un bloqueante α , un bloqueante β , un agente inmunosupresor, un inhibidor del metabolismo de matriz extracelular, un inhibidor del sistema de complemento, un inhibidor de quimiocina, un inhibidor de TGF- β , o un inhibidor de fosfodiesterasa 5, un inhibidor de NF κ B, un inhibidor de Rho, un inhibidor de p38 MAPK, un inhibidor de PI3K γ , calicreína, un antagonista del receptor de interleucina 1, BMP-7, un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral α , un anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de las plaquetas D, un inhibidor de producción del inhibidor-1 del activador del plasminógeno, un agonista selectivo del receptor de prostaglandina 4, un inhibidor de la síntesis de colágeno tipo I, un inhibidor de sulfotransferasa de proteoglucano de sulfato de condroitina, un inhibidor de reductasa de epóxido de vitamina K, un inhibidor de la formación de productos finales de glicación, un agonista del receptor 2A de adenosina A2A, un antagonista del receptor de endotelina, un inhibidor del VEGF, un activador o un potenciador de expresión de proteasa ADAM (un dominio de metaloproteasa y desintegrina), un activador o un potenciador de expresión de proteasa ADAMTS (un metaloproteasa y desintegrina con motivos de trombospondina), y relaxina o un potenciador de expresión de la misma siempre que la composición farmacéutica de la presente

invención contenga al menos un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón. En la presente memoria descriptiva, ejemplos del potenciador de expresión incluyen, pero no se limitan a, un agente de terapia génica tal como un vector que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína que es una diana para la potenciación de la expresión. Estos fármacos pueden usarse en combinación con la composición de la presente invención, que se describe más adelante. “Usada en combinación” incluye sustancialmente la administración simultánea de la composición de la presente invención y el fármaco mencionado anteriormente y la administración del mismo en momentos espaciados dentro del mismo periodo de tratamiento. En el último caso, la composición de la presente invención puede administrarse o bien antes o bien después del fármaco.

En una realización de la presente invención, como fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón, puede citarse un inhibidor de HSP47, por ejemplo, un ARNip correspondiente a cada uno de los mismos.

La sustancia u objeto suministrado por el portador contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede estar marcado o sin marcar. El marcaje permite monitorizar el éxito o el fracaso de administración a células diana, o el aumento y la disminución de células diana, etc., y es particularmente útil no solo a nivel de investigación / pruebas sino también a nivel clínico. Un marcador puede seleccionarse de cualquier marcador conocido por un experto en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier radioisótopo, material magnético, sustancia que se une a un sustancia marcada (por ejemplo un anticuerpo), sustancia fluorescente, fluoróforo, sustancia quimioluminiscente, enzima. Un marcador puede adherirse a un componente constituyente de portador o puede soportarse en un portador como una sustancia independiente a suministrar.

En la presente invención, “para células productoras de matriz extracelular en el riñón” o “para administración a células productoras de matriz extracelular en el riñón” significa que es adecuado para su uso para células productoras de matriz extracelular en el riñón como células diana, y esto incluye, por ejemplo, que sea posible suministrar una sustancia a esas células, más rápidamente, eficazmente, y/o en mayor cantidad que a otras células, por ejemplo, células normales. Por ejemplo, el portador de la presente invención puede suministrar una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el riñón en una tasa y/o eficacia de 1,1 veces o más, 1,2 veces o más, 1,3 veces o más, 1,5 veces o más, 2 veces o más, o incluso 3 veces o más comparado con otras células.

La presente invención por tanto se refiere a una composición farmacéutica para tratar la nefritis diabética que contiene un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón, incluyendo la composición el portador mencionado anteriormente además del fármaco mencionado anteriormente para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón, y se describe adicionalmente el uso del portador en la producción de dicha composición.

El término fibrosis renal incluye cualquier nefritis intersticial, por ejemplo, nefritis estreptocócica, nefritis estafilocócica, nefritis neumocócica, varicela, hepatitis B, hepatitis C, nefritis viral asociada a VIH, nefritis debida a una infección parasitaria tal como malaria, nefritis intersticial infecciosa asociada a nefritis fúngica, nefritis por micoplasma, lupus eritematoso sistémico (nefritis lúpica), esclerodermia sistémica (enfermedad del colágeno renal), nefritis intersticial asociada a una enfermedad del colágeno tal como síndrome de Sjögren, nefritis asociada a una enfermedad inmunitaria de los vasos sanguíneos tal como nefritis púrpura, poliarteritis, o glomerulonefritis rápidamente progresiva, nefritis intersticial asociada a exposición a radiación, nefritis intersticial inducida por fármacos debido a un fármaco con oro, un AINE, penicilamina, un agente antineoplásico tal como bleomicina, un antibiótico, Paraquat, nefritis alérgica debida a picadura de insectos, polen, una planta de la familia de *Anacardiaceae*, nefritis por amiloidosis, nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefritis asociada a nefroesclerosis maligna, una poliquistosis renal, nefritis tubulointersticial, nefritis asociada a toxicosis gestacional o un cáncer, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía por IgA, nefritis crioglobulinémica mixta, nefritis por síndrome de Goodpasture, nefritis granulomatosa de Wegener, y una forma crónica de nefritis intersticial provocada por nefritis intersticial idiopática tal como nefritis intersticial aguda. En la presente invención se trata la nefritis diabética.

En la composición farmacéutica de la presente invención, siempre que el retinoide contenido en el portador está presente en un modo de manera que funcione como un agente de selección como diana, el portador puede contener una sustancia a suministrar en su interior, puede unirse al exterior de una sustancia a suministrar, o puede mezclarse con una sustancia a suministrar. Por tanto, dependiendo de la vía de administración y la manera en la que el fármaco se libera, etc., la composición puede recubrirse con un material apropiado tal como, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material de desintegración temporizada, o puede incorporarse en un sistema de liberación de fármacos apropiado. Además, la composición de la presente invención puede estar en forma de un complejo de un principio activo y un liposoma de unión a retinoide, es decir, un lipoplex.

La composición de la presente invención se usa como medicamento (es decir, una composición farmacéutica) y puede administrarse mediante diversas vías incluyendo vías tanto oral como parenteral, y ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intrapulmonar, traqueobronquial, intratraqueal, intrabronquial, nasal, intrarrectal, intraarterial, intraportal, intraventricular,

intramedular, intraganglios linfáticos, intralinfática, intracerebral, intratecal, intracerebroventricular, transmucosa, percutánea, intranasal, intraperitoneal e intrauterina, y puede formularse en una forma farmacéutica adecuada para cada vía de administración. Una forma farmacéutica y método de formulación de este tipo pueden seleccionarse como apropiados de cualquier forma farmacéutica y método conocidos (véase por ejemplo Hyojun Yakuzaijaku (Standard Pharmaceutics), Ed. por Yoshiteru Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003).

Ejemplos de formas farmacéuticas adecuadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, gránulo, comprimido, cápsula, líquido, suspensión, emulsión, gel y jarabe, y ejemplos de formas farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen inyecciones tales como una disolución inyectable, una suspensión inyectable, una emulsión inyectable, y una inyección a preparar en el momento de su uso. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en una forma tal como una disolución o suspensión estéril isotónica, acuosa o no acuosa.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar la fibrosis renal, incluyendo el procedimiento una etapa de formular un retinoide como agente de selección como diana para células productoras de matriz extracelular en el riñón y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón como un principio activo. El método para formular el retinoide no está particularmente limitado siempre que el retinoide pueda funcionar como agente de selección como diana para células productoras de matriz extracelular en el riñón en la composición en la que se formula, y por ejemplo pueden usarse diversos métodos descritos en la presente memoria descriptiva. Además, el método para formular el principio activo no se limita particularmente siempre que el principio activo pueda mostrar un efecto predeterminado, y puede usarse cualquier método conocido. La formulación del principio activo puede llevarse a cabo al mismo tiempo que la formulación del retinoide o puede llevarse a cabo antes o después de formular el retinoide. Por ejemplo, si la composición contiene un componente constituyente del portador distinto al retinoide, la formulación del principio activo puede llevarse a cabo mezclando el principio activo con un portador en el que ya se ha formulado el retinoide como el agente de selección como diana, puede llevarse a cabo mezclando el retinoide, un componente constituyente del portador distinto al retinoide, y el principio activo al mismo tiempo, o puede llevarse a cabo formulando el principio activo con un componente constituyente del portador distinto al retinoide y luego mezclando esto con el retinoide.

La cantidad de retinoide formulado, etc. es tal como se describió anteriormente con respecto al portador tal como se emplea en la presente invención. Además, la cantidad de principio activo es una cantidad que, cuando se administra como la composición, puede suprimir la aparición o recaída de fibrosis renal y especialmente nefritis diabética, mejorar el estado clínico, aliviar sus síntomas, o retrasar o parar su evolución, y preferiblemente puede ser una cantidad que puede prevenir la aparición o recaída de fibrosis renal o curarla. También es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que supere al beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo puede conocerse o determinarse apropiadamente mediante un ensayo *in vitro* usando células cultivadas o mediante un ensayo en un animal modelo tal como un ratón, rata, perro o cerdo, y tales métodos de ensayo son bien conocidos para un experto en la técnica. Ejemplos de un animal modelo con fibrosis renal incluyen uno descrito en el documento JP, A, 2009-178143. La cantidad de principio activo formulada puede variar según la forma de administración de la composición. Por ejemplo, si una pluralidad de unidades de la composición se usa en una administración, la cantidad de principio activo formulada en una unidad de la composición puede ser una obtenida dividiendo la cantidad de principio activo requerida para una administración entre el número de unidades. Tal ajuste de la cantidad formulada puede llevarse a cabo apropiadamente por un experto en la técnica.

La composición farmacéutica de la presente invención puede proporcionarse en cualquier forma, pero desde el punto de vista de la estabilidad en almacenamiento, puede proporcionarse preferiblemente en una forma que pueda prepararse en el momento de su uso, por ejemplo en una forma de manera que pueda prepararse en un lugar de tratamiento médico o en los alrededores del mismo por un/a médico y/o farmacéutico/a, enfermero/a u otro/a paramédico. En este caso, la composición farmacéutica de la presente invención se proporciona como uno o más envases que contienen al menos un constituyente esencial para la misma, y se prepara antes de usar, por ejemplo, en el plazo de 24 horas antes de usar, preferiblemente en el plazo de 3 horas antes de usar, y más preferiblemente, inmediatamente antes de usar. Cuando se lleva a cabo la preparación, puede usarse según sea apropiado un reactivo, un disolvente, material de preparación, etc. que están normalmente disponibles en el lugar de preparación.

Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona un kit para preparar un portador o composición, incluyendo el kit uno o más envases que contienen un retinoide solo o en combinación, y/o una sustancia a suministrar, y/o una sustancia constituyente de portador distinta al retinoide, así como un constituyente que es necesario para el portador o composición proporcionada en la forma de un kit de este tipo. El kit descrito en el presente documento puede contener, además de lo anterior, instrucciones tales como por ejemplo una explicación por escrito o un medio de registro electrónico CD o DVD con métodos para preparar o administrar el portador y la composición de la presente invención. Además, el kit descrito en el presente documento puede contener todos los constituyentes para completar la composición farmacéutica de la presente invención, pero no necesita contener necesariamente todos los constituyentes. Por consiguiente, el kit descrito en el presente documento no necesita contener un reactivo o un disolvente que esté normalmente disponible en un lugar de tratamiento médico, una instalación experimental, etc., tal como, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica o disolución de glucosa.

La presente divulgación proporciona además un método para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón o para tratar la fibrosis renal, incluyendo el método administrar una cantidad eficaz de la composición anterior a un sujeto que lo necesite. Aquí, la cantidad eficaz, en por ejemplo un método para tratar la fibrosis renal, es una cantidad que suprime la aparición o recaída de fibrosis renal, mejora el estado clínico, alivia sus síntomas, o retrasa o para su evolución, y es preferiblemente una cantidad que evita la aparición o recaída de fibrosis renal o la cura. También es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que supera el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo puede determinarse apropiadamente mediante un ensayo *in vitro* usando células cultivadas o mediante un ensayo en un animal modelo tal como un ratón, rata, perro o cerdo, y tales métodos de ensayo son bien conocidos por un experto en la técnica. Además, la dosis del retinoide contenido en el portador y la dosis del fármaco usada en el método descrito en el presente documento son conocidas por un experto en la técnica, o pueden determinarse apropiadamente mediante el ensayo mencionado anteriormente, etc. Ejemplos de un animal modelo con fibrosis renal incluyen uno descrito en el documento JP, A, 2009-178143.

La dosis específica de la composición administrada en el método descrito en el presente documento puede determinarse teniendo en cuenta diversas condiciones con respecto al sujeto que necesita el tratamiento, tal como la gravedad de los síntomas, el estado general de salud del sujeto, la edad, peso corporal y género del sujeto, dieta, la vía de administración, el momento y frecuencia de administración, medicación concomitante, grado de respuesta al tratamiento, cumplimiento del tratamiento, etc.

La vía de administración incluye diversas vías incluyendo vías tanto oral como parenteral tales como, por ejemplo, oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intrapulmonar, traqueobronquial, intratraqueal, intrabronquial, nasal, intrarrectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, intramedular, intra ganglios linfáticos, intralinfática, intracerebral, intratecal, intracerebroventricular, transmucosa, percutánea, intranasal, intraperitoneal e intrauterina.

La frecuencia de administración varía dependiendo de las propiedades de la composición a usar y las condiciones mencionadas anteriormente del sujeto, y puede ser, por ejemplo, una pluralidad de veces al día (más específicamente 2, 3, 4, 5, o más veces al día), una vez al día, cada pocos días (más específicamente, cada 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, etc.), varias veces a la semana (por ejemplo 2, 3, 4 veces, etc. a la semana), una vez a la semana o cada pocas semanas (más específicamente 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, y cuando está previsto un tratamiento de fibrosis renal, normalmente significa un sujeto afectado por nefritis diabética o fibrosis renal o en riesgo de ser afectado por eso. Cuando está prevista la prevención de fibrosis renal, por ejemplo, ejemplos normales incluyen, pero no se limitan a, un sujeto afectado por nefritis diabética, en particular nefritis diabética debido a diabetes tipo II.

Además, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervención terapéutica y/o profiláctica médicamente aceptable con el propósito de la cura, remisión temporal o prevención de un trastorno. Por ejemplo, el término "tratamiento" incluye intervención médicamente aceptable para diversos propósitos, incluyendo retrasar o detener la evolución de la fibrosis renal, la regresión o desaparición de una lesión, y la prevención de aparición y prevención de recaída de fibrosis renal.

La presente divulgación también proporciona un método que utiliza el portador anterior para suministrar un fármaco a células productoras de matriz extracelular en el riñón. Este método incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una etapa de soportar una sustancia a suministrar en el portador, y una etapa de administrar o añadir el portador que soporta la sustancia a suministrar a un organismo o un medio, por ejemplo un medio de cultivo, que contiene células productoras de matriz extracelular en el riñón. Estas etapas pueden alcanzarse apropiadamente según cualquier método conocido o un método descrito en la presente memoria descriptiva. El método de administración puede combinarse con otro método de administración, por ejemplo, otro método de administración para dirigirse al riñón. Además, el método incluye una realización realizada *in vitro* y una realización en la que se seleccionan como diana células productoras de matriz extracelular en el riñón dentro del cuerpo.

[Ejemplos]

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos, pero solo son ejemplos y no limitan en absoluto la presente invención tal como se define por las reivindicaciones dependientes.

Ejemplo 1 Preparación de liposoma de unión a VA que contiene ARNip

Como ARNip, se usó uno que tiene la siguiente secuencia.

Nombre de secuencia: Hsp47-C

5'-GGACAGGCCUGUACAACUA-dTdT-3' (sentido, SEQ ID NO: 1)

5'-UAGUUGUACAGGCCUGUCC-dTdT-3' (antisentido, SEQ ID NO: 2)

5 Como disoluciones antes de mezclar, se prepararon vitamina A 10 mM (retinol, Sigma; también denominado a continuación en el presente documento VA, disuelto en dimetilsulfóxido), Lipotrust SR 1 mM (Hokkaido System Science Co., Ltd.; también denominado a continuación en el presente documento un liposoma o un lípido constituyente de liposomas, disuelto en agua libre de nucleasas), y se disolvió ARNip 10 µg/ml (Hsp47-C en agua libre de nucleasas). Por consiguiente, se añadió VA disuelto en dimetilsulfóxido al Lipotrust SR disuelto en agua libre de nucleasas preparado anteriormente en una razón de 1:1 (mol/mol), y entonces se agitó la mezcla mediante un vórtex durante 15 segundos y se dejó que permaneciera en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos en estado protegido de la luz, formándose así un complejo. Se mezcló este complejo con ARNip, dando así una disolución para administración de liposoma de unión a VA-ARNip de Hsp47C. Esta disolución para administración contenía, por 100 µl, 75 nmol de VA, 75 nmol de lípido constituyente de liposomas, y 112,5 µg de ARNip, correspondiendo esto a 3,00 µmol/kg de peso corporal de VA, 3,00 µmol/kg de peso corporal del lípido constituyente de liposomas, y 4,5 mg/kg de peso corporal de ARNip. VA se expuso sobre la superficie del liposoma.

Ejemplo 2 Estudio del efecto terapéutico en ratón modelo de fibrosis renal

20 (1) Preparación del animal modelo de fibrosis renal

La preparación de ratones modelo de fibrosis renal se encomendó a Stelic Institute & Co. Específicamente, a ratones macho C57BL6J/JcL de 2 días de edad (CLEA Japón, Inc.), después de su nacimiento se les dio un inhibidor de *N*-acetil-β-D-glucosaminidasa, se criaron alimentándolos con pienso CE-2 (CLEA Japón, Inc.) y agua estéril hasta las 25 4 semanas de edad, se destetaron cuando alcanzaron una edad de 4 semanas, y entonces se criaron alimentándolos con High Fat Diet 32 (CLEA Japón, Inc.), que tiene un contenido bruto de grasa mayor que el de la dieta normal, y agua estéril hasta las 12 semanas de edad, preparando por tanto ratones STAM. Se sabe que estos ratones modelo se verán afectados por nefritis diabética (véase JP, A, 2009-178143) y puede examinarse la fibrosis renal debida a nefritis diabética.

30 Los ratones modelo mencionados anteriormente se dividieron en los cuatro grupos a continuación, con 10 animales por grupo, a la edad de 12 semanas y 3 días.

35 (Primer grupo) ratones STAM sin tratamiento, grupo de control previo al tratamiento (a continuación en el presente documento, grupo (Pre) NT-STAM)

(Segundo grupo) grupo de ratones STAM sin tratamiento (a continuación en el presente documento, grupo NT-STAM)

40 (Tercer grupo) grupo tratado con glucosa al 5 % (a continuación en el presente documento, grupo vehículo)

(Cuarto grupo) grupo tratado con liposoma de unión a VA-ARNip de Hsp47C (a continuación en el presente documento, grupo VL-Hsp47C)

45 (2) Administración de disolución para administración

Para el grupo (Pre) NT-STAM, después de dividir en grupos, se sacrificaron los ratones antes de empezar el tratamiento y se comprobó el estado clínico. Para los dos grupos mencionados anteriormente distintos al grupo NT-STAM, se administró la disolución correspondiente para administración a continuación mediante inyección en vena de la cola un total de 10 veces cada día a partir del momento de 12 semanas y 5 días de edad.

50 (Tercer grupo) Como un control de disolvente, se usó una disolución para administración (vehículo o glucosa al 5 %) en la que se mezclaron 0,75 ml/kg de peso corporal de agua libre de nucleasas y 3,250 ml/kg de peso corporal de glucosa al 5 % (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

55 (Cuarto grupo) Se usó una disolución para administración (liposoma de unión a VA- ARNip de Hsp47C o VL-Hsp47C) en la que se mezclaron 75 nmol de VA, 75 nmol de lípido constituyente de liposomas, y 112,5 µg de ARNip por 100 µl de disolución para administración y se llevó a cabo el ajuste final usando glucosa al 5 %.

60 El peso corporal en la fecha cuando empezó la administración se definió como el peso corporal patrón, y se administró 4 ml/kg de peso corporal de cada disolución para administración en la vena de la cola cuando el porcentaje de cambio de peso corporal en la fecha de administración estaba dentro del 20 % del peso corporal patrón. Cuando sobrepasaba el 20 %, ese peso corporal se definió después como un nuevo peso corporal patrón, y se restablecía la dosis.

65

(3) Estudio del efecto de mejora en la fibrosis renal

Al 2º día después de que se completó la administración final (15 semanas, 4 días), los ratones fueron sacrificados extrayendo la sangre del corazón con anestesia de dietil éter, y se extrajeron los riñones.

Se fijaron los riñones extraídos, usando un tampón de ácido fosfórico-paraformaldehído al 4 % y se incrustaron en parafina, y se prepararon muestras de sección delgada. Con el fin de examinar un efecto terapéutico en fibrosis renal, se llevó a cabo tinción con rojo sirio (tinción de fibras que tiñe específicamente de rojo el colágeno), y se tomó una imagen usando un microscopio de fluorescencia todo en uno BZ-9000 (Keyence Corporation) a 80x. Se llevó a cabo el análisis tomando aleatoriamente imágenes de 20 campos de visión en la región del córtex renal, y se cuantificaron usando software de análisis que venía con el BZ-9000.

La figura 1 muestra una imagen microscópica representativa del glomérulo de la región del córtex renal en cada grupo tratado. La tinción con rojo sirio es una tinción de fibras específica para colágeno, y un sitio de fibrosis se tiñe con rojo hasta rosa. A partir de los resultados de microscopio, no se vieron diferencias entre cualquiera de los grupos con respecto a engrosamiento de la membrana basal glomerular, el grado de fibrosis en la región mesangial (estroma) y los alrededores de células tubulares fue leve para el grupo tratado con VL-Hsp47C comparado con los otros tres grupos, y hubo una mejora en la fibrosis renal (ampliación de la región mesangial mostrada por una flecha). Además, se tomaron aleatoriamente 20 campos de visión en la región del córtex renal por ratón individual, y se calculó la proporción de la región fibrótica. A partir de los resultados mostrados en la figura 2, en el grupo tratado con VL-Hsp47C, la proporción de una región positiva para rojo sirio fue significativamente menor que en los grupos NT-STAM y vehículo, y hubo una mejora en la fibrosis renal. Se llevó a cabo una evaluación de diferencias estadísticamente significativas usando la prueba de la *t*.

A partir del resultado anterior, se observó una tendencia de mejora de la fibrosis en el grupo tratado con VL-Hsp47C. Considerando que ARNip básicamente actúa dentro del citoplasma, este resultado sugiere que el retinoide funciona como un agente que selecciona como diana células productoras de matriz extracelular en el riñón, suministra eficazmente un fármaco a las mismas células, y por tanto puede suprimir la evolución de la fibrosis renal.

Ejemplo 3 Silenciamiento génico en células productoras de matriz extracelular en riñón mediante liposoma de unión a VA que contiene ARNip

(1) Aislamiento y recogida de células

Se aislaron células productoras de matriz extracelular en el riñón, que tienen propiedades similares a las de las células estrelladas hepáticas, y se recogieron tal como sigue.

En primer lugar, se prepararon con antelación los cinco tipos de disoluciones a continuación. Se almacenaron todas las disoluciones a 4 °C.

Disolución de EGTA: Se añadieron 1,19 g de HEPES y 0,1 g de EGTA a 500 ml de HBSS (Invitrogen 14170) y se mezcló.

Disolución de colagenasa al 0,02 %: Se añadieron 1,19 g de HEPES, 0,235 g de CaCl₂ 2H₂O y 0,1 g de colagenasa (Yakult YK- 102) a 500 ml de HBSS (Invitrogen 24020) y se mezcló.

Disolución de colagenasa al 0,02 % + proteasa al 0,1 %: Se añadieron 40 mg de proteasa (Sigma P6911-1G) a 40 ml de colagenasa al 0,02 % y se mezcló.

Solución de Hanks: Se añadieron 0,05 g de MgSO₄ a 500 ml de HBSS (Invitrogen 24020) y se mezcló.

Disolución de Nycodenz® al 10 % (Axis-Shield Prod. n.º 1114542-1): Se añadieron 50 g de Nycodenz® a 500 ml de agua destilada y se mezcló y se disolvió.

Se anestesió un ratón (C57BL6/J macho, de 20 a 30 g, de 6 a 8 semanas de edad), se afeitó el área abdominal y se realizó una incisión a lo largo de la línea media, y se extrajeron los riñones. Así, se lavaron los riñones extraídos con 30 ml de disolución de EGTA tres veces, eliminando así la sangre. Se colocaron los riñones en 5 ml de disolución de EGTA, y se cortaron finamente usando tijeras. Se añadió disolución de EGTA a los riñones cortados para producir un volumen total de 30 ml, y se llevó a cabo centrifugación a 1300 rpm durante 5 minutos. Después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante, se añadieron 30 ml de disolución de colagenasa al 0,02 % + proteasa al 0,1 %, y se transfirió la mezcla a un matraz Erlenmeyer y se agitó a 37 °C durante 20 minutos. Se filtró la disolución agitada usando un filtro de células (Falcon 352360), y se centrifugó el filtrado a 1300 rpm durante 5 minutos. Se suspendió el sedimento en solución de Hanks, y se mezcló disolución de Nycodenz® al 10 % con la solución de Hanks para dar una concentración final de Nycodenz® al 8 %. Se centrifugó la mezcla de disolución a 1400xg durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó adicionalmente a 1300 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió la muestra en FBS al 10 %-DMEM (Sigma D6546), y se sembró en un matraz

T-75 (BD 353136).

(2) Experimento de silenciamiento génico

5 1. Preparación de liposoma de unión a VA que contiene ARNip

Como ARNip, se usó uno que tiene la siguiente secuencia.

Nombre de secuencia: Hsp47-C

10

5'-GGACAGGCCUGUACAACUA-dTdT-3'(sentido, SEQ ID NO: 1)

5'-UAGUUGUACAGGCCUGUCC-dTdT-3'(antisentido, SEQ ID NO: 2)

15

Como disoluciones antes de mezclar, se prepararon vitamina A 10 mM (R7632, retinol, Sigma; abreviado a continuación en el presente documento como VA, disuelto en dimetilsulfóxido), Lipotrust SR 1 mM (N301, Hokkaido System Science Co., Ltd.; también denominado a continuación en el presente documento un liposoma o un lípido constituyente de liposomas, disuelto en agua libre de nucleasas), y ARNip 10 mg/ml (Hsp47-C disuelto en agua libre de nucleasas). Por consiguiente, se añadió VA disuelto en dimetilsulfóxido al Lipotrust SR disuelto en agua libre de nucleasas preparado anteriormente en una razón de 1:1 (mol/mol), y entonces se agitó la mezcla mediante vórtex durante 15 segundos y se dejó que permaneciera en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos en un estado protegido de la luz, formándose así un complejo. Se mezcló este complejo con ARNip 10 mg/ml, dando así el liposoma de unión a VA-ARNip de Hsp47C. Cuando no se usó VA, se añadió una cantidad igual de dimetilsulfóxido en lugar de VA. Se llevó a cabo la preparación de manera que cuando se transfectó a las células, la concentración final de Lipotrust SR/VA era de 7,7 μ M y la de ARNip era de 869 nM.

25

2. Experimento de transfección

30

Como células para el experimento, se sembraron por adelantado las células productoras de matriz extracelular recogidas de riñones de ratón en el método de recogida mencionado anteriormente en una placa de 6 pocillos con $0,2 \times 10^5$ células/pocillo y se cultivaron en FBS al 10 %-DMEM a 37 °C durante 2 días.

35

Después de 2 días de cultivo, se retiró todo el FBS al 10 %-DMEM de cada pocillo antes de la transfección, se añadieron 900 μ l de FBS al 10 %-DMEM nuevo, y se llevó a cabo el cultivo a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos.

40

Se añadieron con cuidado a cada pocillo 100 μ l de liposoma de unión a VA-ARNip de Hsp47C o liposoma-ARNip de Hsp47C preparado anteriormente en "1" y se llevó a cabo incubación a 37 °C durante 30 minutos, entonces se retiró todo el sobrenadante de cultivo de cada pocillo, se añadieron 2 ml de FBS al 10 %-DMEM nuevo, y se llevó a cabo el cultivo a 37 °C durante 2 días. Después de 2 días, se aisló el ARN de las células usando un minikit RNeasy (QIAGEN 74104), y se llevó a cabo RT-PCR mediante una mezcla maestra de ARN a ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems 4390779), dando así ADNc. Se llevó a cabo PCR cuantitativa mediante una mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green (Applied Biosystems 4368708) usando el ADNc así obtenido, y se examinó el efecto en el silenciamiento génico. Se muestran los resultados en la figura 3.

45

Los resultados anteriores muestran que el ARNip para el gen de HSP47 usado en el ejemplo 2 suprime la expresión del gen de HSP47 en células productoras de matriz extracelular en el riñón, sugiriendo que el ARNip contenido en el agente de tratamiento de la presente invención se incorpora específicamente en las células productoras de matriz extracelular en el riñón y suprime la expresión del gen diana en las células, suprimiendo por tanto la evolución de la fibrosis renal.

50

Lista de secuencias

55

<110> NITTO DENKO CORPORATION

<120> AGENTE PARA TRATAR LA FIBROSIS RENAL

<130> PCT2453ND

60

<150> Documento JP2010-138070

<151> 17-06-2010

<160> 2

65

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> cadena sentido de Hsp47-C

<400> 1
10 **ggacaggccu guacaacuat t** 21

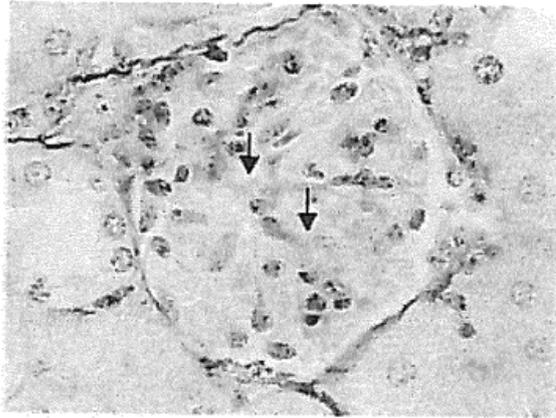
<210> 2
<211> 21
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> cadena antisentido de Hsp47-C
20 <400> 2
uaguuguaca ggccugucct t 21

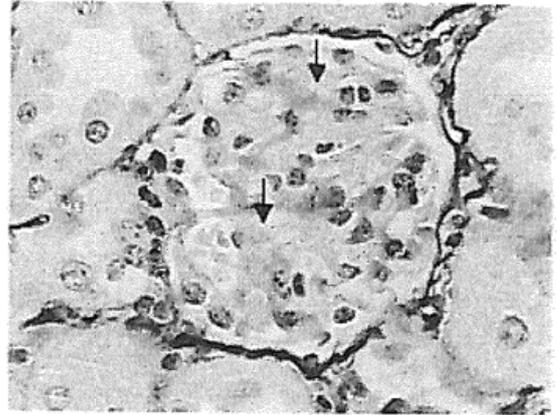
REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de nefritis diabética, comprendiendo la composición un portador que comprende un retinoide que estimula la administración de una sustancia a las células productoras de matriz extracelular en el riñón y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón, en la que el portador tiene la forma de un liposoma, y la razón molar de retinoide y lípido contenidos en el liposoma es de 8:1 a 1:4.
- 10 2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el retinoide comprende retinol.
- 15 3. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular en el riñón se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de actividad o producción de PAI-1, un inhibidor de actividad celular, un inhibidor de crecimiento, un inductor de apoptosis, y una molécula de iARN, ribozima, ácido nucleico antisentido, o polinucleótido quimérico de ADN/ARN que seleccionan como diana al menos una de las moléculas constituyentes de la matriz extracelular o moléculas involucradas en la producción o secreción de las moléculas constituyentes de la matriz extracelular o un vector que expresa los mismos.
- 20 4. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células productoras de matriz extracelular es un inhibidor de HSP47.
- 25 5. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el fármaco y el portador se mezclan en un lugar de tratamiento médico o en sus alrededores.

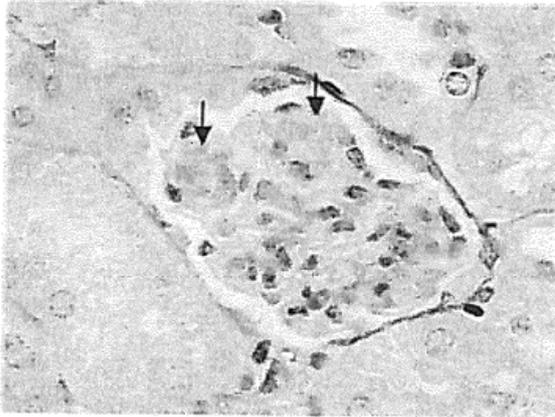
[Fig.1]



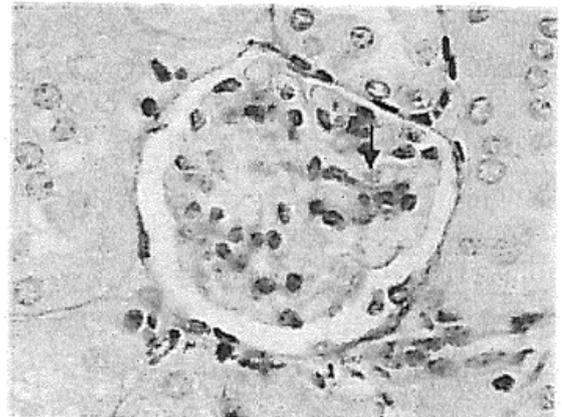
(a).(Pre) NT-STAM



(b).NT-STAM

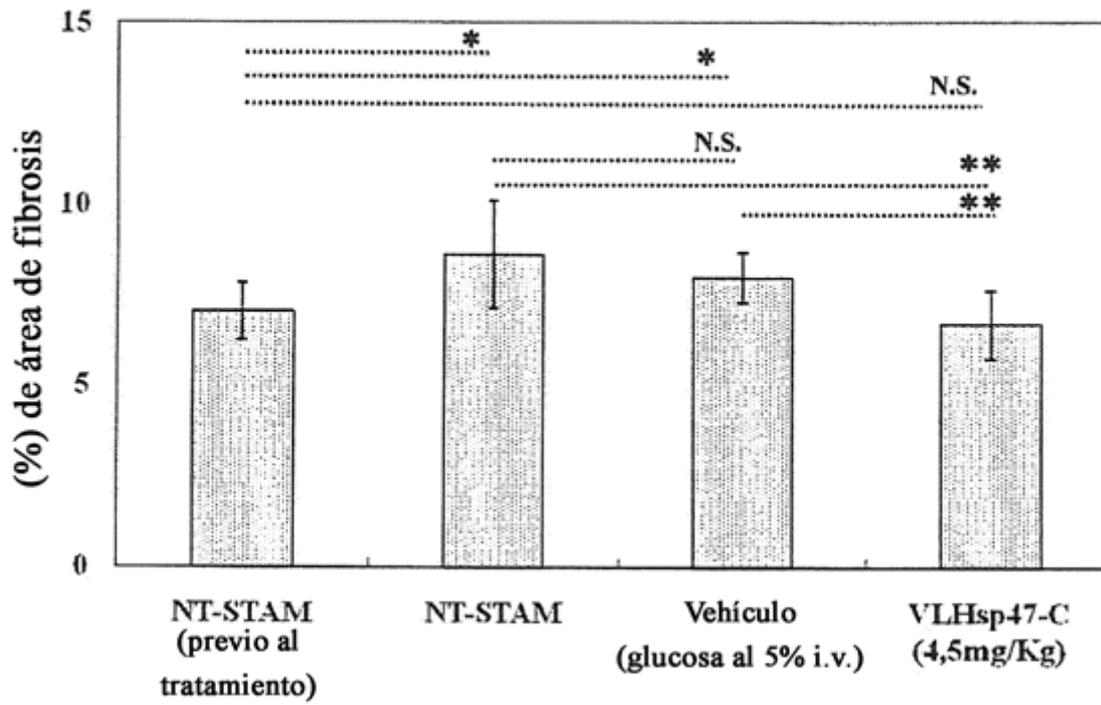


(c).Vehículo



(d).VL-Hsp47C

[Fig.2]



[Fig.3]

