

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 054**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/69** (2007.01)  
**A61K 47/54** (2007.01)  
**A61K 45/08** (2006.01)  
**A61P 1/04** (2006.01)  
**C12N 5/071** (2010.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**G01N 33/15** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2012 PCT/JP2012/079783**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13073667**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12849808 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 2781225**

54 Título: **Agente de tratamiento de la fibrosis intestinal**

30 Prioridad:

**18.11.2011 JP 2011253085**

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

**15.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AYABE, TOKIYOSHI;  
NAKAMURA, KIMINORI;  
MINOMI, KENJIRO y  
TANAKA, YASUNOBU**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 754 054 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 de tratamiento de la fibrosis intestinal

**5 [Campo técnico]**

La presente invención se refiere a un portador de administración de sustancias dirigidas a células productoras de matriz extracelular en el intestino, y a una composición para tratar la fibrosis del intestino tal como se define en las reivindicaciones.

10

**[Técnica anterior]**

15

La fibrosis del intestino es un estado patológico caracterizado por la deposición excesiva de tejido cicatricial en la pared del intestino y sigue a la inflamación crónica del intestino, tal como por ejemplo una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) crónica o lesión tisular debida a radiación (documento no de patente 1). Las enfermedades inflamatorias del intestino incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa; por ejemplo, en la enfermedad de Crohn, se produce fibrosis del intestino en aproximadamente del 25% al 30% de los pacientes. La fibrosis del intestino forma una constricción del intestino cuando ha avanzado, dificulta que alimentos pasen a su través y es una causa importante de alteración de la QOL (calidad de vida) de un sujeto enfermo. Sin embargo, el mecanismo de la fibrosis del intestino todavía no se ha aclarado y, debido a esto, actualmente no se ha establecido ninguna terapia definitiva.

20

25

El tratamiento convencional para la fibrosis del intestino se centra en el tratamiento de la inflamación causante; se usan diversos agentes antiinflamatorios, por ejemplo, un fármaco a base de ácido aminosalicílico tal como sulfasalazina, mesalamina, alsalazina o balsalazida, un fármaco corticosteroide tal como prednisolona o budesonida, un agente inmunosupresor tal como azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina o metotrexato, un inhibidor de TNF $\alpha$  tal como infliximab y, además, un antibiótico tal como metronidazol o Ciproxan. Sin embargo, estos agentes antiinflamatorios no tratan directamente la fibrosis, y en la fibrosis grave del intestino llega a hacerse necesario extirpar quirúrgicamente el tejido fibrótico, lo que supondrá una enorme carga para el paciente.

30

35

A la luz de tales circunstancias, en los últimos años se han realizado varios intentos para tratar directamente la fibrosis del intestino. Como resultado, se ha notificado que un medicamento tal como, por ejemplo, una vacuna de TGF $\beta$ 1 (documento no de patente 2), pentoxifilina o un metabolito de la misma (documento no de patente 3), un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (documento no de patente 4), un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (documento no de patente 5), daikenchuto (documento no de patente 6), pravastatina (documento no de patente 7), un análogo de lipoxina A<sub>4</sub> (documento de patente 1), o un inhibidor de la transferasa de grupos sulfato (documento de patente 2) ha mostrado un cierto grado de éxito en un modelo animal de fibrosis del intestino, etc. Sin embargo, ninguno de estos medicamentos es satisfactorio, y es necesario un desarrollo adicional de agentes para tratar la fibrosis del intestino.

40

Rieder y Fiocchi (es decir Journal of Crohn's and Colitis (2008) 2, 279-290) se refieren a una revisión de la fibrosis intestinal en la enfermedad inflamatoria del intestino. Este artículo de revisión explica en la página 282 que, a diferencia de la gran cantidad de datos sobre el papel de las células estrelladas en la fibrosis de hígado y pancreática, se dispone de una información muy limitada sobre las células estrelladas intestinales.

45

**[Lista de referencias]****[Bibliografía de patentes]**

50

[Documento de patente 1] WO 2008/022807

[Documento de patente 2] WO 2009/084232

[Documento de patente 3] WO 2006/068232

55

[Documento de patente 4] WO 2009/036368

[Documento de patente 5] WO 2010/014117

60

[Documento de patente 6] WO 2009/116257

[Documento de patente 7] WO 2010/026766

**[Bibliografía no de patentes]**

65

[Documento no de patente 1] Rieder y Fiocchi, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. Abril de 2009; 6 (4): 228-35

[Documento no de patente 2] Ma *et al.*, *Inflamm Bowel Dis.* Junio de 2010; 16 (6): 1040-50

[Documento no de patente 3] Peterson *et al.*, *Eur J Pharmacol.* 15 de julio de 2011; 662 (1-3): 47-54

5 [Documento no de patente 4] Videla *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther.* Febrero de 2006; 316 (2): 940-5

[Documento no de patente 5] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909991>

10 [Documento no de patente 6] Inoue *et al.*, *Biol Pharm Bull.* 2011; 34 (11): 1659-65

[Documento no de patente 7] Haydont *et al.*, *Clin Cancer Res.* 15 de septiembre de 2007; 13 (18 Pt 1): 5331-40

### [Sumario de la invención]

#### 15 [Problema técnico]

La presente invención se define, entre otras cosas, por los siguientes puntos:

20 1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la fibrosis del intestino, comprendiendo la composición un portador que comprende un retinoide que promueve la administración de la composición a células productoras de matriz extracelular en el intestino y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, en la que la fibrosis del intestino es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, y en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es ARNip de HSP47.

25 2. Una composición farmacéutica para su uso en la recuperación de tejido del intestino que se ha alterado por fibrosis al menos a un estado con un menor grado de fibrosis, comprendiendo la composición un portador que comprende un retinoide que promueve la administración de la composición a células productoras de matriz extracelular en el intestino y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, en la que la fibrosis es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, y en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es ARNip de HSP47.

35 3. La composición farmacéutica para su uso según el punto 1 ó 2, en la que el retinoide comprende retinol.

40 4. La composición farmacéutica para su uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que el portador comprende un retinoide y un componente de portador distinto del retinoide, siendo la razón molar del retinoide con respecto al componente de portador distinto del retinoide de 8:1 a 1:4.

45 5. La composición farmacéutica para su uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en la que está en una forma preparada en el momento de uso.

50 6. Un kit para preparar la composición farmacéutica según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, comprendiendo el kit uno o más recipientes que comprenden, o bien individualmente o bien en combinación, el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, el retinoide y, según sea necesario, un constituyente de portador distinto del retinoide, en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es ARNip de HSP47.

55 7. Un procedimiento para producir la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la fibrosis del intestino según uno cualquiera de los puntos 1 y 3 a 5 o una composición farmacéutica para su uso en la regeneración de tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino según uno cualquiera de los puntos 2 a 5, comprendiendo el procedimiento una etapa de formulación de un retinoide que promueve la administración de la composición a células productoras de matriz extracelular en el intestino, y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino como principio activo, en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es ARNip de HSP47.

60 Un objeto de la presente descripción es proporcionar un portador que pueda administrar una sustancia tal como un fármaco específicamente a células productoras de matriz extracelular en el intestino, y un agente de tratamiento de la fibrosis del intestino y un método para tratar la fibrosis del intestino utilizando dicho portador.

#### [Solución al problema]

65 Los presentes inventores han logrado aislar células productoras de matriz extracelular de tejido fibrótico del intestino durante una investigación sobre un agente novedoso para tratar la fibrosis del intestino y, además, han encontrado que un portador que incluye un retinoide como agente de direccionamiento administra un inhibidor de la producción

de matriz extracelular a dichas células con alta eficacia e inhibe notablemente la expresión de una molécula implicada en la producción de matriz extracelular.

5 Se conoce que un portador que incluye vitamina A puede administrar un fármaco a células estrelladas hepáticas (documento de patente 3, documento de patente 4) o una línea de células estrelladas hepáticas (documento de patente 3, documento de patente 5), o células productoras de matriz extracelular en el pulmón (documento de patente 6) y la médula ósea (documento de patente 7) y que una composición en la que se porta ARNip para HSP47 sobre el portador anterior puede mejorar la fibrosis hepática (documento de patente 3), la fibrosis pulmonar (documento de patente 6) y la mielofibrosis (documento de patente 7), pero hasta ahora se desconocía  
10 completamente cualquier relación con las células productoras de matriz extracelular en el intestino o la fibrosis del intestino.

Es decir, la presente descripción se refiere a lo siguiente.

15 (1) Un portador para administrar una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el intestino, comprendiendo el portador un retinoide como agente de direccionamiento para células productoras de matriz extracelular en el intestino.

20 (2) El portador según (1) anterior, en el que el retinoide incluye retinol.

(3) El portador según (1) ó (2) anterior, en el que incluye un retinoide y un componente de portador distinto del retinoide, siendo la razón molar del retinoide con respecto al componente de portador distinto del retinoide de 8:1 a 1:4.

25 (4) Una composición farmacéutica para tratar la fibrosis del intestino, comprendiendo la composición el portador según uno cualquiera de (1) a (3) anteriores y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino.

30 (5) Una composición farmacéutica para regenerar tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino, comprendiendo la composición el portador según uno cualquiera de (1) a (3) anterior y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino.

35 (6) La composición farmacéutica según (4) ó (5) anterior, en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino se selecciona del grupo que consiste en una sustancia para inhibir la producción y secreción de un componente de matriz extracelular, un inhibidor del crecimiento celular, una sustancia de inducción de apoptosis, un inhibidor de TIMP y un inhibidor de  $\alpha$ 1-antitripsina.

40 (7) La composición farmacéutica según (6) anterior, en la que la sustancia para inhibir la producción y secreción de un componente de matriz extracelular es un inhibidor de HSP47.

(8) La composición farmacéutica según uno cualquiera de (4) a (7) anteriores, en la que está en una forma preparada en el momento de uso.

45 (9) Un kit para preparar la composición farmacéutica según uno cualquiera de (4) a (8) anteriores, comprendiendo el kit uno o más recipientes que comprenden, o bien individualmente o bien en combinación, el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, el retinoide y, según sea necesario, un constituyente de portador distinto del retinoide.

50 (10) Un procedimiento para producir un portador para administrar una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el intestino, comprendiendo el procedimiento una etapa de formulación de un retinoide como agente de direccionamiento para células productoras de matriz extracelular en el intestino.

55 (11) Un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar la fibrosis del intestino o una composición farmacéutica para regenerar tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino, comprendiendo el procedimiento una etapa de formulación de un retinoide como agente de direccionamiento para células productoras de matriz extracelular en el intestino, y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino como principio activo.

60 (12) Una línea de células productoras de matriz extracelular del intestino, derivándose la línea celular de tejido intestinal fibrótico recogido de un sujeto que padece fibrosis del intestino y que tiene un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP.

(13) Un método para aislar células productoras de matriz extracelular del intestino, comprendiendo el método

65 (i) una etapa de obtención de células de tejido intestinal fibrótico recogido de un sujeto que padece fibrosis del intestino, y

(ii) una etapa de selección de células que tienen un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP a partir de las células obtenidas en (i) .

5 (14) Un método para preparar una línea de células productoras de matriz extracelular del intestino, comprendiendo el método

(i) una etapa de obtención de células de tejido intestinal fibrótico recogido de un sujeto que padece fibrosis del intestino, y

10 (ii) una etapa de selección de células que tienen un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP a partir de las células obtenidas en (i),

comprendiendo también el método una etapa de inmortalización de células posterior a la etapa (i) o (ii).

15 (15) Un método para examinar un factor para tratar la fibrosis del intestino, comprendiendo el método

(i) una etapa para hacer que la línea celular según (12) anterior coexista con un factor de prueba, y

20 (ii) una etapa de detección de un cambio en la línea celular debido a la coexistencia con el factor de prueba.

(16) Un kit para examinar un factor para tratar la fibrosis del intestino, comprendiendo el kit la línea celular según (12) anterior.

25 **[Efectos ventajosos de la invención]**

Aunque el modo de acción exacto de la composición para tratar la fibrosis del intestino de la presente descripción no se ha aclarado todavía completamente, se cree que el retinoide funciona como agente que selecciona como diana células productoras de matriz extracelular en el intestino, y administra un principio activo tal como por ejemplo un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino a tales células, mostrando de ese modo un efecto contra la fibrosis del intestino.

30 Por tanto, puesto que puede administrarse eficazmente un principio activo al sitio de acción y además, a células diana, mediante el uso del portador de la presente descripción que comprende un retinoide como agente de direccionamiento, se posibilitan la cura, la supresión del avance y la prevención de la aparición de la fibrosis del intestino, para la cual no hay ningún método terapéutico definitivo hasta la fecha, y el presente portador contribuye por tanto significativamente a la medicina humana y a la medicina veterinaria.

40 Además, el portador de la presente descripción puede combinarse con cualquier medicamento (por ejemplo, un fármaco terapéutico existente para la fibrosis del intestino) para aumentar su eficacia de acción; por tanto, también existe la ventaja de que existe una amplia variedad de aplicaciones en lo que se refiere a la formulación, permitiendo que se facilite la producción de agentes terapéuticos eficaces.

45 Además, la línea celular de la presente descripción puede utilizarse para examinar un fármaco para tratar la fibrosis del intestino o en la aclaración del mecanismo de la fibrosis del intestino, y contribuye al desarrollo de nuevos agentes de tratamiento o métodos de tratamiento para la fibrosis del intestino.

**[Breve descripción de los dibujos]**

50 La figura 1 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de células mesenquimatosas similares a células estrelladas en un sitio de fibrosis del intestino en un ratón SAMP1/Yit. Muestra una imagen de tinción de azán (a), e imágenes de tinción de inmunofluorescencia por medio de un anticuerpo anti-vimentina (b), un anticuerpo anti- $\alpha$ SMA (c), y un anticuerpo anti-GFAP (d). Las flechas muestran la ubicación de las células mesenquimatosas similares a células estrelladas. La barra de escala indica 100  $\mu$ m para (a) y 50  $\mu$ m para de (b) a (d).

55 La figura 2 es un diagrama fotográfico que muestra la expresión de vimentina y  $\alpha$ SMA en la línea de células mesenquimatosas IC10\_F2 aisladas de un sitio de fibrosis del intestino en un ratón SAMP1/Yit (parte superior) y la línea celular IC10\_F2\_E9 positiva para vimentina, negativa para  $\alpha$ SMA, negativa para GFAP derivada de ella (parte inferior). La barra de escala indica 50  $\mu$ m.

60 La figura 3 es un gráfico que muestra la expresión relativa de vimentina,  $\alpha$ SMA, ADRP, LRAT y LXR $\beta$  en células IC10\_F2 y células IC10\_F2\_E9.

65 La figura 4 es un gráfico que muestra la expresión relativa de HSP47 cuando se introdujo ARNip para HSP47 en células IC10\_F2\_E9 al ser portado por un liposoma acoplado a VA.

**[Descripción de realizaciones]**

5 Un aspecto de la presente descripción se refiere a un portador para administrar una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el intestino, comprendiendo el portador un retinoide como agente de direccionamiento para células productoras de matriz extracelular en el intestino. Una realización del portador de la presente descripción incluye una cantidad eficaz de un retinoide para seleccionar como diana células productoras de matriz extracelular en el intestino. Además, una realización del portador de la presente descripción se refiere a un portador dirigido a células productoras de matriz extracelular en el intestino por medio de un retinoide.

10 En la presente descripción, las células productoras de matriz extracelular en el intestino no están limitadas particularmente siembre que sean células que estén presentes en el intestino y tengan la capacidad de producir matriz extracelular; ejemplos de los mismos incluyen células similares a células estrelladas células, fibroblastos, pericitos, fibrocitos y miofibroblastos que están presentes en el intestino. Las células productoras de matriz que están presentes en el intestino pueden incluir, no sólo las derivadas de células que están presentes en el intestino, sino también las derivadas de fibrocitos en sangre circulante y las transformadas a partir de células epiteliales o células endoteliales mediante transdiferenciación endotelial-mesenquimatosas (documento no de patente 1).

20 Los ejemplos de las células similares a células estrelladas incluyen células que tienen un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA ( $\alpha$ -actina del músculo liso) y negativo para GFAP (proteína ácida fibrilar glial) que se han identificado en los ejemplos a continuación. Tales células se identifican mediante inmunotinción usando un anticuerpo anti-vimentina, un anticuerpo anti- $\alpha$ SMA y un anticuerpo anti-GFAP que se marcan de manera detectable. Las células pueden expresar un gen relacionado con el almacenamiento de VA (vitamina A), por ejemplo, ADRP (proteína relacionada con la diferenciación adiposa), LRAT (lecitina retinol acil transferasa) y/o LXR $\beta$  (receptor X hepático  $\beta$ ), etc. Las células estrelladas hepáticas se activan cuando se cultivan *in vitro* y se vuelven positivas para  $\alpha$ SMA y negativas para GFAP, pero las células similares a células estrelladas no se convierten en positivas para  $\alpha$ SMA y GFAP ni siquiera cuando se cultivan *in vitro*. Los miofibroblastos se caracterizan por expresar vimentina y  $\alpha$ SMA; los fibroblastos expresan vimentina característica de las células mesenquimatosas pero no expresan  $\alpha$ SMA, y pueden identificarse mediante tinción doble, etc. de vimentina y  $\alpha$ SMA. Las células productoras de matriz extracelular en el intestino también pueden obtenerse mediante la selección, a partir de células obtenidas de tejido del intestino, de aquellas que tienen un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP.

35 El retinoide de la presente descripción funciona como agente de direccionamiento para células productoras de matriz extracelular en el intestino, y promueve la administración específica de una sustancia a esas células. El mecanismo para promover la administración de sustancias por el retinoide todavía no se ha aclarado completamente; sin embargo, por ejemplo, se piensa que un retinoide que se ha unido específicamente a una proteína de unión a retinol (RBP) se capta por una célula productora de matriz extracelular en el intestino a través de un receptor determinado presente sobre la superficie de esta célula.

40 Un retinoide es un miembro de una clase de compuestos que tienen un esqueleto en el que cuatro unidades isoprenoides se unen de manera cabeza con cola (véase G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents", 2ª ed. Portland Press, págs. 247-251 (1992)). La vitamina A es un descriptor genérico para un retinoide que muestra cualitativamente la actividad biológica del retinol. El retinoide que puede usarse en la presente invención no está limitado particularmente, y los ejemplos incluyen retinol (incluyendo todo trans-retinol), retinal, ácido retinoico (incluyendo tretinoína), derivados de retinoide 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 la vitamina A, tales como fenretinida (4-HPR) y bexaroteno.

50 De estos, retinol, retinal, ácido retinoico, un éster de retinol y un ácido graso (tal como por ejemplo 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 por ejemplo, retinoato de etilo) son preferibles desde el punto de vista de la eficacia de administración específica de una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el intestino.

55 Todos los isómeros retinoides, incluyendo los isómeros cis-trans, están incluidos en el alcance de la presente descripción. El retinoide puede estar sustituido con uno o más sustituyentes. El retinoide en la presente descripción incluye un retinoide en forma aislada, así como en forma de una disolución o mezcla con un medio que puede disolver o retener el retinoide.

60 El retinoide en la presente descripción incluye un compuesto que contiene un retinoide como parte del mismo (compuesto que contiene un resto retinoide). Un compuesto de este tipo puede contener uno o más restos retinoides, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más restos. En tal compuesto, un retinoide puede estar presente en un estado en el que su sitio de unión a RBP (por ejemplo, un resto de anillo de ciclohexeno en el caso de retinol) puede unirse a un RBP. Los ejemplos de tal compuesto incluyen, pero no se limitan a, uno en el que están unidos uno o más retinoides y PEG o un derivado del mismo. En tal conjugado

65

retinoide-PEG, un sitio de no unión de RBP (por ejemplo, un resto distinto de un resto de anillo de ciclohexeno en el caso del retinol, por ejemplo, el grupo OH, etc.) de un retinoide puede unirse covalentemente a PEG o un derivado del mismo. El PEG o un derivado del mismo puede tener de 1 a 50 unidades de repetición (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O). El PEG o un derivado del mismo puede tener un peso molecular de 200 a 4000 g/mol. El PEG o un derivado del mismo puede ser lineal o ramificado. El derivado de PEG puede tener un grupo adecuado para unirse a un retinoide en un extremo terminal, por ejemplo, un grupo amino, etc. El derivado de PEG puede tener uno o más grupos amida en la cadena, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más grupos amida.

El portador de la presente descripción puede constituirse a partir del retinoide por sí mismo o puede constituirse por la unión del retinoide a un constituyente de portador distinto del retinoide, o encerrándolo en el mismo. Por tanto, el portador de la presente descripción puede incluir un constituyente de portador distinto del retinoide. Un componente de este tipo no está limitado particularmente, y puede usarse cualquier componente conocido en los campos médico y farmacéutico, pero son preferibles los que pueden encerrar el retinoide o pueden unirse al retinoide.

Los ejemplos de tales componentes incluyen un lípido, por ejemplo, un fosfolípido tal como 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 o una lecitina como lecitina de yema de huevo y un polímero, pero los ejemplos no se limitan a los mismos. Entre ellos, son preferibles los que pueden formar un liposoma, por ejemplo, un fosfolípido natural tal como lecitina, un fosfolípido semisintético tal como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilauroilfosfatidilcolina (DLPC), colesterol, etc.

Un componente particularmente preferido es un componente que puede evitar la captura por el sistema reticuloendotelial, incluyendo los ejemplos del mismo 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-(esperminacarboxamido)etil]-*N,N*-dimetil-1-propanamino (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).

El portador en la presente descripción puede tener una estructura tridimensional específica. Una estructura de este tipo no está limitada, y ejemplos de la misma incluyen una estructura lineal de cadena lineal o ramificada, una estructura de película y una estructura esférica. Por lo tanto, el portador puede tener, sin limitación, cualquier forma tridimensional, tal como un dendrímero, una dendrita, una micela, un liposoma, una emulsión, una microesfera o una nanoesfera. Además, una realización del portador en la presente descripción es un portador que permite el direccionamiento activo por medio de un agente de direccionamiento (incluyendo una molécula de direccionamiento, un resto de direccionamiento, etc.). En el presente campo técnico se conoce bien un portador que tiene una configuración tridimensional o un portador que permite el direccionamiento activo (véase, por ejemplo, Marcucci y Lefoulon, Drug Discov Today. 1 de marzo de 2004; 9 (5): 219-28, Torchilin, Eur J Pharm Sci. Octubre de 2000; 11 Supl. 2: S81-91, etc.)

La unión del retinoide al portador de la presente descripción o poder encerrarlo en el mismo también se posibilita uniéndolo a o encerrándolo en un constituyente de portador distinto del retinoide mediante un método químico y/o físico. Alternativamente, el retinoide puede unirse a o encerrarse en el portador de la presente descripción mezclando el retinoide y el constituyente de portador distinto del retinoide durante la preparación del portador. La cantidad del retinoide en el portador de la presente descripción puede ser por ejemplo de 0,01 a 1000 nmol/ $\mu$ l, preferiblemente de 0,1 a 100 nmol/ $\mu$ l. Además, en el portador de la presente descripción que contiene un retinoide y un constituyente de portador distinto de un retinoide, la razón molar del retinoide con respecto al constituyente de portador distinto del retinoide no está limitada y puede ser por ejemplo de 8:1 a 1:4, o de 4:1 a 1:2. El retinoide puede unirse o encerrarse en el portador antes de cargar una sustancia que va a administrarse al portador; o el portador, el retinoide y una sustancia que va a administrarse pueden mezclarse simultáneamente; o el retinoide puede mezclarse con el portador que ya porta la sustancia que va a administrarse, etc. Por tanto, la presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir una formulación específica para células productoras de matriz extracelular en el intestino, comprendiendo el procedimiento una etapa de unión de un retinoide a cualquier portador acoplado a fármaco existente o portador de encapsulación de fármaco, por ejemplo, una formulación liposómica tal como DaunoXome®, Doxil, Caelyx® o Myocet®.

El portador de la presente descripción puede estar en cualquier forma siempre que una sustancia u objeto deseado pueda transportarse a células productoras de matriz extracelular diana en el intestino, y los ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan a, un polímero, un dendrímero, una dendrita, una micela macromolecular, un liposoma, una emulsión, microesferas y nanoesferas. En la presente descripción, entre ellos, es preferible una forma liposómica desde el punto de vista de la alta eficacia de administración, la amplia selección de sustancias que van a administrarse y la facilidad de formulación, etc., y un liposoma catiónico que contiene un lípido catiónico es particularmente preferible. En el caso de que el portador esté en forma de un liposoma, la razón molar del retinoide con respecto a otros lípidos constituyentes del liposoma es preferiblemente de 8:1 a 1:4, y más preferiblemente de

4:1 a 1:2, desde el punto de vista de la eficacia de unión del retinoide al portador o de que pueda encerrarlo en el mismo.

5 El portador de la presente descripción puede contener en su interior una sustancia que va a transportarse, puede unirse al exterior de una sustancia que va a transportarse, o puede mezclarse con una sustancia que va a transportarse, siempre que contenga un retinoide en una forma tal que el retinoide pueda funcionar como un agente de direccionamiento. "Funcionar como agente de direccionamiento" en el presente documento significa que el portador que incluye un retinoide alcanza y/o se capta por las células diana, es decir, las células productoras de matriz extracelular en el intestino, más rápidamente y/o en mayor cantidad que con un portador que no comprende el retinoide, y esto puede confirmarse fácilmente, por ejemplo, añadiendo un portador marcado o que contiene un marcador a un cultivo de células diana y analizando la distribución del marcador tras un periodo de tiempo predeterminado. Estructuralmente, este requisito puede cumplirse, por ejemplo, si un retinoide se expone al menos parcialmente hacia el exterior del portador (por ejemplo, cuando el portador tiene una estructura tridimensional, etc.) o la formulación que contiene el portador, como muy tarde en el momento en que alcanza las celdas diana. La "formulación" a la que se hace referencia en este caso es un concepto que incluye la composición de la presente invención, que se describe más adelante, y que además tiene una forma. Puede evaluarse si el retinoide está expuesto o no en el exterior de una formulación poniendo en contacto la formulación con una sustancia que se une específicamente a un retinoide, tal como por ejemplo una proteína de unión a retinol (RBP), y examinando su unión a la formulación.

20 La exposición de un retinoide, al menos parcialmente, al exterior del portador o la formulación como muy tarde en el momento en que alcanza las células diana, puede lograrse, por ejemplo, ajustando la razón de composición del retinoide y los constituyentes de portador distintos del retinoide. Además, cuando el portador tiene la forma de una estructura lipídica, tal como un liposoma, cuando por ejemplo se forma un complejo a partir de un retinoide y un constituyente de portador distinto del retinoide, puede usarse un método en el que en primer lugar, una estructura lipídica formada a partir del constituyente de portador distinto del retinoide se diluye en una disolución acuosa y entonces se pone esta en contacto y se mezcla, etc. con el retinoide. 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 lipídica a la que se hace referencia en este caso significa una estructura que contiene un lípido como constituyente y que tiene cualquier estructura tridimensional, por ejemplo, una forma tal como una forma lineal, una forma de película o una forma esférica, y los ejemplos de la misma incluyen, pero no se limitan a, un liposoma, una micela, una microesfera lipídica, una nanoesfera lipídica y una emulsión lipídica. La capacidad de aplicar a otro portador de fármaco el mismo agente de direccionamiento que uno dirigido a un liposoma 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, etc.

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

50 La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir un portador para administrar una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el intestino, comprendiendo el procedimiento una etapa de formulación de un retinoide como agente de direccionamiento para células productoras de matriz extracelular en el intestino. El método de formulación del retinoide no está limitado particularmente siempre que, en el portador en que se formula, el retinoide pueda funcionar como agente de direccionamiento hacia células productoras de matriz extracelular en el intestino, y por ejemplo pueden usarse diversos métodos descritos en el presente documento. Por tanto, la formulación del retinoide puede llevarse a cabo uniendo el retinoide a o encerrándolo en otro constituyente del portador mediante un método químico y/o físico o mezclando el retinoide con otro constituyente de portador cuando se prepara el portador. La cantidad de retinoide de la formulación, etc., es tal como se describió anteriormente con respecto al portador de la presente descripción.

60 La sustancia que va a administrarse mediante el presente portador descrito en el presente documento no está limitada particularmente, y preferiblemente tiene 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 de la presente descripción 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 viral, una célula, un sistema de liberación de fármacos que incluye uno o más elementos, o una micromáquina. La sustancia que va a administrarse tiene preferiblemente la propiedad de ejercer algún efecto sobre las células diana, y los ejemplos incluyen las que marcan las células diana o controlan (por ejemplo, aumentan o

suprimen) la actividad o el crecimiento de las células diana.

Por tanto, en un caso de la presente descripción, la sustancia que va a administrarse por el portador incluye “un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino”.

La actividad de las células productoras de matriz extracelular en el intestino en el presente documento se refiere a diversas actividades tales como secreción, captación o migración mostrada por las células productoras de matriz extracelular en el intestino, y en la presente descripción, en particular, entre ellas, significa normalmente una actividad implicada en la aparición, el avance y/o la recaída de la fibrosis del intestino. Ejemplos de una actividad de este tipo incluyen, pero no se limitan a, la producción/secreción 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 la matriz extracelular.

Por tanto, el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino al que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquier fármaco que inhiba directa o indirectamente la acción física, química y/o fisiológica, etc. de estas células implicadas en la aparición, el avance y/o la recaída de la fibrosis del intestino; ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una sustancia para inhibir la producción y secreción de componentes de matriz extracelular, etc., un inhibidor del crecimiento celular, una sustancia de inducción de apoptosis, un inhibidor de TIMP (inhibidor tisular de metaloproteínasa) y un inhibidor de  $\alpha$ 1-antitripsina.

Los ejemplos de la sustancia para inhibir la producción y secreción de un componente de matriz extracelular, etc. incluyen, pero no se limitan a, una sustancia tal como una molécula de iARN, ribozima o ácido nucleico antisentido, o una sustancia que tiene un efecto negativo dominante tal como un mutante negativo dominante, que inhibe la expresión de un componente de matriz extracelular tal como colágeno, proteoglicano, tenascina, fibronectina, trombospondina, osteopontina, osteonectina o elastina, un vector que expresa la misma, y células transformadas de ese modo. Entre los componentes de matriz extracelular, los fármacos para inhibir la producción y secreción de colágeno incluyen, pero no se limitan a, inhibidores para HSP (proteína de choque térmico) 47, que es una chaperona molecular específica de colágeno esencial para el transporte intracelular y la maduración molecular, que son comunes a los procesos de síntesis de diversos tipos de colágeno, por ejemplo, un inhibidor de la expresión de HSP47, tal como una molécula de iARN, ribozima o ácido nucleico antisentido para HSP47, una sustancia que tiene un efecto negativo dominante, tal como un mutante negativo dominante de HSP47, un vector que expresa la misma, y las células transformadas de ese modo.

Los ejemplos del inhibidor del crecimiento celular incluyen, entre otros, un agente alquilante tal como ifosfamida, nimustina (por ejemplo, clorhidrato de nimustina), ciclofosfamida, dacarbazina, melfalán o ranimustina, un antagonista del metabolismo tal como gemcitabina (por ejemplo, clorhidrato de gemcitabina), enocitabina, octofosfato de citarabina, una preparación de citarabina, tegafur/uracilo, un fármaco de combinación de tegafur/gimeracilo/oteracilo potásico (por ejemplo, TS-1), doxifluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato o mercaptopurina, un antibiótico antitumoral tal como idarubicina (por ejemplo, clorhidrato de idarubicina), epirubicina (por ejemplo, clorhidrato de epirubicina), daunorrubicina (por ejemplo, clorhidrato de daunorrubicina, citrato de daunorrubicina), doxorubicina (por ejemplo, clorhidrato de doxorubicina), pirarubicina (por ejemplo, clorhidrato de pirarubicina), bleomicina (por ejemplo, clorhidrato de bleomicina), peplomícina (por ejemplo, sulfato de peplomícina), mitoxantrona (por ejemplo, clorhidrato de mitoxantrona), o mitomicina C, un alcaloide tal como etopósido, irinotecán (por ejemplo, clorhidrato de irinotecán), vinorelbina (por ejemplo, tartrato de vinorelbina), docetaxel (por ejemplo, hidrato de docetaxel), paclitaxel, vincristina (por ejemplo, sulfato de vincristina), vindesina (por ejemplo, sulfato de vindesina) o vinblastina (por ejemplo, sulfato de vinblastina), un fármaco de terapia hormonal tal como anastrozol, tamoxifeno (por ejemplo, citrato de tamoxifeno), toremifeno (por ejemplo, citrato de toremifeno), bicalutamida, flutamida o estramustina (por ejemplo, fosfato de estramustina), un complejo de platino tal como carboplatino, cisplatino (CDDP) o nedaplatino, un inhibidor de la angiogénesis como talidomida, neovastat o bevacizumab y L-asparaginasa.

Los ejemplos de la sustancia de inducción de apoptosis incluyen, pero no se limitan a, compuesto 861, gliotoxina y atorvastatina.

Los ejemplos del inhibidor de TIMP (por ejemplo TIMP1, TIMP2, TIMP3, etc.) incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor de la actividad de TIMP tal como un anticuerpo para un TIMP, un inhibidor de la producción de TIMP tal como una molécula de iARN, ribozima o ácido nucleico antisentido para un TIMP, un vector que expresa el mismo, y células transformadas de ese modo.

Los ejemplos del inhibidor de  $\alpha$ 1-antitripsina incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor de la actividad de  $\alpha$ 1-antitripsina tal como un anticuerpo para  $\alpha$ 1-antitripsina, un inhibidor de la producción de  $\alpha$ 1-antitripsina tal como una molécula de iARN, ribozima, o ácido nucleico antisentido para  $\alpha$ 1-antitripsina, un vector que expresa el mismo, y células transformadas de ese modo.

Además, el “fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino” en la presente invención puede ser cualquier fármaco que promueva directa o indirectamente la acción física, química y/o fisiológica, etc., de células productoras de matriz extracelular en el intestino implicadas directa o

indirectamente en la inhibición de la aparición, el avance y/o la recaída de la fibrosis del intestino.

El portador de la presente descripción puede administrar uno o más tipos de los fármacos mencionados anteriormente

5 La molécula de iARN en la presente descripción incluye ARN dúplex tales como ARNip (ARN de interferencia pequeño), miARN (micro ARN), ARNhc (ARN de horquilla corta), ARNpi (ARN de interacción con Piwi) y ARNipar (ARNip asociado a repeticiones) y formas modificadas de los mismos. Una molécula de iARN y un vector que expresa la molécula de iARN pueden usarse, por ejemplo, según las enseñanzas de un texto convencional (por ejemplo, Experimental Medicine Special Edition, Revised RNAi Experimental Protocol 2004, Yodosha, iARN Experimental Frequently Asked Questions 2006, Yodosha, etc.).

15 El diseño de la molécula de iARN puede llevarse a cabo de manera apropiada por un experto en la técnica según las enseñanzas de un texto convencional (Experimental Medicine Special Edition, Revised RNAi Experimental Protocol 2004, Yodosha, RNAi Experimental Frequently Asked Questions 2006, Yodosha) haciendo referencia a una secuencia de ARN mensajero de un gen diana y una secuencia molecular de iARN conocida.

El ácido nucleico en la presente descripción incluye ARN, ADN, APN, o un complejo de los mismos.

20 La sustancia que va a administrar el portador de la presente descripción también incluye, pero no se limita a, un fármaco, distinto de los descritos anteriormente, para inhibir la aparición, el avance y/o la recaída de la fibrosis del intestino, y los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor de TGF $\beta$ 1 (incluyendo una vacuna de TGF $\beta$ 1), pentoxifilina y un metabolito de la misma, un inhibidor de fosfodiesterasa 4, un inhibidor de reductasa HMG-CoA, daikenchuto, pravastatina, un análogo de lipoxina A<sub>4</sub>, un inhibidor de transferasa de grupos sulfato, un inhibidor de un factor que promueve la fibrosis (por ejemplo, EGF, bFGF, FGF2, PDGF, IGF-I, IGF-II, CTGF, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ , ligando de NOD1, ligandos de TLR2, 4 y 5, galectina 3, hialuronano, laminina, colágeno, etc.), un fármaco para inhibir la inflamación que produce la aparición de fibrosis del intestino tal como por ejemplo un fármaco a base de ácido aminosalicílico tal como sulfasalazina, mesalamina, alsalazina o balsalazida, un fármaco corticosteroide tal como prednisolona o budesonida, un agente inmunosupresor tal como azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina o metotrexato, un inhibidor de TNF $\alpha$  tal como infliximab y, además, un antibiótico tal como metronidazol o Ciproxan. Estos fármacos pueden usarse en combinación con la composición de la presente descripción, que se describirá más adelante. En el presente documento, "que se usa en combinación" incluye la administración de la composición de la presente descripción y el fármaco sustancialmente al mismo tiempo y la administración de ellos con un intervalo de tiempo dentro del mismo período de tratamiento. En el primer caso, la composición de la presente descripción puede mezclarse con el fármaco y administrarse o pueden administrarse sucesivamente sin mezclarse. En el segundo caso, la composición de la presente descripción puede administrarse antes o después del fármaco.

40 El fármaco que pertenece a la invención para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es un inhibidor de HSP47, concretamente, un ARNip para HSP47.

45 La sustancia u objeto administrado por el portador de la presente descripción puede estar o no marcado. El marcaje permite monitorizar el éxito o el fracaso de la administración a las células diana, o el aumento y la disminución de las células diana, etc., y es particularmente útil, no sólo a nivel de pruebas/investigación, sino también a nivel clínico. Puede seleccionarse una etiqueta de cualquier etiqueta conocida por un experto en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier radioisótopo, material magnético, gas o sustancia que genere un gas en condiciones fisiológicas, un elemento que muestre resonancia magnética nuclear (por ejemplo, hidrógeno, fósforo, sodio, flúor, etc.), una sustancia que afecte al tiempo de relajación de un elemento que muestra resonancia magnética nuclear (por ejemplo, un átomo de metal o un compuesto que contiene el mismo), una sustancia que se une a una sustancia marcada (por ejemplo, un anticuerpo, etc.), una sustancia fluorescente, un fluoróforo, una sustancia quimioluminiscente, biotina o derivado de la misma, avidina o derivado de la misma, una enzima, etc. El marcador puede unirse a un constituyente de portador o puede portarse en un portador como una sustancia independiente que va a administrarse.

55 En la presente descripción, "para células productoras de matriz extracelular en el intestino" o para administrar a células productoras de matriz extracelular en el intestino" significa que es adecuado para su uso para células productoras de matriz extracelular en el intestino como células diana, y esto incluye, por ejemplo, que es posible administrar una sustancia a estas células de manera más rápida, eficaz y/o en mayor cantidad que a otras células, por ejemplo, células normales. Por ejemplo, el portador de la presente descripción puede administrar una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el intestino a 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 en comparación con otras células.

65 La presente descripción también se refiere a una composición para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, para tratar la fibrosis del intestino, o para regenerar tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino, comprendiendo la composición el portador mencionado anteriormente y el fármaco mencionado anteriormente para controlar la actividad o el crecimiento de las células

productoras de matriz extracelular en el intestino, y la presente descripción también se refiere al uso del portador en la producción de dicha composición. Una realización de la composición de la presente invención contiene una cantidad eficaz de retinoide para hacer que seleccionen como diana células productoras de matriz extracelular en el intestino. Además, una realización de la composición de la presente invención se realiza para seleccionar como

5 diana células productoras de matriz extracelular en el intestino por medio de un retinoide.

La fibrosis del intestino en la presente descripción significa un estado patológico caracterizado por una deposición excesiva de tejido cicatricial en la pared del intestino e incluye inflamación crónica del intestino, tal como por ejemplo enfermedad inflamatoria del intestino crónica (una enfermedad inflamatoria del intestino específica cuya causa está

10 identificada, tal como enteritis inducida por fármacos o enteritis infecciosa, y una enfermedad inflamatoria del intestino inespecífica cuya causa se desconoce, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), y una tras lesión tisular debida a radiación, adhesión del intestino asociada con cirugía o traumatismo, etc.

En la presente descripción, "regenerar tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino" significa recuperar tejido del intestino que se ha alterado por fibrosis al menos a un estado con un menor grado de fibrosis. Es decir, el tejido del intestino se reemplaza por tejido fibroso principalmente de la matriz extracelular a medida que avanza la fibrosis del intestino, y la inversión de esta tendencia y el reemplazo del tejido fibroso aumentado con el tejido normal original es la regeneración de tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino en la presente descripción. Por tanto, la regeneración de tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino

20 en la presente descripción incluye no solo la recuperación completa de tejido fibrótico del intestino al estado original, sino también la recuperación parcial del tejido fibrótico del intestino al estado original. El grado de regeneración del tejido normal del intestino puede evaluarse basándose en la normalización de la estructura tisular, la reducción de la región ocupada por tejido fibroso, el aumento de la región ocupada por tejido normal, etc. mediante examen histológico de una muestra de biopsia, etc. o puede evaluarse por la mejora de un indicador bioquímico, etc. cuando se ha observado una anomalía debido a la formación de fibrillas en el indicador bioquímico, etc., antes del

25 tratamiento con la presente composición.

En la composición de la presente invención, siempre que el retinoide contenido en el portador esté presente en un modo de manera que funcione como agente de direccionamiento, el portador puede contener en su interior una

30 sustancia que va a administrarse, puede unirse al exterior de una sustancia que va a administrarse, o puede mezclarse con una sustancia que va a administrarse. Por tanto, dependiendo de la vía de administración y de la manera en que se libera el fármaco, etc., la composición puede recubrirse con un material apropiado tal como, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material que se disgrega con el tiempo, o puede incorporarse en un sistema de liberación de fármacos apropiado. Además, la composición de la presente invención puede estar en forma de un

35 complejo de una sustancia que va a administrarse y un liposoma acoplado a retinoide, es decir, un lipoplejo. Además, cuando el portador está constituido sólo por un retinoide, la composición de la presente invención puede estar en forma de un complejo del retinoide y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino.

La composición de la presente invención puede usarse como medicamento (es decir, una composición farmacéutica) y puede administrarse a través de diversas vías, incluyendo vías tanto orales como parenterales; los ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, vías orales, intravenosas, intramusculares, subcutáneas, locales, intrapulmonares, intra-vías respiratorias, intratraqueales, intrabronquiales, transnasales, gástricas, enterales, intrarrectales, intraarteriales, intraportales, intraventriculares, intramedulares, intra-ganglios linfáticos, intralinfáticas,

45 intracerebrales, intratecales, intracerebroventriculares, transmucosas, percutáneas, intranasales, intraperitoneales e intrauterinas, y puede formularse en una forma de dosificación adecuada para cada vía de administración. Tal forma de dosificación y un método de formulación pueden seleccionarse según sea apropiado de cualquier forma de dosificación y método conocidos (véase por ejemplo, Hyojun Yakuzaijaku (Standard Pharmaceutics), Ed. de Yoshiteru Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003).

50

Los ejemplos de formas de dosificación adecuadas para 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 adecuadas para administración parenteral incluyen inyecciones tales como disolución inyectable, una suspensión inyectable, una emulsión inyectable y una inyección que va a prepararse en el momento de uso. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en una forma tal como una disolución o suspensión estéril isotónica acuosa o no acuosa.

55

La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar la fibrosis del intestino o una composición para regenerar tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino, comprendiendo el procedimiento una etapa de formulación de un retinoide como agente de direccionamiento para células productoras de matriz extracelular en el intestino y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino como principio activo. El método para formular el retinoide no está limitado particularmente siempre que el retinoide pueda funcionar como agente de direccionamiento para células productoras de matriz extracelular en la composición en que se formula, y por ejemplo pueden usarse diversos métodos descritos en el presente documento. Además, el método para formular el principio activo no está limitado particularmente siempre que el principio activo pueda mostrar un

60

65

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, cuando la composición contiene un constituyente de portador distinto del retinoide, la formulación del principio activo puede llevarse a cabo tal como mezclando el principio activo con un portador en que ya se ha formulado el retinoide como agente de direccionamiento, puede llevarse a cabo tal como mezclando el retinoide, un constituyente de portador distinto del retinoide y el principio activo al mismo tiempo, o puede llevarse a cabo tal como formulando el principio activo con un constituyente de portador distinto del retinoide y luego mezclando esto con el retinoide.

La cantidad de formulación de retinoide, etc. es tal como se describió anteriormente con respecto al portador de la presente descripción. Además, la cantidad de formulación de principio activo es una cantidad que, cuando se administra como la composición, puede suprimir la aparición o recaída de la fibrosis del intestino, mejorar el estado clínico, aliviar sus síntomas, o retrasar o detener su avance, preferiblemente puede ser una cantidad que puede impedir la aparición o recaída de la fibrosis del intestino o curarla, o puede ser una cantidad que puede regenerar tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino. También es preferiblemente una cantidad que no produce un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Tal cantidad puede conocerse o puede determinarse de manera apropiada mediante una prueba *in vitro* usando células en cultivo o mediante una prueba en un animal modelo tal como un ratón, rata, perro o cerdo, y tales métodos de prueba los conoce bien un experto en la técnica. Los ejemplos de animales modelo con fibrosis del intestino incluyen los descritos en Pizarro *et al.* Trends Mol Med. Mayo de 2003; 9 (5): 218-22 (por ejemplo modelo inducido por TNBS, modelo inducido por DSS, modelo inducido por oxazolona, modelo de transferencia de SCID CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>, ratón quimera de médula ósea tgε26, ratón deficiente en IL-10, modelo de TNF<sup>ΔARE</sup>, ratón C3H-HeJBir, ratón SAMP1/Yit, ratón SAMP1/YitFc, etc.). Entre ellos, el ratón SAMP1/Yit es útil como ratón modelo para la fibrosis del intestino en la enfermedad de Crohn humana. La cantidad de formulación de principio activo puede variar según la forma de administración de la composición. Por ejemplo, cuando se usa una pluralidad de unidades de la composición en una administración, la cantidad de formulación de principio activo en una unidad de la composición puede ser la obtenida dividiendo la cantidad de principio activo requerida para una administración entre el número de unidades. Tal ajuste de la cantidad de formulación puede llevarse a cabo de manera apropiada por un experto en la técnica.

El portador o la composición de la presente invención puede proporcionarse de cualquier forma, pero desde el punto de vista de la estabilidad de almacenamiento, puede proporcionarse preferiblemente en una forma que pueda prepararse en el momento de uso, por ejemplo en una forma de manera que pueda prepararse en un lugar de tratamiento médico o en las proximidades del mismo por un médico y/o farmacéutico, enfermero u otro personal paramédico, etc. En este caso, el portador o la composición de la presente invención se proporciona como uno o más recipientes que contienen al menos un componente esencial para el mismo, y se prepara antes de su uso, por ejemplo, en el plazo de 24 horas antes de su uso, preferiblemente en el plazo de 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, equipos de preparación, etc., que están disponibles normalmente en el lugar de preparación, según sea apropiado.

Por consiguiente, la presente descripción también se refiere a un kit para preparar el portador o la composición, comprendiendo el kit uno o más recipientes que contienen, individualmente o en combinación, un retinoide y/o una sustancia que va a administrarse, y/o un constituyente de portador distinto del retinoide, así como un componente que es necesario para el portador o la composición, proporcionados en la forma de un kit de este tipo. El kit de la presente descripción puede contener, además de lo anterior, instrucciones tales como por ejemplo una explicación por escrito o un medio de grabación electrónico tal como un CD o DVD con respecto a los métodos para preparar o administrar el portador y la composición de la presente descripción, etc. Además, el kit de la presente descripción puede contener todos los componentes para completar el portador o la composición de la presente descripción, pero no es necesario que contenga todos los componentes. Por consiguiente, no es necesario que el kit de la presente descripción contenga un reactivo o disolvente que normalmente esté 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 descripción se refiere además al control de la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, para tratar la fibrosis del intestino, o para regenerar tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición anterior a un sujeto que lo necesita. En este caso, la cantidad eficaz por ejemplo en un método para tratar la fibrosis del intestino es una cantidad que suprime la aparición o recaída de la fibrosis del intestino, mejora el estado clínico, alivia sus síntomas o retrasa o detiene su avance, y puede ser preferiblemente una cantidad que impide la aparición o recaída de la fibrosis del intestino o lo cura, o puede ser una cantidad que puede regenerar tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino. También es preferiblemente una cantidad que no produce un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Tal cantidad puede determinarse de manera apropiada mediante una prueba *in vitro* usando células en cultivo o mediante una prueba en un animal modelo tal como un ratón, rata, perro o cerdo, y tales métodos de prueba los conoce bien un experto en la técnica. Además, un experto en la técnica conoce la dosis del retinoide contenido en el portador y la dosis del fármaco usado en el método de la presente descripción, o esta puede determinarse de manera apropiada mediante la prueba mencionada anteriormente, etc. Un animal

modelo para fibrosis del intestino es tal como se describió anteriormente.

La dosis específica de la composición administrada en el uso terapéutico de la presente descripción puede determinarse teniendo en cuenta diversos estados con respecto al sujeto que necesita tratamiento, tal como la gravedad de los síntomas, el estado de salud general del sujeto, la edad, el peso corporal y el sexo del sujeto, la dieta, la vía de administración, el momento y la frecuencia de administración, la medicación concurrente, la capacidad de respuesta al tratamiento, el cumplimiento del tratamiento, etc.

La vía de administración incluye diversas vías incluyendo vías tanto orales como y parenterales tales como, por ejemplo, vías orales, intravenosas, intramusculares, subcutáneas, locales, intrapulmonares, intra-vías respiratorias, intratraqueales, intrabronquiales, transnasales, gástricas, enterales, intrarrectales, intraarteriales, intraportales, intraventriculares, intramedulares, intra-ganglios linfáticos, intralinfáticas, intracerebrales, intratecales, intracerebroventriculares, transmucosas, percutáneas, intranasales, intraperitoneales e intrauterinas.

La frecuencia de administración varía dependiendo de las propiedades de la composición que va a usarse y de los estados del sujeto mencionados anteriormente, y puede ser, por ejemplo, una pluralidad de veces al día (más específicamente, 2, 3, 4, 5 o más veces per día), una vez al día, cada pocos días (más específicamente, cada 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días, etc.), algunas 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 la presente invención, el término "sujeto" significa cualquier individuo vivo, preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero, y aún más preferiblemente un individuo humano. En la presente descripción, el sujeto puede estar sano o aquejado de alguna enfermedad, y cuando se desea tratamiento de la fibrosis del intestino, normalmente significa un sujeto aquejado de fibrosis del intestino o en riesgo de estar aquejado por ella. Cuando se desea prevención de la fibrosis del intestino, por ejemplo, los ejemplos típicos incluyen, pero no se limitan a, un sujeto aquejado de una enfermedad que produce fibrosis del intestino tal como una enfermedad inflamatoria del intestino o adhesión del intestino asociada con cirugía o traumatismo, etc.

Además, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervenciones profilácticas y/o terapéuticas medicamente aceptables con la finalidad de la cura, remisión temporal o prevención de una enfermedad. Por ejemplo, el término "tratamiento" incluye la intervención médicamente aceptable para diversos fines, incluyendo el retraso o la detención del avance de la fibrosis del intestino, la regresión o desaparición de una lesión, y la prevención de la aparición y la prevención de recaída de la fibrosis del intestino.

La presente descripción también se refiere a un método que utiliza el portador anterior para administrar una sustancia a células productoras de matriz extracelular en el intestino. Este método incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una etapa de cargar una sustancia que va a administrarse en el portador, y una etapa de administrar o añadir el portador que porta la sustancia que va a administrarse a un organismo o un medio, por ejemplo un medio de cultivo, que contiene células productoras de matriz extracelular del intestino. Estas etapas pueden lograrse de manera apropiada según cualquier método conocido o un método descrito en el presente documento. El método de administración puede combinarse con otro método de administración, por ejemplo, otro método de administración para seleccionar como diana el intestino. Además, el método incluye una realización realizada *in vitro* y una realización en la que se seleccionan como diana las células productoras de matriz extracelular del intestino dentro del organismo. La sustancia que puede transportarse por el portador de la presente descripción es tal como se describió anteriormente.

La presente descripción también se refiere a una línea de células productoras de matriz extracelular del intestino que tiene un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP, derivadas de tejido intestinal fibrótico recogido de un sujeto que padece fibrosis del intestino.

Los ejemplos del sujeto que padece fibrosis del intestino incluyen, pero no se limitan a, un sujeto al que se ha diagnosticado fibrosis del intestino y un animal modelo con fibrosis del intestino. El diagnóstico de fibrosis del intestino se lleva a cabo basándose en la historia clínica, la confirmación de constricción del intestino por medio de obtención de imágenes con bario, etc., examen histopatológico de una muestra de biopsia, etc. La recogida del tejido intestinal fibrótico puede llevarse a cabo mediante cualquier método posible tal como cirugía o biopsia usando un endoscopio, etc. Un fenotipo puede determinarse mediante, por ejemplo, inmunotinción por medio de un anticuerpo anti-vimentina, un anticuerpo anti- $\alpha$ SMA y un anticuerpo anti-GFAP, análisis de la expresión de genes de vimentina,  $\alpha$ SMA y GFAP, etc., pero sin limitarse a los mismos. Los anticuerpos pueden ser productos comerciales o pueden prepararse de nuevo mediante un método conocido tal como inmunización de un animal con cada proteína. La línea celular puede expresar HSP47 o un homólogo de la misma (por ejemplo gp46), colágeno, o un gen relacionado con el almacenamiento de VA tal como por ejemplo ADRP, LRAT y/o LXR $\beta$ . La línea celular no se convierte en positiva para  $\alpha$ SMA y GFAP cuando se cultiva *in vitro*. La línea celular también puede inmortalizarse mediante transfección de un gen de inmortalización (por ejemplo SV40T, gen de telomerasa, etc.).

La línea celular puede cultivarse en condiciones de cultivo convencionales para células mesenquimatosas. Los

ejemplos de tales condiciones incluyen, pero no se limitan a, cultivar con DMEM que contiene FBS al 10% y el 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

5 La presente descripción también se refiere a un método para aislar células productoras de matriz extracelular en el intestino, comprendiendo el método

(i) una etapa de obtención de células de tejido intestinal fibrótico recogido de un sujeto que padece fibrosis del intestino, y

10 (ii) una etapa de selección de células que tienen un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP a partir de las células obtenidas en (i).

15 La adquisición de células de tejido intestinal fibrótico puede llevarse a cabo, por ejemplo, cultivando tejido que opcionalmente se corta finamente y obteniendo células que migran desde el mismo o tratando el tejido con una enzima de degradación de proteínas (por ejemplo colagenasa, proteasa, etc.) y obteniendo células separadas del mismo, pero sin limitarse a esto.

20 La selección de células puede llevarse a cabo, por ejemplo, separando las células en células individuales mediante un método de dilución limitante, etc. y determinando el fenotipo de cada clon mediante inmunotinción, análisis de la expresión génica, etc., o sometiendo una suspensión de células individuales marcadas con un anticuerpo anti-vimentina, un anticuerpo anti- $\alpha$ SMA y/o un anticuerpo anti-GFAP a un clasificador de células, etc., pero sin limitarse a esto.

25 La presente descripción también se refiere a un método para preparar una línea de células productoras de matriz extracelular del intestino, comprendiendo el método

(i) una etapa de obtención de células de tejido intestinal fibrótico recogido de un sujeto que padece fibrosis del intestino, y

30 (ii) una etapa de selección de células que tienen un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP a partir de las células obtenidas en (i),

comprendiendo el método una etapa de immortalización de las células tras la etapa (i) o (ii).

35 La immortalización de las células puede llevarse a cabo mediante transfección con un gen de immortalización (por ejemplo, SV40T, un gen de telomerasa, etc.). La immortalización puede llevarse a cabo antes o después de seleccionar las células que tienen un fenotipo deseado. Las características distintas de la etapa de immortalización de células son tal como se describen para el método para aislar células productoras de matriz extracelular en el intestino.

40 La presente descripción también se refiere a un método para examinar un factor para tratar la fibrosis del intestino, comprendiendo el método

45 (i) una etapa de hacer que un factor de prueba coexista con la línea de células productoras de matriz extracelular del intestino que tiene un fenotipo positivo para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP derivada de tejido intestinal fibrótico recogido de un sujeto que padece fibrosis del intestino, y

(ii) una etapa de detección de un cambio en la línea celular debido a la coexistencia con el factor de prueba.

50 En la presente descripción, el factor de prueba incluye una sustancia tal como un compuesto así como diversos factores tales como calor, ondas electromagnéticas (por ejemplo, ondas de radio, luz, rayos X, rayos gamma, etc.), presión, y pH. Hacer que la línea celular "coexista" con un factor de prueba significa colocar la línea celular y el factor de prueba en el mismo medio, pero no se requiere necesariamente el contacto entre los dos. La coexistencia de la línea celular y un factor de prueba incluye, pero sin limitarse a, colocar la línea celular y el factor de prueba en el mismo recipiente. Hacer que una línea celular coexista con un factor de prueba puede llevarse a cabo *in vivo* o *in vitro*.

60 Los ejemplos del cambio en la línea celular debidos a la coexistencia con un factor de prueba incluyen, pero no se limitan a, inhibición o fomento de una actividad de la línea celular (por ejemplo inhibición o fomento de la expresión génica o la producción de sustancias) e inhibición o potenciación de la proliferación de la línea celular. Por tanto, por ejemplo, la inhibición de la proliferación de la línea celular o la inhibición de una actividad de la línea celular debido a la coexistencia con un factor de prueba representa que dicho factor de prueba es un factor para tratar la fibrosis del intestino.

65 La presente descripción también se refiere a un kit para examinar un factor para tratar la fibrosis del intestino, comprendiendo el kit la línea de células productoras de matriz extracelular del intestino que tiene un fenotipo positivo

para vimentina, negativo para  $\alpha$ SMA y negativo para GFAP derivada de tejido intestinal fibrótico recogido de un sujeto que padece fibrosis del intestino. El presente kit puede incluir, además de la línea celular, un reactivo para detectar un cambio en la línea celular, instrucciones relacionadas con un método para examinar un factor para tratar la fibrosis del intestino usando el presente kit, tal como una explicación por escrito, un medio de grabación electrónico tal como un CD o un DVD, etc.

### [Ejemplos]

La presente invención se explica en detalle adicional haciendo referencia a los ejemplos a continuación, pero sólo son ilustrativos.

#### Ejemplo 1 Identificación de células similares a células estrelladas en el intestino del ratón modelo de la enfermedad de Crohn, SAMP1/Yit

Con el fin de examinar si células correspondientes a células estrelladas hepáticas están implicadas o no en la fibrosis de la enfermedad de Crohn, se usó el ratón SAMP1/Yit, que es un ratón modelo de la enfermedad de Crohn. Los ratones SAMP1/Yit son ratones modelo espontáneos obtenidos haciendo consanguíneos, a lo largo de más de 20 generaciones, ratones que tienen una úlcera en la piel entre ratones SAMP1, que se preparan haciendo consanguíneas camadas de ratones AKR/J a través de 24 generaciones; producen espontáneamente ileítis hasta las 20 semanas de edad (Matsumoto *et al.*, Gut. Julio de 1998; 43 (1): 71-8), y se caracterizan histopatológicamente por (i) inflamación similar a enfermedad de Crohn que se produce habitualmente en la parte terminal del íleo, (ii) lesiones que se extienden de manera discontinua y transparietal, (iii) observación de engrosamiento de la capa muscular, hiperplasia de criptas, atrofia vellosa, infiltración de células inflamatorias en la lámina propia y la submucosa, hiperplasia de células de Panet y células reproductoras, granuloma, y abscesos de la cripta, etc. (Kosiewicz *et al.*, J Clin Invest. Marzo de 2001; 107 (6): 695-702). La mayoría de los ratones modelo IBD son modelos que están afectados por colitis, mientras que se piensa que los ratones SAMP1/Yit que tienen las características anteriores son ratones modelo que tienen estados que son los más próximos a la enfermedad de Crohn de entre los animales modelo de enfermedad existentes (Pizarro *et al.*, Trends Mol Med. mayo de 2003; 9 (5): 218-22).

Con el fin de identificar células similares a células estrelladas en el tejido del intestino de un ratón SAMP1/Yit, se examinó un sitio de fibrosis de íleo mediante un método de tinción inmunohistoquímica. En primer lugar, se recogió tejido de íleo de un ratón SAMP1/Yit (29 semanas de edad, donado por el Yakult Central Institute). Se fijó el tejido en formalina neutra al 30% durante 24 horas, luego se incluyó en parafina, y se cortó finamente para obtener un corte de muestra. Cuando el corte de muestra se tiñó con azán y se examinó para determinar su estado fibroso, se observó acumulación de fibras de colágeno entre las células de la capa muscular engrosada (figura 1 (a)). Además, se sometieron secciones secuenciales a análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos contra marcadores de células estrelladas hepáticas. Como anticuerpos, se usaron un anticuerpo anti-vimentina (anti-vimentina, Abcam, clon RV202, n.º de cat. ab8978, marca: Alexa Fluor 488), un anticuerpo anti- $\alpha$ SMA (anti- $\alpha$ -actina del músculo liso, SIGMA, clon 1A4, n.º de cat. A2547, marca: Cy3), y un anticuerpo anti-GFAP (anti-proteína ácida fibrilar glial, Dako, conejo policlonal, código n.º Z0334, marca: Dilight 633). Una vez llevada a cabo la tinción de inmunofluorescencia mediante un método convencional, cuando se llevó a cabo el examen con un microscopio confocal láser de barrido, se observó una gran cantidad de localización de células que tenían un fenotipo vimentina(+)/ $\alpha$ SMA(-)/GFAP(-) a lo largo del colágeno acumulado en un sitio de lesión fibrótica de la capa muscular del íleo (véanse las flechas en la figura 1 (b) a (d)). Por otra parte, no se observaron tales células en el sitio de la capa muscular del íleo de un ratón AKR/J, que era un ratón de referencia. Estos resultados sugieren que células hepáticas quiescentes similares a células estrelladas que tienen un fenotipo vimentina(+)/ $\alpha$ SMA(-)/GFAP(-) están implicadas en fibrosis.

#### Ejemplo 2 Establecimiento de línea celular similar a células estrelladas procedente de tejido fibrótico del intestino delgado de ratón SAMP1/Yit

Con el fin de someter las células examinadas en el ejemplo 1 a análisis funcional *in vitro* y, además, examinar una terapia para fibrosis del intestino, etc. utilizando las mismas, se separaron y se cultivaron células similares a células estrelladas que tenían un fenotipo vimentina(+)/ $\alpha$ SMA(-)/GFAP(-) de tejido fibrótico del intestino delgado de un ratón SAMP1/Yit para establecer así una línea celular similar a células estrelladas.

En primer lugar, se recogió tejido de íleo de un ratón SAMP1/Yit (21 semanas de edad), se cortó finamente a una longitud de aproximadamente 1 mm usando tijeras, luego se sumergió en 20 ml de una disolución de EDTA (una disolución de EDTA 4,5 mM en HBSS (pH 7,5), lo mismo se aplica a continuación) y se agitó ligeramente. Tras dejar en reposo a 4°C durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se llevó a cabo la resuspensión en disolución de EDTA recién preparada. Tras cambiar la disolución de EDTA cinco veces, se suspendieron fragmentos de tejido de íleo en DMEM que contenía FBS al 10%, se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos y se cultivaron en el 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. En el 5º día tras el comienzo del cultivo, un grupo de células con una morfología similar a células mesenquimatosas se adherieron a la placa y comenzaron a proliferar. En este momento, se llevó a cabo la transfección del gen de immortalización de SV40T usando el vector de retrovirus pMFG-tsT-IRES-neo (Kawano *et al.*,

Blood. 15 de enero de 2003; 101 (2): 532-40), dando así una línea celular IC10\_F2 (figura 2, parte superior). Posteriormente, la línea celular IC10\_F2 se sometió a un método de dilución limitante y a inmunotinción con anticuerpo anti- $\alpha$ SMA, anticuerpo anti-GFAP y anticuerpo anti-vimentina para intentar de ese modo clonar células que tenían un fenotipo vimentina(+)/ $\alpha$ SMA(-)/GFAP(-), y como resultado, pudo establecerse una línea celular similar a células estrelladas IC10\_F2\_E9 derivada del intestino que tenía tal fenotipo (figura 2, parte inferior).

Se examinó si las células IC10\_F2\_E9 establecidas expresaban o no un grupo de genes relacionados con el almacenamiento de VA, que son característicos de las células estrelladas, usando PCR en tiempo real. En primer lugar, se preparó el ARN total de cada una de células IC10\_F2 y células IC10\_F2\_E9 usando un RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 74104), y se preparó el ADNc haciéndolo reaccionar con una transcriptasa inversa (mezcla maestra de ARN de alta capacidad - ADNc, Applied Biosystems, 4390713). El ADNc así obtenido se usó para medir el nivel de expresión de un grupo de genes relacionados con el almacenamiento de vitamina A (ADRP, LRAT y LXR $\beta$ ) mediante PCR en tiempo real en un sistema LightCycler® 480 (Roche Applied Science). Como reactivo de PCR, se usó LightCycler® 480 Probes Master (Roche Applied Science, 4707494). Como sondas, se usaron las incluidas en Universal Probelibrary Probes (Roche Applied Science) (vimentina: sonda n.º 79, 4689020,  $\alpha$ SMA: sonda n.º 11, 4685105, ADRP: sonda n.º 79, 4689020, LRAT: sonda n.º 79, 4689020, LXR $\beta$ : sonda n.º 106, 4692250).

Además, los cebadores usados fueron los siguientes (a continuación en el presente documento, "F" indica un cebador directo y "R" indica un cebador inverso).

Vimentina:

F 5' TGCGCCAGCAGTATGAAA 3' (SEQ ID NO:1)

R 5' GCCTCAGAGAGGTCAGCAAA 3' (SEQ ID NO:2)

$\alpha$ SMA:

F 5' TCACCATTGGAAACGAACG 3' (SEQ ID NO:3)

R 5' ATAGGTGGTTTCGTGGATGC 3' (SEQ ID NO:4)

ADRP:

F 5' CCTCAGCTCTCCTGTTAGGC 3' (SEQ ID NO:5)

R 5' CACTACTGCTGCTGCCATTT 3' (SEQ ID NO:6)

LRAT:

F 5' GAAGGTGGTCTCCAACAAGC 3' (SEQ ID NO:7)

R 5' TACTGTGTCCACACGGATGC 3' (SEQ ID NO:8)

LXR $\beta$ :

F 5' GCTCTGCCTACATCGTGGTC 3' (SEQ ID NO:9)

R 5' CTCATGGCCCAGCATCTT 3' (SEQ ID NO:10)

ADRP es un tipo de proteína PAT (perilipina adipofilina TIP47), que se localiza en una membrana de gotitas de lípidos y está implicada en la biosíntesis o el metabolismo de las gotitas de lípidos (Lee *et al.*, J Cell Physiol. junio de 2010; 223 (3): 648-57), LRAT es una enzima de esterificación de retinol, que se localiza en la membrana del retículo endoplasmático en células estrelladas hepáticas, y se cree que está implicada en el almacenamiento de VA (Nagatsuma *et al.*, Liver Int. enero de 2009; 29 (1): 47-54), y LXR $\beta$  es un receptor nuclear implicado en el metabolismo lipídico y en la anti-inflamación y se observa que se expresa a nivel de ARNm en células estrelladas hepáticas (Beaven SW. *et al.*, Gastroenterology. marzo de 2011; 140 (3): 1052-62). Los resultados muestran que, en comparación con la línea de células parentales IC10\_F2, IC10\_F2\_E9 mostró 2,4 veces la expresión génica para ADRP, 27 veces la expresión génica para LRAT, y 2,4 veces la expresión génica para LXR $\beta$  (figura 3). Este resultado indica que IC10\_F2\_E9 tiene las características de las células estrelladas.

Ejemplo 3 Preparación de liposoma acoplado a VA que contiene ARNip

(1) ARNip

Como ARNip dirigido a la secuencia de bases de HSP47 (ratón, n.º de registro de GenBank X60676), que es una chaperona molecular común para colágenos (tipo I a IV), se usaron los siguientes.

5 A: GGACAGGCCUGUACAACUA (secuencia de hebra sentido de ARNip que comienza a partir de la base 969ª en la secuencia de bases de HSP47 de ratón, SEQ ID NO:11)

B: UAGUUGUACAGGCCUGUCC (secuencia de hebra antisentido de ARNip, SEQ ID NO:12)

10 Como ARNip aleatorio (también denominado ARNip reorganizado al azar (abreviatura: scr)), que era el control, se usaron los siguientes.

C: CCUCCAAACCAAUUGGAGG (hebra sentido de ARNip, SEQ ID NO:13)

15 D: CCUCCAAUUGGUUUGGAGG (hebra antisentido de ARNip, SEQ ID NO:14)

(2) Preparación de VA-lip-ARNip

20 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). Se prepararon liposomas antes de su uso a una concentración de 1 mM (DC-6-14) añadiendo, mientras se agitaba, agua doblemente destilada (DDW) a una mezcla de lípidos liofilizados. Con el fin de preparar un liposoma acoplado a VA, se mezclaron 20 nmoles de vitamina A (retinol, Sigma, EE.UU.) disueltos en DMSO con una suspensión de liposomas (20 nmoles como DC-6-14) en un tubo de 1,5 ml a 25°C mientras se agitaba. Con el fin de preparar un liposoma acoplado a VA que portara ARNip de HSP47 (VA-lip-ARNip de HSP47), se añadió una disolución de ARNip de HSP47 (3 nmol/ml en DDW) a una disolución de liposomas acoplados a retinol a temperatura ambiente mientras se agitaba. La razón molar de ARNip con respecto a DC-6-14 fue de 1:400. Con el fin de obtener una dosis deseable para su uso *in vitro*, se reconstituyó VA-lip-ARNip usando solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBS).

30 Ejemplo 4 Transfección de células IC\_F2\_E9 con ARNip e inhibición de la expresión de HSP47

35 Se añadieron 100  $\mu$ l de los liposomas acoplados a VA que contenían ARNip obtenidos en el ejemplo 3 a una multiplaca de 6 pocillos (N140675, Nunc™) que contenía  $1 \times 10^4$  células/pocillo de células IC\_F2\_E9 en DMEM que contenía FBS al 10%, se llevó a cabo incubación a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 1 hora, entonces se cambió el medio y se llevó a cabo incubación a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 horas adicionales. Posteriormente, se recogieron las células y se preparó el ARN total mediante el mismo método que en el ejemplo 2. El ARN total así obtenido se hizo reaccionar con una transcriptasa inversa para preparar de ese modo un ADNc y entonces se evaluó la inhibición de la expresión de HSP47 usando PCR en tiempo real. Los cebadores usados fueron los siguientes.

40 F: 5' GAAGGCTGTCGCCATCTC 3' (SEQ ID NO:15)

R: 5' CCCAGTCCTGCCAGATGT 3' (SEQ ID NO:16)

45 A partir de los resultados mostrados en la figura 4 puede observarse que el gen de HSP47 se expresó en las células IC10\_F2\_E9 y que la expresión de dicho gen se inhibió sólo mediante el liposoma acoplado a VA que contenía ARNip. Mientras que se tiene en cuenta el hecho de que ARNip actúa dentro de una célula, este resultado indica que las células IC10\_F2\_E9 tienen capacidad para producir colágeno y que el retinoide actúa como agente de direccionamiento para promover enormemente el consumo de una sustancia en las células IC10\_F2\_E9 como células productoras de matriz extracelular del intestino.

50 **Lista de secuencias**

<110> NITTO DENKO CORPORATION

55 <120> AGENTE PARA TRATAR LA FIBROSIS DEL INTESTINO

<130> PCT2547ND

<150> Documento JP2011-253085

60 <151> 18-11-2011

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1

ES 2 754 054 T3

|    |                                      |    |
|----|--------------------------------------|----|
|    | <211> 18                             |    |
|    | <212> ADN                            |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |    |
| 5  | <220>                                |    |
|    | <223> Cebador directo para vimentina |    |
|    | <400> 1                              |    |
|    | tgcgccagca gtatgaaa                  | 18 |
| 10 | <210> 2                              |    |
|    | <211> 20                             |    |
|    | <212> ADN                            |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |    |
| 15 | <220>                                |    |
|    | <223> Cebador inverso para vimentina |    |
|    | <400> 2                              |    |
| 20 | gcctcagaga ggtcagcaaa                | 20 |
|    | <210> 3                              |    |
|    | <211> 19                             |    |
|    | <212> ADN                            |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial           |    |
|    | <220>                                |    |
|    | <223> Cebador directo para alfa-SMA  |    |
| 30 | <400> 3                              |    |
|    | tcaccattgg aaacgaacg                 | 19 |
|    | <210> 4                              |    |
|    | <211> 20                             |    |
| 35 | <212> ADN                            |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |    |
|    | <220>                                |    |
|    | <223> Cebador inverso para alfa-SMA  |    |
| 40 | <400> 4                              |    |
|    | ataggtggtt tcgtgatgc                 | 20 |
|    | <210> 5                              |    |
| 45 | <211> 20                             |    |
|    | <212> ADN                            |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |    |
|    | <220>                                |    |
| 50 | <223> Cebador directo para ADRP      |    |
|    | <400> 5                              |    |
|    | cctcagctct cctgtaggc                 | 20 |
| 55 | <210> 6                              |    |
|    | <211> 20                             |    |
|    | <212> ADN                            |    |
|    | <213> Secuencia artificial           |    |
| 60 | <220>                                |    |
|    | <223> Cebador inverso para ADRP      |    |
|    | <400> 6                              |    |
|    | cactactgct gctgccattt                | 20 |
| 65 | <210> 7                              |    |

ES 2 754 054 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <211> 20                                       |    |
|    | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
| 5  | <220>  |    |
|    | <223> Cebador directo para LRAT                |    |
|    | <400> 7  |    |
| 10 | gaaggtggtc tccaacaagc                          | 20 |
|    | <210> 8  |    |
|    | <211> 20                                       |    |
|    | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
| 15 | <220>  |    |
|    | <223> Cebador inverso para LRAT                |    |
|    | <400> 8  |    |
| 20 | tactgtgtcc acacggatgc                          | 20 |
|    | <210> 9  |    |
|    | <211> 20                                       |    |
|    | <212> ADN                                      |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial                     |    |
|    | <220>  |    |
|    | <223> Cebador directo para LXR beta            |    |
| 30 | <400> 9  |    |
|    | gctctgccta catcgtggtc                          | 20 |
|    | <210> 10                                       |    |
|    | <211> 18                                       |    |
| 35 | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
|    | <220>  |    |
|    | <223> Cebador inverso para LXR beta            |    |
| 40 | <400> 10                                       |    |
|    | ctcatggccc agcatctt                            | 18 |
|    | <210> 11                                       |    |
| 45 | <211> 19                                       |    |
|    | <212> ARN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
|    | <220>  |    |
| 50 | <223> Hebra sentido de ARNip de HSP47 de ratón |    |
|    | <400> 11                                       |    |
|    | ggacaggccu guacaacua                           | 19 |
| 55 | <210> 12                                       |    |
|    | <211> 19                                       |    |
|    | <212> ARN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
| 60 | <220>  |    |
|    | <223> Hebra sentido de ARNip de HSP47 de ratón |    |
|    | <400> 12                                       |    |
|    | uaguuguaca ggccugucc                           | 19 |
| 65 | <210> 13                                       |    |

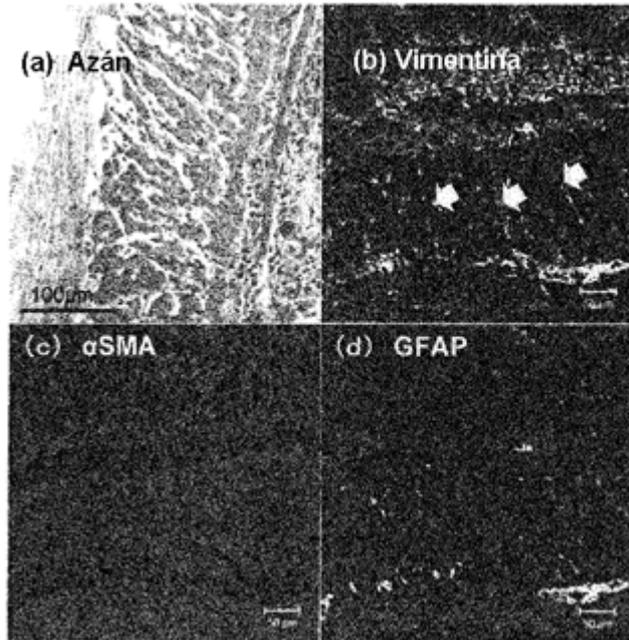
# ES 2 754 054 T3

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <211> 19                                   |    |
|    | <212> ARN                                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                 |    |
| 5  | <220>                                      |    |
|    | <223> Hebra sentido de ARNip aleatorio     |    |
|    | <400> 13                                   |    |
|    | ccuccaaacc aauuggagg                       | 19 |
| 10 | <210> 14                                   |    |
|    | <211> 19                                   |    |
|    | <212> ARN                                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                 |    |
| 15 | <220>                                      |    |
|    | <223> Hebra antisentido de ARNip aleatorio |    |
|    | <400> 14                                   |    |
| 20 | ccuccaaug guuuggagg                        | 19 |
|    | <210> 15                                   |    |
|    | <211> 18                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial                 |    |
|    | <220>                                      |    |
|    | <223> Cebador directo para HSP47 de ratón  |    |
| 30 | <400> 15                                   |    |
|    | gaaggctgtc gccatctc                        | 18 |
|    | <210> 16                                   |    |
|    | <211> 18                                   |    |
| 35 | <212> ADN                                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                 |    |
|    | <220>                                      |    |
|    | <223> Cebador inverso para HSP47 de ratón  |    |
| 40 | <400> 16                                   |    |
|    | cccagtcctg ccagatgt                        | 18 |

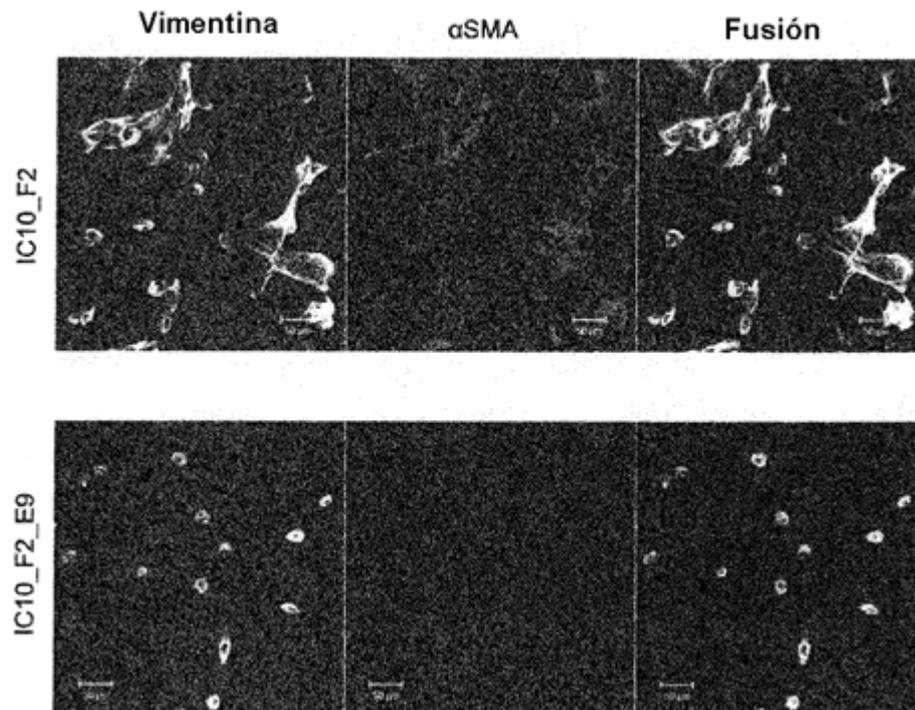
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la fibrosis del intestino, comprendiendo la composición un portador que comprende un retinoide que promueve la administración de la composición a células productoras de matriz extracelular en el intestino y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, en la que la fibrosis del intestino es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, y en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es ARNip de HSP47.
- 10 2. Composición farmacéutica para su uso en la recuperación de tejido del intestino que se ha alterado por fibrosis al menos a un estado con un menor grado de fibrosis, comprendiendo la composición un portador que comprende un retinoide que promueve la administración de la composición a células productoras de matriz extracelular en el intestino y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, en la que la fibrosis es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, y en la que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es ARNip de HSP47.
- 15 3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el retinoide comprende retinol.
- 20 4. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el portador comprende un retinoide y un componente de portador distinto del retinoide, siendo la razón molar del retinoide con respecto al componente de portador distinto del retinoide de 8:1 a 1:4.
- 25 5. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que está en una forma preparada en el momento de uso.
- 30 6. Kit para preparar la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el kit uno o más recipientes que comprenden, o bien individualmente o bien en combinación, el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino, el retinoide y, según sea necesario, un constituyente de portador distinto del retinoide, en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es ARNip de HSP47.
- 35 7. Procedimiento para producir la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la fibrosis del intestino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5 o composición farmacéutica para su uso en la regeneración de tejido normal del intestino a partir de tejido fibrótico del intestino según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, comprendiendo el procedimiento una etapa de formulación de un retinoide que promueve la administración de la composición a células productoras de matriz extracelular en el intestino, y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino como principio activo, en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de las células productoras de matriz extracelular en el intestino es ARNip de HSP47.
- 40

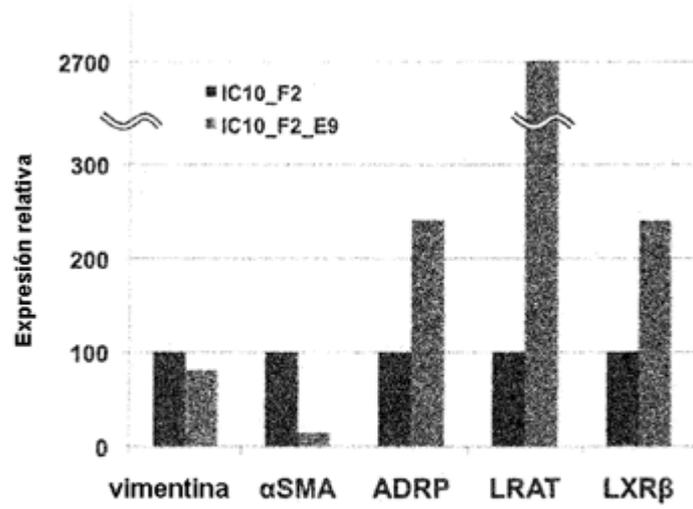
[Fig.1]



[Fig.2]



[Fig.3]



[Fig.4]

