

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 554**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61K 9/107	(2006.01) A61K 47/69	(2007.01)
A61K 9/127	(2006.01) A61K 38/18	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)	
A61K 31/07	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 9/50	(2006.01)	
A61K 9/51	(2006.01)	
A61P 1/16	(2006.01)	
A61P 1/18	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2005** **E 13193438 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 2730277**

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

30 Prioridad:

22.12.2004 JP 2004382791

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NIITSU, YOSHIRO;
KATO, JUNJI y
SATO, YASUSHI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 784 554 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con células estrelladas que comprende un portador de fármacos que comprende un derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A como componente, y un fármaco de diagnóstico y/o terapéutico, en el que el trastorno relacionado con células estrelladas se selecciona del grupo que consiste en fibrosis, hepatitis y pancreatitis, y en el que el derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A se selecciona(n) de vitamina A, tretinoína, adapaleno, o palmitato de retinol y fenretinida (4-HPR), y, uniéndose a o incluyéndose en el portador de fármacos, permite el transporte específico del fármaco a células estrelladas. La presente invención se refiere también a un kit para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con células estrelladas, se selecciona del grupo que consiste en fibrosis, hepatitis y pancreatitis según las reivindicaciones. El fármaco puede ser un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas, y especialmente un fármaco dirigido a una molécula constituyente de la matriz extracelular secretada por células estrelladas, o a una o más moléculas que tienen la función de producir o secretar una molécula constituyente de la matriz extracelular.

20 **Antecedentes de la técnica**

La fibrosis del hígado está provocada por, aunque no se limita a, las células estrelladas hepáticas (HSC) que se activan como resultado de, por ejemplo, enfermedad hepática viral debido al virus de la hepatitis B o C, esteatohepatitis no alcohólica, diabetes relacionada con malnutrición, parásitos, enfermedades infecciosas tales como tuberculosis o sífilis, congestión intrahepática debido a una enfermedad cardíaca, o cicatrización de herida de una lesión tisular, etc. dentro del hígado que acompañan a un trastorno en las vías biliares, etc., y depositándose la matriz extracelular producida y secretada de manera excesiva (ECM) tal como una pluralidad de tipos de moléculas de colágeno y fibronectina en el tejido intersticial. El estadio final de la fibrosis hepática es la cirrosis hepática, y debido a que se producen insuficiencia hepática, carcinoma hepatocelular, etc., para prevenirlos y/o inhibir el progreso de los mismos, existe el deseo de desarrollar un portador de fármacos y un kit de portador de fármacos para inhibir al menos la fibrosis hepática.

Además, en el páncreas, se desarrolla pancreatitis crónica como resultado de la fibrosis pancreática mediante el mismo mecanismo que para la fibrosis hepática (Madro A *et al.*, Med Sci Monit. Julio de 2004; 10(7): RA166-70.; Jaster R, Mol Cancer. 6 de octubre de 2004; 3(1): 26.). Sin embargo, aún no se ha encontrado un medio eficaz para inhibir el progreso de la fibrosis pancreática o pancreatitis crónica.

Como medio eficaz para inhibir la fibrosis del hígado o el páncreas, existe la posibilidad de que las células estrelladas sean uno de los candidatos diana importantes (Fallowfield J A, Iredale J P, Expert Opin Ther Targets. Octubre de 2004; 8(5): 423-35; Pinzani M, Rombouts K. Dig Liver Dis. Abril de 2004; 36(4): 231-42.). En el proceso de la fibrosis, se activan células estrelladas por citocina a partir de células de Kupffer o células infiltrantes y se transforman en células activadas, y existe una producción marcada de la matriz extracelular (ECM). Se conocen las células estrelladas como células de almacenamiento para la vitamina A, y pertenecen a la familia de los miofibroblastos. Por otro lado, las células estrelladas producen metaloproteinasas de matriz (MMP), su factor inhibidor (TIMP), una citocina tal como TGF- β o PDGF, y un factor de crecimiento tal como HGF, y desempeñan un papel principal en la fibrosis hepática. Las células estrelladas activadas aumentan la capacidad contráctil y se implican en la regulación de flujo sanguíneo y, además, aumentan la expresión de diversos tipos de receptores de citocina y se vuelven muy sensibles a la citocina.

Con respecto a los métodos terapéuticos para la fibrosis que se han intentado hasta la actualidad, puede citarse el control del metabolismo del colágeno, la promoción del sistema de degradación del colágeno, la inhibición de la activación de las células estrelladas, etc. Incluyen la inhibición de TGF β (conocido como un factor para activar las células estrelladas y promover la producción de matriz extracelular (ECM)) usando un receptor de TGF β de tipo II truncado (Qi Z *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2 de marzo de 1999; 96 (5): 2345-9.), un receptor de TGF β tipo II soluble (George J *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 26 de octubre de 1999; 96 (22): 12719-24.), HGF (traducción japonesa publicada 5-503076 de una solicitud PCT; Ueki K *et al.*, Nat Med. Febrero de 1999; 5 (2): 226-30.), etc., la promoción de la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) por medio de HGF o un vector que contiene el gen de MMP (Iimuro Y *et al.*, Gastroenterology 2003; 124: 445-458.), la inhibición de TIMP, que es un inhibidor de MMP, mediante ARN antisentido, etc. (Liu W B *et al.*, World J Gastroenterol. Febrero de 2003; 9 (2): 316-9), el control de la activación de células estrelladas por medio de un ligando PPAR γ (Marra F *et al.*, Gastroenterology. Agosto de 2000; 119 (2): 466-78) o un antagonista del receptor de angiotensina-II de tipo I (Yoshiji H *et al.*, Hepatology. Octubre de 2001; 34 (4 Pt 1): 745-50.), la inhibición del crecimiento de células estrelladas mediante la inhibición de la acción de PDGF por medio del inhibidor de tirosina cinasa PDGF, etc. (Liu X J *et al.*, World J Gastroenterol. Agosto de 2002; 8 (4): 739-45.) y la inhibición de los canales de sodio mediante amilorida (Benedetti A *et al.*, Gastroenterology. Febrero de 2001; 120 (2): 545-56), etc., y la inducción apoptótica de células estrelladas

por medio del compuesto 861 (Wang L, *et al.*, World J Gastroenterol 1 de octubre de 2004; 10 (19): 2831-2835), gliotoxina (Orr J G y col., Hepatology. Julio de 2004; 40 (1): 232-42.), etc. Sin embargo, en todos los casos, dado que la especificidad de la acción y/o la especificidad del órgano son bajas, existen problemas con los efectos y con los efectos secundarios.

Con respecto a la síntesis de proteínas de colágeno, hay muchos puntos poco claros con respecto a la ruta metabólica, y un método terapéutico que usa un fármaco que inhibe esto no se ha establecido como un método terapéutico que sea eficaz y seguro para un organismo vivo en cuanto a los efectos secundarios. Es decir, en un método en el que las moléculas implicadas en la producción de colágeno se seleccionan como diana, la especificidad para la diana no puede potenciarse debido a la diversidad de funciones de las moléculas, y la posibilidad de provocar efectos secundarios es alta. Si el colágeno, que es el producto final, pudiera inhibirse directamente, esto sería razonable como un método terapéutico común para los procesos de fibrosis, y para hacer esto sería necesario controlar todos los diversos tipos de colágeno representados por los tipos I a IV al mismo tiempo.

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

Los presentes inventores prepararon una ribozima que controla específicamente la función de HSP47 en un sistema celular, y mostraron que la producción y secreción de colágenos puede controlarse por la ribozima al mismo tiempo (Sasaki H *et al.* Journal of Immunology, 2002, 168: 5178-83; Hagiwara S, *et al.* J Gene Med. 2003, 5: 784-94). Para controlar específicamente la síntesis de HSP47, puede emplearse ARNip, que es más fácil de optimizar que la ribozima. El ARNip (ARN de interferencia pequeño) usados en la presente memoria descriptiva es un término general para ARN bicatenario usado en iARN (interferencia de ARN). La iARN es un fenómeno en el que el ARN bicatenario (ARN bicatenario; ARNbc), que se forma a partir de ARN sentido y ARN antisentido y es homólogo con un gen dado, destruye un segmento homólogo de una transcrito (ARNm) del gen. Originalmente se presentó en un experimento usando un nematodo (Fire A, *et al.* Nature (1998) 391: 806-811), y se ha demostrado que está presente un mecanismo de inducción similar en las células de mamíferos (Ui-Tei K, *et al.* FEBS Lett (2000) 479: 79-82). Además, Elbashir *et al.* han demostrado que un ARNbc corto con una longitud del orden de 21 a 23 pb puede inducir iARN en un sistema de células de mamífero sin presentar citotoxicidad (Elbashir S M, *et al.* Nature (2001) 411: 494-498). Sin embargo, para que los efectos de estas moléculas se presenten de manera eficaz, es necesario emplear un método que sea específico para un órgano diana. El documento WO 2004/019921 A2 se refiere a un método para tratar una enfermedad hepática en un sujeto, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un inductor de apoptosis de células estrelladas hepáticas o de un agente capaz de dar lugar a un inductor de apoptosis de células estrelladas hepáticas.

[Publicación de patente 1] Traducción japonesa 5-503076 de una solicitud de PCT

[Publicación no de patente 1] Madro A *et al.*, Med Sci Monit. Julio de 2004; 10(7): RA166-70

[Publicación no de patente 2] Jaster R, Mol Cancer. 6 de octubre de 2004; 3(1): 26

[Publicación no de patente 3] Fallowfield J A, Iredale J P, Expert Opin Ther Targets. Octubre de 2004; 8(5): 423-35

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

[Publicación no de patente 5] Qi Z *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2 de marzo de 1999; 96(5): 2345-9

[Publicación no de patente 6] George J *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 26 de octubre de 1999; 96(22): 12719-24

[Publicación no de patente 7] Ueki K *et al.*, Nat Med. Febrero de 1999; 5(2): 226-30

[Publicación no de patente 8] Iimuro Y *et al.*, Gastroenterology 2003; 124: 445-458

[Publicación no de patente 9] Liu W B *et al.*, World J Gastroenterol. Febrero de 2003; 9(2): 316-9

[Publicación no de patente 10] Marra F *et al.*, Gastroenterology. Agosto de 2000; 119(2): 466-78

[Publicación no de patente 11] Yoshiji H *et al.*, Hepatology. Octubre de 2001; 34(4 Pt 1): 745-50

[Publicación no de patente 12] Liu X J *et al.*, World J Gastroenterol. Agosto de 2002; 8(4): 739-45

[Publicación no de patente 13] Benedetti A *et al.*, Gastroenterology. Febrero de 2001; 120(2): 545-56

[Publicación no de patente 14] Wang L *et al.*, World J Gastroenterol 1 de octubre de 2004; 10(19): 2831-2835

5 [Publicación no de patente 15] Orr J G *et al.*, Hepatology. Julio de 2004; 40(1): 232-42

[Publicación no de patente 16] Sasaki H *et al.*, Journal de Immunology, 2002, 168: 5178-83

[Publicación no de patente 17] Hagiwara S *et al.*, J Gene Med. 2003, 5: 784-94

10

[Publicación no de patente 18] Fire A *et al.*: Nature (1998) 391: 806-811

[Publicación no de patente 19] Ui-Tei K *et al.*: FEBS Lett (2000) 479: 79-82

15 [Publicación no de patente 20] Elbashir S M *et al.*: Nature (2001) 411: 494-498

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

20

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

Divulgación de la invención

25

Problemas que se van a resolver mediante la invención

Para seleccionar como diana un tejido y/u órgano, la aplicación de un sistema de administración de fármacos (DDS) es un medio eficaz (Yasuhiko New Developments in Drug Delivery System DDS Technology and their Application - Cutting-edge technology for biomedical research and advanced medical treatment, Medical Do, ISBN: 4944157932, 2003; Mitsuru Hashida, Drug Delivery Systems - New challenges for drug discovery and therapy, New Bioscience Series, Kagaku-dojin, ISBN: 4759803858, 1995). Como portador de fármacos usado en el sistema de administración de fármacos (DDS), existen aquellos en los que se aplica una micela polimérica, un liposoma, una microemulsión, etc. Como técnica para potenciar la especificidad de estos portadores hacia un órgano diana, se conoce una técnica en la que un anticuerpo y/o ligando para un antígeno o receptor específico de órgano y/o tejido se mezcla con o se une al portador, y una técnica en la que se utilizan las propiedades fisicoquímicas del portador, pero no existe una técnica conocida para el caso particular en el que se seleccionan las células estrelladas como diana.

35

Medios para resolver los problemas

40

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier contenido que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

45

La presente invención se refiere a un portador de fármacos y a un kit de portador de fármacos que permiten que un fármaco de diagnóstico y/o terapéutico se transporte específicamente a células estrelladas. El portador de fármacos en la presente invención puede ser cualquiera en forma de micela polimérica, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera, y uniéndose al mismo o incluyéndose en el mismo, vitamina A (VA) o un derivado de retinoides seleccionado de tretinoína, adapaleno, o palmitato de retinol, o un análogo de vitamina A seleccionado de fenretinida (4-HPR), un fármaco terapéutico puede transportarse específicamente a células estrelladas hepáticas. Además, preparando uno en el que el portador de fármacos incluye una molécula o una pluralidad de moléculas seleccionadas de inhibidores de actividad de TGF β tales como un receptor de TGF β de tipo II truncado y un receptor de TGF β de tipo II soluble, preparaciones de factores de crecimiento tales como HGF, promotores de la producción de MMP tales como un vector de adenovirus que contiene el gen de MMP, inhibidores de la activación celular y/o inhibidores del crecimiento incluyendo un ligando PPAR γ , un antagonista del receptor de angiotensina II de tipo I, un inhibidor de tirosina cinasa PDGF, y un inhibidor de los canales de sodio tal como amilorida, e inductores de la apoptosis tales como el compuesto 861 y gliotoxina, y por vía oral, o por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa o por vía intraperitoneal se le administra a un paciente que tiene riesgo de fibrosis o síntomas de fibrosis, o a pacientes que tienen diversos trastornos relacionados con la fibrosis tales como, por ejemplo, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, cáncer de hígado o pancreatitis crónica, la activación de células estrelladas puede suprimirse, y los estados de fibrosis y/o de enfermedad relacionada con fibrosis pueden prevenirse, inhibirse o mejorarse. Alternativamente, o además de esto, usando el portador de fármacos que encierra una ribozima, un ARN antisentido o un ARNi que inhibe específicamente HSP47, que es una chaperona molecular específica de colágeno, o TIMP, que es un inhibidor de MMP, puede inhibirse simultáneamente la secreción de colágenos de tipo I a IV, y como resultado puede inhibirse de manera eficaz la fibrogénesis.

60

65

Por tanto, la presente invención se refiere a un medicamento o a un kit para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con células estrelladas según las reivindicaciones.

5 Además, la presente invención se refiere al portador de fármacos en el que el derivado de retinoides incluye vitamina A.

Además, la presente invención se refiere al portador de fármacos en el que el derivado de retinoides y/o el análogo de vitamina A se contienen a del 0,2 al 20% en peso.

10 Además, la presente invención se refiere al portador de fármacos en el que está en una cualquiera de forma de micela polimérica, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera.

15 Además, la presente invención se refiere a un medicamento para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, incluyendo el medicamento el portador de fármacos y un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas.

20 Además, la presente invención se refiere al medicamento en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en hepatitis, fibrosis hepática, cirrosis hepática, pancreatitis, fibrosis pancreática, fibrosis de cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea.

25 Además, la presente invención se refiere al medicamento en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la actividad de TGF β , una preparación que tiene actividad de HGF, un promotor de la producción de MMP, un inhibidor de la producción de TIMP, un ligando PPAR γ , un inhibidor de la actividad de angiotensina, un inhibidor de la actividad de PDGF, un inhibidor de los canales de sodio, un inductor de apoptosis, y un ARNip, ribozima, ácido nucleico antisentido, o polinucleótido de quimera de ADN/ARN, o un vector que expresa el mismo, que selecciona como diana una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por células estrelladas o una o más moléculas que tienen la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular.

30 Además, la presente invención se refiere al medicamento en el que la molécula que tiene la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular es HSP47.

35 Además, la presente invención se refiere al medicamento en el que el fármaco y el portador de fármacos se mezclan en el lugar del tratamiento médico o en las proximidades del mismo.

40 Además, la presente invención se refiere a un kit de preparación para el medicamento, incluyendo el kit uno o más envases que contienen uno o más del fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas, un constituyente del portador de fármacos, y un derivado de retinoides y/o un análogo de vitamina A.

Además, la presente invención se refiere a un método para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, incluyendo el método administrar una cantidad eficaz del medicamento a un sujeto que lo necesita.

45 Además, la presente invención se refiere al método en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en hepatitis, fibrosis hepática, cirrosis hepática, pancreatitis, fibrosis pancreática, fibrosis de cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea.

Además, la presente invención se refiere al método en el que el medicamento se administra por vía parenteral.

50 Además, la presente invención se refiere al uso del portador de fármacos en la producción de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas.

Además, la presente invención se refiere a un método de administración de fármacos para células estrelladas utilizando el portador de fármacos.

55 Además, la presente invención también se refiere a un portador de fármacos para inhibir la fibrosis que incluye un derivado de retinoides y/o un análogo de vitamina A como componente y transporta un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas específicamente a células estrelladas, el portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que el derivado de retinoides incluye vitamina A, el portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que el derivado de retinoides y/o el análogo de vitamina A se contiene a del 0,2% al 20%, el portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que está en una cualquiera de forma de micela polimérica, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera, el portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas incluye uno o más fármacos seleccionados de un inhibidor de la actividad de TGF β , una preparación que tiene actividad de HGF, un promotor de la producción de MMP, un inhibidor de la producción de TIMP, un ligando PPAR γ , un inhibidor de la actividad de angiotensina, un inhibidor de la actividad de PDGF, un inhibidor de los canales de sodio y un inductor de apoptosis, el portador de fármacos para

inhibir la fibrosis en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas incluye un ARNip, una ribozima, o un ARN antisentido, o un vector que expresa los mismos, que selecciona como diana una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por células estrelladas, o que selecciona como diana una o más moléculas que tienen la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular, y el portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que la molécula que tiene la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular es HSP47.

Además, la presente invención se refiere a un kit de portador de fármacos para inhibir la fibrosis que incluye uno o más envases que contienen uno o más de un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas, un constituyente del portador de fármacos, y un derivado de retinoides y/o un análogo de vitamina A, el kit de portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que el derivado de retinoides incluye vitamina A, el kit de portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que el derivado de retinoides y/o el análogo de vitamina A se contiene a del 0,2% al 20%, el kit de portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que está en una cualquiera de forma de micela polimérica, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera, el kit de portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas incluye uno o más fármacos seleccionados de un inhibidor de la actividad de TGF β , una preparación que tiene actividad de HGF, un promotor de la producción de MMP, un inhibidor de la producción de TIMP, un ligando PPAR γ , un inhibidor de la actividad de angiotensina, un inhibidor de la actividad de PDGF, un inhibidor de los canales de sodio y un inductor de apoptosis, el kit de portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas incluye un ARNip, una ribozima o un ARN antisentido, o un vector que expresa los mismos, que selecciona como diana una molécula constituyente de la matriz extracelular secretada por células estrelladas, o que selecciona como diana una o más moléculas que tienen la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular, y el kit de portador de fármacos para inhibir la fibrosis en el que la molécula que tiene la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular es HSP47.

Efectos de la invención

Mediante el uso del portador de fármacos y el kit de portador de fármacos de la presente invención que permiten que se transporte específicamente un fármaco de diagnóstico y/o terapéutico a células estrelladas como medio eficaz para prevenir, suprimir o mejorar la fibrosis y/o diversos tipos de trastornos relacionados con la fibrosis, pueden proporcionarse efectos terapéuticos innovadores tales como los mostrados en los ejemplos. Es decir, debido a que el portador de fármacos y el kit de portador de fármacos de la presente invención seleccionan como diana específicamente células estrelladas, los estados clínicos que se desarrollan principalmente debido a células estrelladas tales como, por ejemplo, fibrosis, pueden inhibirse de manera eficiente y de manera eficaz mientras que se minimizan los efectos secundarios.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] Un diagrama que muestra un protocolo con respecto a la evaluación del efecto de ARNip de gp46 *in vitro* usando células NRK, y determinación de secuencia, programación y concentración.

[Figura 2] Un diagrama fotográfico que muestra el resultado de la inmunotransferencia de tipo Western de gp46 y actina (cultivo de 24 horas, examen de secuencia óptima).

[Figura 3] Un diagrama fotográfico que muestra el resultado de la inmunotransferencia de tipo Western de gp46 y actina (cultivo de 24 horas, examen de concentración óptima).

[Figura 4] Un diagrama fotográfico que muestra el resultado de la inmunotransferencia de tipo Western de gp46 y actina (concentración 50 nM, examen de tiempo de cultivo óptimo).

[Figura 5] Un diagrama que muestra un protocolo para evaluar la inhibición de la expresión de colágeno por ARNip de gp46 en células NRK.

[Figura 6] Un gráfico que muestra la inhibición de síntesis de colágeno por ARNip.

[Figura 7] Un diagrama fotográfico que muestra la transfección de ARNip específica de HSC.

[Figura 8] Un diagrama fotográfico para evaluar el porcentaje de transfección de ARNip específica de HSC.

[Figura 9] Un diagrama fotográfico para evaluar la inhibición de la expresión de gp46 por ARNip.

[Figura 10] Un diagrama fotográfico que muestra tinción con azan de hígado de rata a la que se le había administrado DMN.

[Figura 11] Un diagrama que muestra un protocolo de tratamiento de rata LC.

[Figura 12] Un diagrama fotográfico que muestra tinción con azan de hígado de rata LC a la que se le había administrado VA-Lip-ARNip de gp46.

[Figura 13] Un diagrama que muestra un método para extraer una porción teñida por medio del software NIH Image (6 posiciones que se toman de manera aleatoria de una imagen teñida con azan).

[Figura 14] Un gráfico que muestra la razón por área ocupada por porciones fibróticas en histología de hígado (razón de colágeno por área, %).

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

[Figura 16] Un gráfico que muestra una curva de supervivencia para una rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intraportal VA-Lip-ARNip de gp46.

[Figura 17] Un diagrama fotográfico que muestra tinción con azan de tejido hepático de rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intraportal VA-LipARNip de gp46.

[Figura 18] Un gráfico que muestra una curva de supervivencia para una rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intraportal VA-Lip-ARNip de gp46.

[Figura 19] Un diagrama fotográfico que muestra tinción con azan de tejido hepático de una rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intraportal VA-LipARNip de gp46.

[Figura 20] Un gráfico que muestra una curva de supervivencia para una rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intravenosa VA-Lip-ARNip de gp46.

[Figura 21] Un gráfico que muestra una curva de supervivencia para una rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intravenosa VA-Lip-ARNip de gp46.

[Figura 22] Un diagrama fotográfico que muestra tinción con azan de tejido hepático de rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intravenosa VA-LipARNip de gp46.

[Figura 23] Un diagrama que muestra la mejora de la eficacia de transfección de VA-Lip-ARNip de gp46 mediante RBP.

[Figura 24] Un diagrama que muestra la inhibición de la transfección de VA-Lip-ARNip de gp46 mediante anticuerpo anti-RBP.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

El derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A en la presente invención incluye vitamina A así como un derivado de retinoides o análogo de vitamina A según las reivindicaciones en un estado en el que se disuelve en o se mezcla con un medio que puede disolverlo o retenerlo.

El derivado de retinoides según las reivindicaciones se selecciona de tretinoína, adapaleno, palmitato de retinol, y en particular vitamina A (ácido retinoico). El análogo de vitamina A según las reivindicaciones es fenretinida (4-HPR). La presente invención utiliza la propiedad de las células estrelladas para incorporar de manera positiva un derivado de retinoides y/o un análogo de vitamina A, y usando el derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A como portador de fármacos o uniéndolo a o incluyéndolo en otro componente de portador de fármacos, un material o cuerpo deseado se transporta específicamente a células estrelladas.

Por tanto, el portador de fármacos de la presente invención puede contener un componente de portador de fármacos distinto del derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A. Un componente de este tipo no está particularmente limitado, y puede usarse cualquier componente conocido en los campos de la medicina y la farmacia, pero es preferible que sea capaz de incluir el derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A o unirse a los mismos. Los ejemplos de un componente de este tipo 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 adormidera, aceite mineral, y una lecitina tal como lecitina de yema de huevo, pero los ejemplos no se limitan a los mismos. Entre ellos, son preferibles los que pueden formar un liposoma, por ejemplo, fosfolípidos naturales tales como lecitina, fosfolípidos semisintéticos tales como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), y diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), y colesterol.

Además, el portador de fármacos de la presente invención puede contener una sustancia que mejore la incorporación en células estrelladas, por ejemplo, proteína de unión a retinol (RBP).

La unión o inclusión del derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A con el portador de fármacos de la presente

invención también puede llevarse a cabo uniendo o incluyendo el derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A con otro componente del portador de fármacos mediante métodos químicos y/o físicos. Alternativamente, la unión o inclusión del derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A con el portador de fármacos de la presente invención también puede llevarse a cabo mezclando el derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A que tiene afinidad de formación y componentes básicos del portador de fármacos, en los componentes de portador de fármacos durante la preparación del portador de fármacos. La cantidad de derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A unido a o incluido en el portador de fármacos de la presente invención puede ser del 0,01% al 100% como razón en peso en relación a los componentes de portador de fármacos, preferiblemente del 0,2% al 20%, y más preferiblemente del 1% al 5%.

El portador de fármacos de la presente invención puede estar en cualquier forma siempre que el material o cuerpo deseado pueda transportarse para seleccionar como diana células estrelladas, y los ejemplos de la forma incluyen, pero no se limitan a, micela polimérica, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera. Además, el portador de fármacos de la presente invención puede incluir en su interior la sustancia que se va a transportar, que se va a unir al exterior de la sustancia que se va a transportar, o que se va a mezclar con la sustancia que se va a transportar siempre que el derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A incluido en el mismo se exponga al menos de manera parcial en el exterior de la preparación antes de que alcance las células estrelladas como muy tarde.

El portador de fármacos de la presente invención selecciona como diana específicamente células estrelladas y permite un efecto deseado tal como, por ejemplo, inhibición o prevención de fibrosis que va a presentarse con el efecto máximo y efectos secundarios mínimos transportando de manera eficaz a células estrelladas un material o cuerpo deseado tal como, por ejemplo, un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas. El material o cuerpo que el presente portador de fármacos administra no está particularmente limitado, pero tiene preferiblemente un tamaño que permite el movimiento físico en un organismo vivo desde el sitio de administración hasta el hígado, páncreas, etc., en el que están presentes células estrelladas. Por tanto, el portador de fármacos de la presente invención puede transportar no sólo un material tal como un átomo, una molécula, un compuesto, una proteína o un ácido nucleico sino también un cuerpo tal como un vector, una partícula de virus, una célula, un sistema de liberación de fármacos constituido por uno o más elementos, o una micromáquina. El material o cuerpo tiene preferiblemente la propiedad de ejercer algún efecto sobre las células estrelladas, y los ejemplos del mismo incluyen uno que marca células estrelladas y uno que controla la actividad o crecimiento de células estrelladas.

Por tanto, en una realización de la presente invención, es un "fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas" que el portador de fármacos suministra. Esto puede ser cualquier fármaco que inhibe directa o indirectamente las acciones fisicoquímicas de células estrelladas implicadas en la promoción de fibrosis, y los ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la actividad de TGF β tales como un receptor de TGF β de tipo II truncado y un receptor de TGF β de tipo II soluble, preparaciones de factores de crecimiento tales como HGF y vectores de expresión para los mismos, promotores de la producción de MMP tales como un vector de adenovirus que contiene el gen de MMP, inhibidores de la producción de TIMP tales como un ácido nucleico de TIMP antisentido, un ligando de PPAR γ , inhibidores de la activación celular y/o inhibidores del crecimiento celular tales como un inhibidor de la actividad de angiotensina, un inhibidor de la actividad de PDGF, y un inhibidor de los canales de sodio, y también inductores de la apoptosis tales como el compuesto 861 y gliotoxina, adiponectina (documento JP, A, 2002-363094), y un compuesto que tiene actividad inhibidora de cinasa Rho tal como (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano (documento WO 00/64478). Además, el "fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas" en la presente invención puede ser cualquier fármaco que promueva directa o indirectamente las acciones fisicoquímicas de células estrelladas implicadas directa o indirectamente en la inhibición de fibrosis, y los ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan a, un fármaco para promover un sistema de degradación de colágeno, por ejemplo, promotores de la producción de MMP tales como un vector de expresión de MMP, HGF, y fármacos que tienen actividad similar a HGF tal como análogos de HGF y vectores de expresión para los mismos.

Otros ejemplos del "fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas" en la presente invención incluyen un fármaco para controlar el metabolismo de una matriz extracelular tal como colágeno, por ejemplo, una sustancia que tiene un efecto en la inhibición de la expresión de una molécula diana, tal como ARNip, ribozima y ácido nucleico antisentido (incluyendo ARN, ADN, y un material compuesto de los mismos), una sustancia que tiene un efecto negativo dominante, y vectores que expresan los mismos, que seleccionan como diana, por ejemplo, una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por células estrelladas o seleccionan como diana una o más moléculas que tienen la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular.

El ARNip es un ARN bicatenario que tiene una secuencia específica para una molécula diana tal como un ARNm, y promueve la degradación de la molécula diana, inhibiendo así la expresión de un material formado así tal como, por ejemplo, una proteína (interferencia de ARN). Debido a que el principio se publicó por Fire *et al.* (Nature, 391: 806-811, 1998), una amplia gama de investigación se ha llevado a cabo en la optimización de ARNip, y un experto en la técnica está familiarizado con tales técnicas. Además, los materiales distintos del ARNip que provocan interferencia de ARN u otra reacción de inhibición de expresión génica se han investigado de manera intensiva, y existe actualmente un gran número de tales materiales.

Por ejemplo, el documento JP, A, 2003-219893 describe un polinucleótido bicatenario formado a partir de ARN y ADN que inhibe la expresión de un gen diana. Este polinucleótido puede ser un híbrido de ADN/ARN en el que una de las dos cadenas es ADN y la otra es ARN, o una quimera de ADN/ARN en la que una porción de la misma cadena es ADN y la otra porción es ARN. Un polinucleótido de este tipo está formado preferiblemente de 19 a 25 nucleótidos, más preferiblemente de 19 a 23 nucleótidos, y aún más preferiblemente de 19 a 21 nucleótidos; en el caso del híbrido de ADN/ARN, es preferible que la cadena sentido sea ADN y la cadena antisentido sea ARN, y en el caso de la quimera de ADN/ARN, es preferible que una porción en el lado hacia 5' del polinucleótido bicatenario sea ARN. Un polinucleótido de este tipo puede prepararse para tener cualquier secuencia según un método químico de síntesis conocido *per se*.

Con respecto a la molécula diana es preferible, por ejemplo, una molécula que pueda inhibir la secreción de todo el constituyente de molécula de las matrices extracelulares juntos, y los ejemplos de una molécula de este tipo incluyen, pero no se limitan a, HSP47. Se divulga HSP47 o una secuencia homóloga de genes de la misma como, por ejemplo, n.º de registro de GenBank AB010273 (humano), X60676 (ratón) o M69246 (rata, gp46).

Los ejemplos preferidos del material que se transporta por el portador de fármacos de la presente invención incluyen un ARNip, un híbrido de ADN/ARN o polinucleótido de quimera y un ácido nucleico antisentido, que selecciona como diana HSP47.

Los ejemplos de un material que se administra por el portador de fármacos de la presente invención incluyen un fármaco para inhibir la fibrosis tales como, por ejemplo, G-CSF (documento WO 2005/082402), una proteína similar a trombomodulina (documento JP, A, 2002-371006) y oligosacárido de sulfato de queratán (documento JP, A, 11-269076).

El material o cuerpo que se administra por el portador de fármacos de la presente invención puede o no marcarse. El marcaje es útil a nivel de pruebas e investigación, en particular, ya que puede monitorizarse la viabilidad del transporte o un aumento o disminución de las células estrelladas. Puede seleccionarse un marcador de los conocidos por un experto en la técnica; por ejemplo, cualquier isótopo radiactivo, un material que puede unirse a un material que va a marcarse (por ejemplo, un anticuerpo), un material fluorescente, un fluoróforo, un material quimioluminiscente y una enzima.

La presente invención también se refiere a un medicamento para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, conteniendo el medicamento el portador de fármacos y el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas, y se refiere al uso del portador de fármacos en la producción de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas. El trastorno relacionado con células estrelladas al que se hace referencia en este documento significa un trastorno en el que las células estrelladas se implican directa o indirectamente en el proceso del trastorno, es decir, la aparición, empeoramiento, mejora, remisión, cura, etc. del trastorno, y los ejemplos de los mismos incluyen trastornos hepáticos tales como hepatitis, en particular hepatitis crónica, fibrosis hepática, cirrosis hepática, y trastornos pancreáticos tales como pancreatitis, en particular pancreatitis crónica, fibrosis pancreática. Además, según informes recientes, debido a que las células estrelladas están presentes en las cuerdas vocales (por ejemplo, Fuja T J *et al.*, Cell Tissue Res. 2005; 322(3): 417-24), los trastornos mencionados anteriormente incluyen trastornos de las cuerdas vocales y la laringe tales como fibrosis de cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea.

En el medicamento de la presente invención, el portador de fármacos puede incluir un fármaco en su interior, que va a unirse al exterior de una sustancia que contiene fármacos, o va a mezclarse con un fármaco siempre que el derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A incluido en el portador de fármacos se exponga al menos de manera parcial en el exterior de la preparación antes de que alcance las células estrelladas como muy tarde. Por tanto, dependiendo de la vía de administración o la manera en la que se libera el fármaco, el medicamento puede cubrirse con un material apropiado, tal como, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material que se desintegra a lo largo del tiempo, o puede incorporarse en un sistema de liberación de fármacos apropiado.

El medicamento de la presente invención puede administrarse a través de diversos tipos de vía, incluidas las vías oral y parenteral; los ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosa, percutánea, intranasal, intraperitoneal, intrapulmonar e intrauterina, y el medicamento puede prepararse en una forma apropiada para cada vía de administración. Tal forma y método de preparación pueden emplear cualquier forma y método conocidos, según sea apropiado (por ejemplo, "Hyoujun Yakuzai" (Standard Pharmaceuticals), Ed. Y. Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003, etc.).

Los ejemplos de formas 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 adecuadas para administración parenteral incluyen inyecciones tales como disolución inyectable, suspensión inyectable, emulsión inyectable y una inyección de tipo de preparación en el sitio. La formulación para administración parenteral puede estar en forma de una disolución o suspensión estéril isotónica acuosa o no acuosa.

El portador de fármacos o el medicamento de la presente invención puede suministrarse en cualquier configuración, pero desde el punto de vista de la estabilidad en almacenamiento, se proporciona preferiblemente en una configuración que permita la preparación en el sitio, por ejemplo, en una configuración que permita a un médico y/o un farmacéutico, una enfermera u otro personal paramédico prepararlo en el lugar del tratamiento médico o en las proximidades del mismo. En este caso, el portador de fármacos o el medicamento de la presente invención se proporciona como uno o más envases que contienen al menos un componente esencial del mismo, y se prepara antes de su uso, por ejemplo, en un plazo de 24 horas, preferiblemente en un plazo de 3 horas, y más preferiblemente inmediatamente antes de su uso. Cuando se lleva a cabo la preparación, puede usarse un reactivo, un disolvente, un equipo de preparación, etc., que normalmente están disponibles en un lugar de preparación, según corresponda.

Por tanto, la presente invención incluye un portador de fármacos o kit de preparación de medicamento que contiene uno o más envases que contienen uno o más de un constituyente del portador de fármacos, un derivado de retinoides y/o un análogo de vitamina A, y/o un fármaco, y también incluye un componente esencial para el portador de fármacos o el medicamento proporcionado en forma de un kit de este tipo. El kit de la presente invención puede contener, además de lo descrito anteriormente, una descripción, etc. en la que se describe el método de preparación o el método de administración para el portador de fármacos y el medicamento de la presente invención. Además, el kit de la presente invención puede contener todos los componentes para completar el portador de fármacos o el medicamento de la presente invención, pero no necesita necesariamente contener todos los componentes. Por tanto, el kit de la presente invención no necesita contener un reactivo o un disolvente que está disponible normalmente en el lugar del tratamiento médico, una instalación experimental, etc., tal como, por ejemplo, agua estéril, solución salina o una disolución de glucosa.

La presente invención se refiere además a un método para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, incluyendo el método administrar una cantidad eficaz del medicamento a un sujeto que lo necesita. La cantidad eficaz referida en este documento es una cantidad que suprime la aparición del trastorno diana, reduce los síntomas del mismo o previene la progresión del mismo, y es preferiblemente una cantidad que previene la aparición del trastorno diana o cura el trastorno diana. Es también preferiblemente una cantidad que no produce efectos adversos que excede el beneficio del sitio de administración. Una cantidad de este tipo puede determinarse como apropiada mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas, etc. o mediante una prueba animal modelo como un ratón, una rata, un perro o un cerdo, y dichos métodos de prueba son bien conocidos por un experto en la técnica.

La dosificación del medicamento administrado mediante el método de la presente invención depende del tipo de fármaco usado o del tipo de derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A y, por ejemplo, cuando se usa un ARNip para HSP47 como el fármaco, el peso del fármaco es, por ejemplo, de 0,01 a 45 mg/kg/día, preferiblemente de 0,1 a 30 mg/kg/día, más preferiblemente de 1 a 20 mg/kg/día, y lo más preferiblemente de 4 a 6 mg/kg/día. Cuando se usa vitamina A como derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A, la vitamina A se administra normalmente a una dosificación de 10 a 20 mg/kg/día. El derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A contenido en el portador de fármacos y la dosificación del fármaco usado en el método de la presente invención o bien se conocen por un experto en la técnica o bien se determinan como sea apropiado por la prueba mencionada anteriormente, etc.

Puede determinarse una dosificación específica de un medicamento administrado en el método de la presente invención teniendo en cuenta diversos estados de un sujeto que requiere tratamiento, por ejemplo, la gravedad de los síntomas, estados generales de salud del sujeto, edad, peso, sexo del sujeto, dieta, el momento y la frecuencia de la administración, un medicamento usado en combinación, el grado de respuesta al tratamiento y el cumplimiento del tratamiento, y puede ser diferente de la dosificación típica mencionada anteriormente, pero en tal caso, estos métodos se incluyen todavía en el alcance de la presente invención.

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

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

En el método de 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 invención, el sujeto puede estar sano o afectado por algún trastorno, y en el caso del tratamiento de un trastorno que se pretende, el sujeto típicamente significa un sujeto afectado por el trastorno o que tiene un riesgo de verse afectado.

Además, el término "tratamiento" incluye todo tipo de intervención profiláctica y/o terapéutica médicamente aceptable

con el propósito de la cura, remisión temporal, prevención, etc. de un trastorno. Por ejemplo, cuando el trastorno es fibrosis hepática, el término "tratamiento" incluye la intervención médicamente aceptable con diversos propósitos, incluyendo retrasar o detener la progresión de la fibrosis, la regresión o la desaparición de las lesiones, la prevención del inicio de la fibrosis o la prevención de la recaída.

La presente invención también se refiere a un método para administrar un fármaco a células estrelladas usando el portador de fármacos. Este método incluye, pero no se limita a, una etapa de soportar una sustancia que va a administrarse sobre el portador de fármacos, y una etapa de administrar o añadir el portador de fármacos que porta la sustancia que va a administrarse a un organismo o medio vivo que contiene células estrelladas, tal como, por ejemplo, un medio de cultivo. Estas etapas pueden lograrse según sea apropiado según cualquier método conocido, el método descrito en la presente memoria descriptiva, etc. Este método de administración puede combinarse con otro método de administración, por ejemplo, otro método de administración en el que un órgano en el que están presentes células estrelladas es la diana, etc.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos solo pretenden explicar la presente invención, y el alcance de la presente invención no se limita por los valores numéricos y procedimientos específicos mostrados en los ejemplos.

Ejemplo 1 Preparación de ARNip para gp46

Entre las secuencias óptimas para el reconocimiento de ARNip en la selección como diana de una secuencia de bases de HSP47, que es una chaperona molecular común para colágenos (tipos I a IV), se prepararon las secuencias A y B según un programa de diseño de oligo ARNip de iGENE Therapeutics, Inc. La secuencia C se preparó buscando en Internet usando el software siRNA Target Finder (http://www.ambion.com/techlib/misc/ARNip_finder.html) de Ambion, Inc. y seleccionado 19 secuencias de bases que se convertirían en una diana para gp46 de rata (homólogo de HSP47 humana, n.º de registro de GenBank M69246). Cuando se llevó a cabo el diseño, se tuvo cuidado de que 1) iniciar en de 75 a 100 bases hacia 3' desde el codón de inicio, 2) posicionar el primer dímero AA y 3) asegurarse que el contenido de GC era del 30% al 70%. En este ejemplo, se prepararon los ARNip que tenían las siguientes secuencias.

A: GUUCCACCAUAAGAUGGUAGACAAC (ARNip de cadena de dirección directa de 25 bases que se inicia en la posición 757^a en la secuencia, SEQ ID NO:1)

B: CCACAAGUUUUUAUAUCCAAUCUAGC (ARNip de cadena de dirección directa de 25 bases que se inicia en la posición 1626^a en la secuencia, SEQ ID NO:2)

C: GAAACCUGUAGAGGCCGCA (ARNip de cadena de dirección directa de 19 bases que se inicia en la posición 64^a en la secuencia, SEQ ID NO:3)

Ejemplo 2 Inhibición de la expresión de gp46 por ARNip preparado

Las células de riñón de rata normales (células NRK), que tenían gp46 de rata y eran fibroblastos que producían colágeno, se transfectaron con ARNip de 0,1 nM a 50 nM y se cultivaron durante de 12 a 48 horas (figura 1). La cantidad de expresión de gp46 se verificó mediante el método de inmunotransferencia de tipo Western (figuras 2 a 4, la banda superior corresponde a gp46, la banda inferior corresponde al control de actina). Todos los ARNip inhibieron la expresión de la proteína gp46 de manera notable en comparación con un vehículo (figura 2). En el experimento a continuación, se usó la secuencia A de ARNip, que mostró el efecto más fuerte. La inhibición por ARNip dependía de la concentración (figura 3); la expresión de la proteína por gp46 se inhibió aproximadamente en un 90% por ARNip 50 nM a las 48 horas (figura 4).

Ejemplo 3 Inhibición de síntesis de colágeno por ARNip preparado

Para examinar la cantidad de colágeno sintetizado, se añadió ³H-prolina al sobrenadante de cultivo de fibroblastos de rata (células NRK) en las condiciones mencionadas anteriormente (concentración de ARNip 50 nM, tiempo 48 horas), y después de la transfección, se examinó la cantidad de ³H en la proteína secretada (figura 5). La cantidad de colágeno sintetizado se calculó a partir de la razón de proteína secretada en el sobrenadante con respecto a proteína degradada por colagenasa cuando se cultivan fibroblastos transfectados con ARNip de gp46 en presencia de ³H-prolina según un informe de Peterkofsky *et al.* (Peterkofsky *et al.*, Biochemistry. 16 de marzo de 1971; 10 (6): 988-94).

[Ecuación 1]

razón de síntesis de colágeno =

$$\frac{\text{fracción sensible a colagenasa} \times 100}{(5,4 \times \text{fracción insensible a colagenasa} + \text{fracción sensible a colagenasa})}$$

La razón de síntesis de colágeno en fibroblastos de rata disminuyó en aproximadamente el 40% en comparación con un grupo de control (figura 6).

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

Se preparó una emulsión (VA-Lip-GFP) mezclando el plásmido de expresión de GFP y la VA encapsulada en liposomas formada mezclando el 10% de VA y liposoma, y después se administró por vía intraportal a una rata, se recogió y fijó tejido hepático. La emulsión se preparó suponiendo que la cantidad de plasma para una rata de 200 g era de aproximadamente 10 ml, y ajustando las concentraciones de VA y GFP en sangre portal a 10 μ M. Específicamente, se disolvieron en primer lugar 25 mg de todo trans-retinol (VA) en 87 μ l de DMSO para dar una disolución madre de 100 mM. Se mezclaron 1 μ l de esta disolución madre de VA con 10 μ l de lipofectamina y 179 μ l de PBS, se añadieron además 10 μ g de plásmido de expresión GFP al mismo para proporcionar un total de 200 μ l, y la mezcla se agitó con vórtex durante 3 minutos para dar VA-Lip-GFP. Se abrió el abdomen de una rata SD y se inyectó lentamente el VA-Lip-GFP en una vena porta periférica. 48 horas después de la inyección, se recogió tejido hepático. Dado que, en comparación con otras células hepáticas, la desmina del filamento intermedio se expresa específicamente en células estrelladas hepáticas (HSC), cuando el tejido hepático fijado se tiñó con el anticuerpo anti-desmina marcado con Alexa Fluor 568 y se examinó una imagen de doble fluorescencia con GFP, se confirmó que GFP se expresó dentro de las células estrelladas hepáticas (HSC) (figura 7). Para los controles no tratados y un grupo al que se le administró el vector plasmídico de expresión de GFP solo, no se observó expresión en células estrelladas hepáticas de rata, pero en un grupo al que se le administró VA-Lip-GFP, se observó expresión de GFP específicamente en células estrelladas.

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

De la misma manera que en el ejemplo 4, excepto que se usó ARNip de gp46 marcado con FITC en lugar del plásmido de expresión GFP, se preparó una emulsión (VA-Lip-ARNip de gp46 (FITC)) que contenía liposoma encapsulado con VA y ARNip de gp46 marcado con FITC, y se administró por vía intraportal a una rata SD (10 μ g como la cantidad de ARNip/200 μ l). 48 horas después de la administración, se recogió tejido hepático, se tiñó α SMA (actina del músculo liso), que en comparación con otras células hepáticas se expresa específicamente en HSC, con el anticuerpo anti- α SMA marcado con Alexa Fluor 568, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y una imagen de fluorescencia se examinó mediante un microscopio confocal de barrido con láser (LSM). Tal como se muestra en el lado izquierdo de la figura 8, en un grupo al que se le administró VA-Lip-ARNip de gp46 (FITC), se observó un gran número de células que emitían tanto fluorescencia verde debido a FITC como fluorescencia roja debido a Alexa Fluor 568, y cuando se llevó a cabo un análisis cuantitativo mediante el software NIH Image (se contó el número de células seleccionando 10 campos de una fotografía de microscopio de fluorescencia $\times$ 1000), la eficacia de transfección fue del 77,6% (promedio de 10 campos). Por otro lado, en un grupo al que se le administró Lip-ARNip de gp46 (FITC) que no contenía VA, la eficacia de transfección fue un valor bajo de 14,0% y, además, se observó transfección en células distintas de células estrelladas al 3,0% (lado derecho de la figura 8). Se ha encontrado a partir de los resultados anteriores que la eficacia de transfección en células estrelladas se aumenta de manera notable al incluir VA.

Ejemplo 6 Inhibición de la expresión de gp46 por VA-Lip-ARNip de gp46

Con respecto a otra sección del tejido recogido en el ejemplo 5, la gp46 se tiñó con el anticuerpo anti-HSP47 marcado con Alexa Fluor 568 y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI, y se examinó una imagen de fluorescencia con un microscopio confocal de barrido con láser. Tal como se muestra en la figura 9, se observó que en un grupo al que se le administró VA-Lip-ARNip de gp46, la expresión de gp46, que puede observarse como una fluorescencia roja (lado derecho en la figura), se redujo de manera notable en comparación con un grupo de control al que se le administró VA-Lip-ARNip aleatorio que contenía ARNip aleatorio, que no era específico de gp46 (lado izquierdo en la figura). La tasa de inhibición de la expresión en relación con un promedio de 6 campos del grupo de control fue del 75%, que fue extremadamente alta, cuando se examinó el número de células negativas para gp46 seleccionando 10 campos cualquiera de una fotografía de microscopio de fluorescencia $\times$ 1000 usando el software NIH Image de la misma manera que en el ejemplo 7.

Ejemplo 7 Tratamiento de rata LC (administración intraportal 1)

Según un informe de Jezequel *et al.* (Jezequel A M *et al.*, J Hepatol. Octubre de 1987; 5 (2): 174-81), se preparó una rata modelo LC usando dimetilnitrosamina (DMN) (figura 10). Específicamente, se administró una dosis de 1 ml/kg de dimetilnitrosamina al 1% (DMN) (administración intraperitoneal) a una rata SD (macho) de 5 semanas de edad 3 días seguidos por semana. Tal como ya se informó, se observó un aumento en la fibra a partir de la 2ª semana, y en la 4ª semana esto se acompañó de los hallazgos de fibrosis marcada, destrucción de la estructura del lobulillo hepático y se observó la formación de nódulos regenerativos (figura 11). Luego, mediante el mismo método que en el ejemplo 4, se preparó una emulsión (VA-Lip-ARNip de gp46) formulando el ARNip de gp46 como un liposoma y mezclándolo con VA al 10%, y se administró. La administración de VA-Lip- ARNip de gp46 se inició en la tercera semana, momento en el cual se observó suficiente fibrosis, y la evaluación se llevó a cabo en las semanas cuarta y quinta. Ya que se confirmó en el ejemplo 2 que los efectos se observaron durante hasta 48 horas *in vitro*, la administración se llevó a cabo dos veces por semana (figura 11). La cantidad administrada se determinó según un informe en el que se inyectó directamente ARNip (McCaffery *et al.*, Nature. 4 de julio de 2002; 418 (6893): 38-9), y fue de 40 µg como la cantidad total de ARNip. Desde la tinción con azan del hígado después de la administración de ARNip, en la cuarta semana no hubo diferencia aparente entre un grupo al que se había administrado solución salina, un grupo al que se había administrado ARNip (aleatorio) y un grupo al que se le administró ARNip (gp46), pero en la quinta semana se observó una disminución en la cantidad de fibra para el grupo al que se había administrado ARNip de gp46 (figura 12). Para analizar cuantitativamente la cantidad de fibra, se extrajo una porción sin teñir usando el software NIH Image, se midió su área (figura 13) y se observó una disminución significativa en el área de colágeno para el grupo al que se había administrado ARNip de gp46 (figura 14). Además, para evaluar el grado de fibrosis usando otra medida, la cantidad de hidroxiprolina, que es un indicador de fibrosis, se midió cuantitativamente mediante un método convencional. Específicamente, después de que se hidrolizaron 20 mg de tejido hepático liofilizado con HCl durante 24 horas, el líquido de reacción se centrifugó y el sobrenadante se trató con un reactivo tal como la disolución de Ehrlich y se centrifugó. Se recuperó el sobrenadante y se midió la cantidad de hidroxiprolina en el tejido hepático midiendo la absorbancia a 560 nm (Hepatology noviembre de 1998; vol. 28: 1247-1252). Tal como se muestra en la figura 15, en el grupo al que se había administrado ARNip de gp46, la cantidad de hidroxiprolina se volvió muy pequeña.

Ejemplo 8 Tratamiento de rata LC (administración intraportal 2)

Además, para examinar un cambio en la tasa de supervivencia mediante la administración del medicamento de la presente invención, según un método de Qi Z *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA. 2 de marzo de 1999; 96 (5): 2345-9.), se preparó una rata modelo LC usando dimetilnitrosamina (DMN) en una cantidad que se aumentó en un 20% sobre la cantidad normal. En este modelo, se realizaron un total de 4 administraciones intraportales en las semanas primera y segunda. Los detalles de administración fueron: PBS, Lip-ARNip de gp46, VA-Lip-ARNip aleatorio y VA-Lip-ARNip de gp46 (n = 7 para cada grupo). Después de la 3ª semana, todos los controles (el grupo al que se había administrado PBS, el grupo al que se había administrado VA-Lip-ARNip aleatorio y el grupo al que se había administrado el Lip-ARNip de gp46) estaban muertos, pero 6 de 7 sobrevivieron para el grupo al que se había administrado VA-Lip-ARNip de gp46 (figura 16). Además, en la tinción con azan del hígado en el día 21º, se observó una disminución aparente en la cantidad de fibra para el grupo al que se había administrado ARNip de gp46 (figura 17).

Ejemplo 9 Tratamiento de rata LC (administración intraportal 3)

En otro experimento, la administración intraportal se llevó a cabo a partir de la 3ª semana para ratas modelo LC (DMN al 1% 1 mg/kg administrado por vía intraperitoneal 3 veces a la semana) preparadas según el método de Qi Z *et al.* y un método por Ueki T *et al.* (Nat Med. Febrero de 1999; 5 (2): 226-30), tal como se muestra en la tabla a continuación (n = 6 para cada grupo). Se añadió PBS a cada sustancia que va a administrarse para obtener un volumen total de 200 µl, y la frecuencia de administración fue una vez a la semana.

[Tabla 1]

Grupo de tratamiento	Contenido de la administración	Dosificación
9-1	VA	VA 200 nmol
9-2	Lip-ARNip de gp46	liposoma 100 nmol, ARNip de gp46 20 µg
9-3	VA-Lip-ARNip aleatorio	VA 200 nmol, liposoma 100 nmol, ARNip aleatorio 20 µg
9-4	VA-Lip-ARNip de gp46	VA 200 nmol, liposoma 100 nmol, ARNip de gp46 20 µg

A partir de los resultados, en los grupos distintos del grupo al que se había administrado el medicamento de la presente invención (grupo de tratamiento 9-4), las 6 ratas estaban muertas en el día 45º después de iniciar la administración de DMN, pero en el grupo en el que se había administrado el medicamento de la presente invención,

todos los individuos, excepto un caso, que murió en el día 36°, sobrevivieron durante más de 70 días después de iniciar la administración de DMN (figura 18). Para los individuos muertos, la cantidad de fibra hepática se analizó cuantitativamente basándose en el área de colágeno de la misma manera que en el ejemplo 7, y el aumento de la cantidad de fibra hepática se inhibió de manera notable mediante la administración de VA-Lip-ARNip de gp46 (figura 19).

Ejemplo 10 Tratamiento de rata LC (administración intravenosa)

La administración intravenosa se llevó a cabo a partir de la 3ª semana para ratas modelo LC (DMN al 1% 1 µg/P.C. (g) administrado por vía intraperitoneal 3 veces a la semana) preparadas de la misma manera que en el ejemplo 9, tal como se muestra en la tabla a continuación (n = 6 para cada grupo). Se añadió PBS a cada sustancia que va a administrarse para obtener un volumen total de 200 µl. El período de administración fue hasta la muerte, excepto que fue hasta la séptima semana para el grupo 10-4 y la sexta semana para el grupo 10-10.

[Tabla 2]

Grupo de tratamiento	Contenido de la administración	Dosificación	Frecuencia de administración
10-1	VA	VA 200 nmol	Dos veces a la semana
10-2	Lip-ARNip de gp46	liposoma 100 nmol, ARNip de gp46 100 µg	
10-3	VA-Lip- ARNip aleatorio	VA 200 nmol, liposoma 100 nmol, ARNip aleatorio 100 µg	
10-4	VA-Lip-ARNip de gp46	VA 200 nmol, liposoma 100 nmol, ARNip de gp46 100 µg	
10-5	PBS	200 µl	Tres veces a la semana
10-6	VA	VA 200 nmol	
10-7	VA-Lip	VA 200 nmol, liposoma 100 nmol	
10-8	Lip-ARNip de gp46	liposoma 100 nmol, ARNip de gp46 150 µg	
10-9	VA-Lip-ARNip aleatorio	VA 200 nmol, liposoma 100 nmol, ARNip aleatorio 150 µg	
10-10	VA-Lip-ARNip de gp46	VA 200 nmol, liposoma 100 nmol, ARNip de gp46 150 µg	

A partir de los resultados, en los grupos distintos de los grupos a los que se les había administrado el medicamento de la presente invención (grupos de tratamiento 10-4 y 10-10), las 6 ratas habían muerto en el día 45° después de iniciar la administración de DMN, pero en los grupos a los que se les había administrado el medicamento de la presente invención, todos los individuos, excepto un caso en el que dos ratas murieron el día 45° en el grupo de tratamiento 10-4, sobrevivieron durante más de 70 días después de iniciar la administración de DMN (figuras 20 y 21). Para los individuos muertos, la cantidad de fibra hepática se analizó cuantitativamente de la misma manera que en el ejemplo 7, y el aumento en la cantidad de fibra hepática se inhibió de manera notable mediante la administración de VA-Lip-ARNip de gp46 (figura 22).

Los resultados mencionados anteriormente muestran que el medicamento de la presente invención es extremadamente eficaz para la prevención y el tratamiento de fibrosis, en la que se implican células estrelladas.

Ejemplo 11 Mejora de los resultados por RBP (proteína de unión a retinol)

La influencia de RBP en la eficacia de transfección de VA-Lip-gp46siRNA se examinó usando LI90, que es una línea celular derivada de células estrelladas hepáticas humanas. Se añadieron 100 nM de VA-Lip-ARNip de gp46 (FITC) preparado en el ejemplo 5, junto con diversas concentraciones (es decir, el 0, el 0,1, el 0,5, el 1, el 2, el 4 o el 10%) de FBS (suero bovino fetal), a LI90 durante el cultivo y se incubaron durante 48 horas, se observó una imagen de fluorescencia mediante LSM, y la cantidad de ARNip incorporado en células individuales se analizó cuantitativamente mediante FACS. El FBS contenía aproximadamente 0,7 mg/dl de RBP. Tal como se muestra en la figura 23, FBS (RBP) dio un aumento dependiente de la concentración en la cantidad de transfección de ARNip. Posteriormente, se añadieron 100 nM de VA-Lip-ARNip de gp46 (FITC) y FBS al 4%, junto con 10 µg (21,476 nmol) de anticuerpo anti-RBP, a LI90 durante el cultivo, y la eficacia de transfección de ARNip se evaluó de la misma manera. Tal como se muestra en la figura 24, el aumento en la cantidad de transfección por RBP se redujo de

manera notable mediante la adición de anticuerpo anti-RBP. Los resultados mencionados anteriormente muestran que RBP es eficaz en el potenciamiento adicional de la transfección del medicamento de la presente invención.

Lista de secuencias

5	<110> Hokkaido Renomedix Institute Inc.	
	<120> Portador de fármacos y kit de portador de fármacos para inhibir la fibrosis	
10	<130> Documento PCT2264SI	
	<150> Documento JP2004-382791	
	<151> 22-12-2004	
15	<160> 3	
	<170> PatentIn versión 3.1	
20	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> ARNip para gp46 de rata	
	<400> 1	
30	guuccaccau aagaugguag acaac	25
	<210> 2	
	<211> 25	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> ARNip para gp46 de rata	
	<400> 2	
40	ccacaaguuu uauauccaau cuagc	25
	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> ARN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip para gp46 de rata	
50	<400> 3	
	gaaaccugua gaggccgca	19

REIVINDICACIONES

1. Medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con células estrelladas que comprende un portador de fármacos que comprende un derivado de retinoides y/o un análogo de vitamina A como componente, y un fármaco de diagnóstico y/o terapéutico,
5 en el que el trastorno relacionado con células estrelladas se selecciona del grupo que consiste en fibrosis, hepatitis y pancreatitis, y
10 en el que el derivado de retinoides y/o el análogo de vitamina A se selecciona(n) de vitamina A, tretinoína, adapaleno, o palmitato de retinol y fenretinida (4-HPR), y, uniéndose a o incluyéndose en el portador de fármacos, permite el transporte específico del fármaco a células estrelladas.
2. Medicamento para su uso según la reivindicación 1, en el que el portador de fármacos está en una
15 cualquiera de forma de micela polimérica, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera.
3. Medicamento para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el derivado de retinoides y/o el análogo de vitamina A se une(n) a un constituyente del portador.
- 20 4. Medicamento para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, cirrosis hepática, fibrosis pancreática, fibrosis de cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea.
- 25 5. Kit para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con células estrelladas, comprendiendo el kit uno o más envases que contienen uno o más de un fármaco de diagnóstico y/o terapéutico, un derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A, y un constituyente del portador de fármacos distinto del derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A,
30 en el que el trastorno relacionado con células estrelladas se selecciona del grupo que consiste en fibrosis, hepatitis y pancreatitis, y
en el que el derivado de retinoides y/o análogo de vitamina A se selecciona(n) de vitamina A, tretinoína, adapaleno, o palmitato de retinol y fenretinida (4-HPR) y, uniéndose a o incluyéndose en el portador de fármacos, permite el transporte específico del fármaco a células estrelladas.
35

Fig. 1

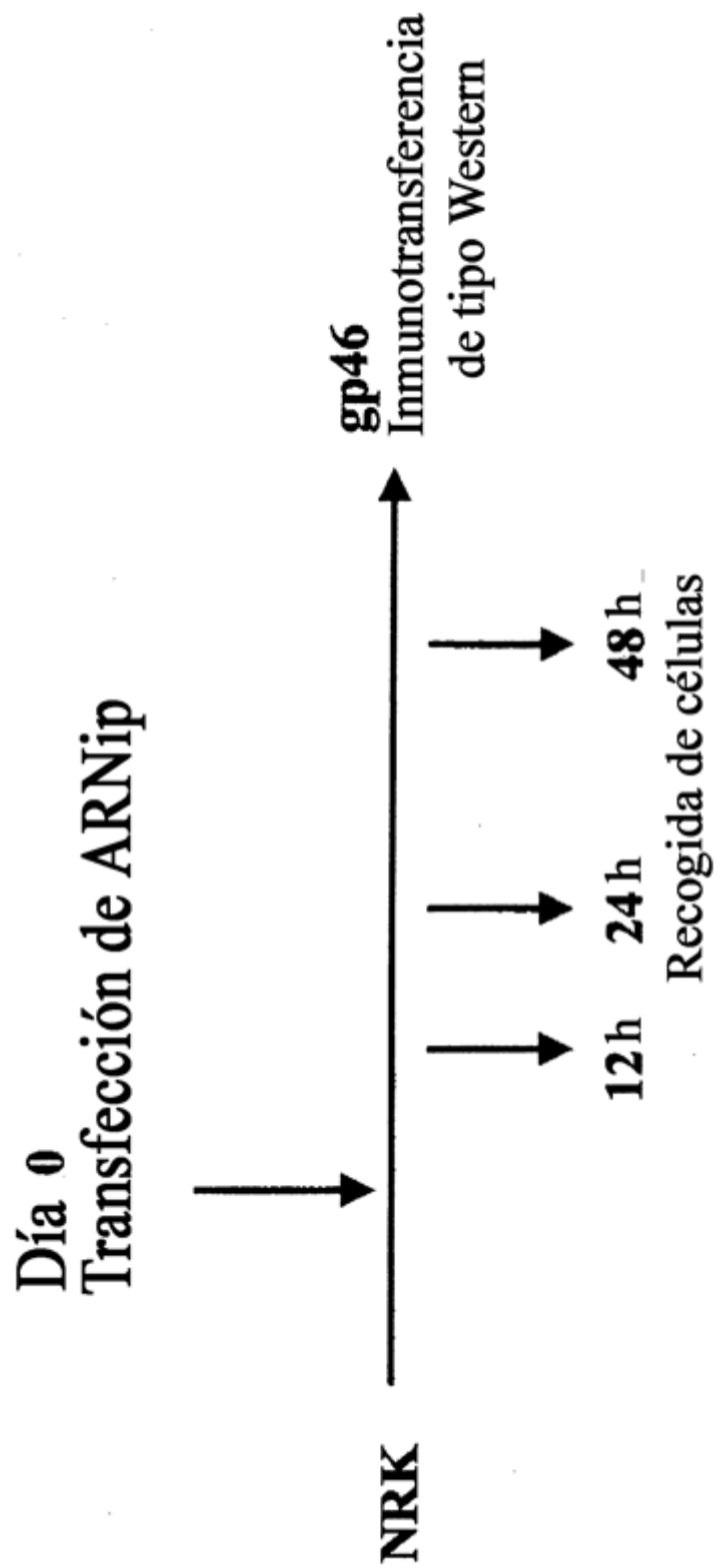


Fig. 2

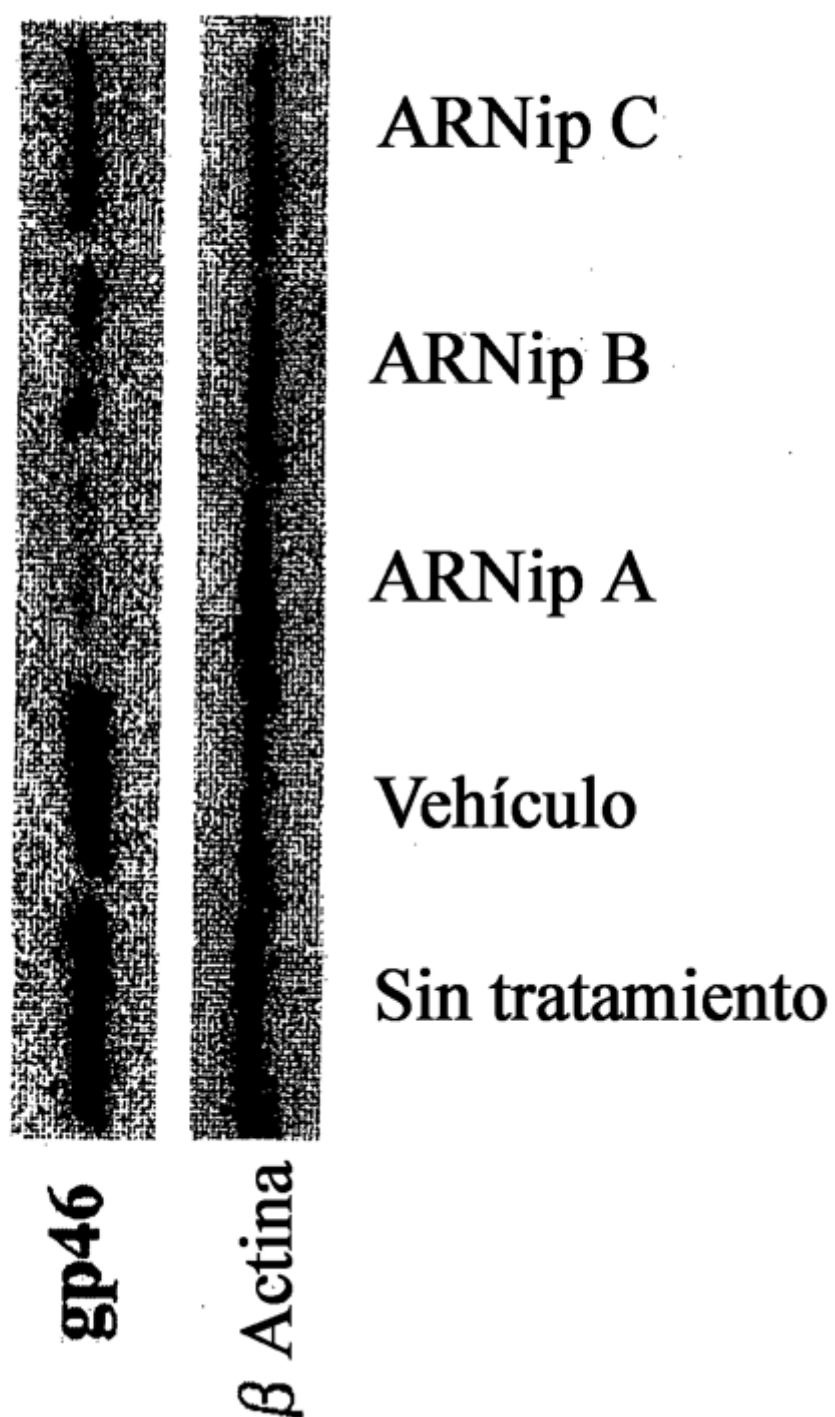


Fig. 3

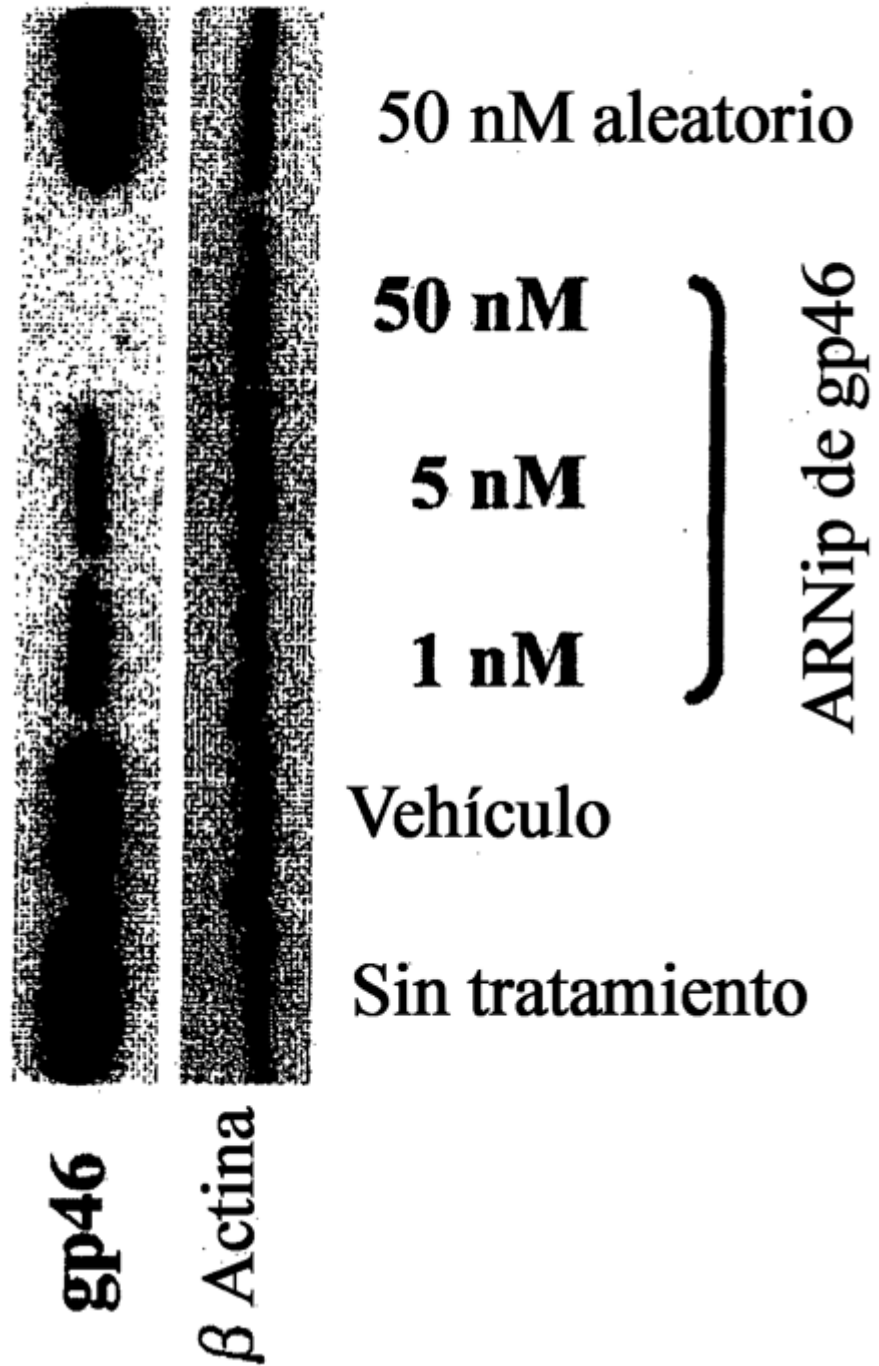


Fig. 4

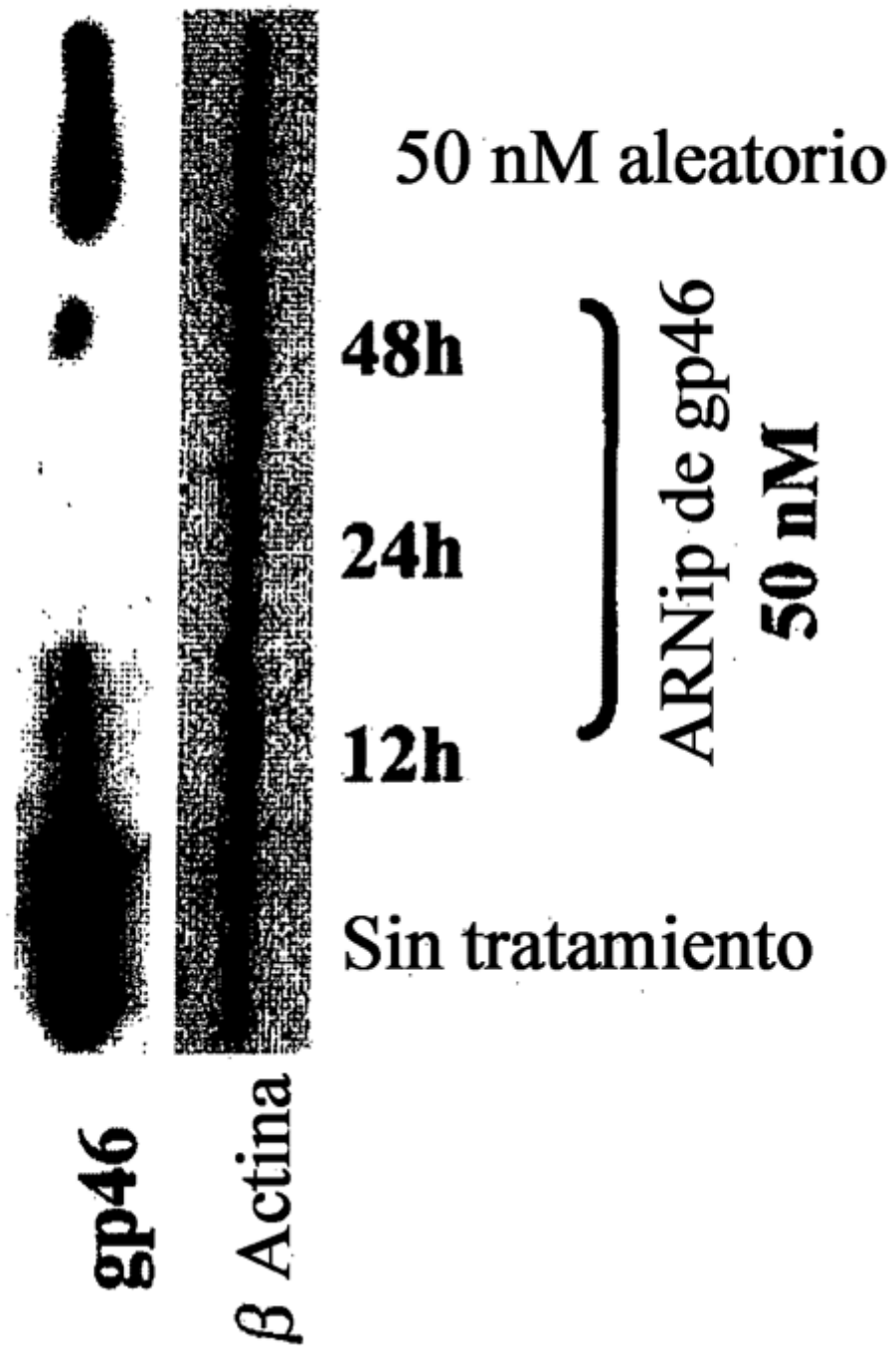


Fig. 5

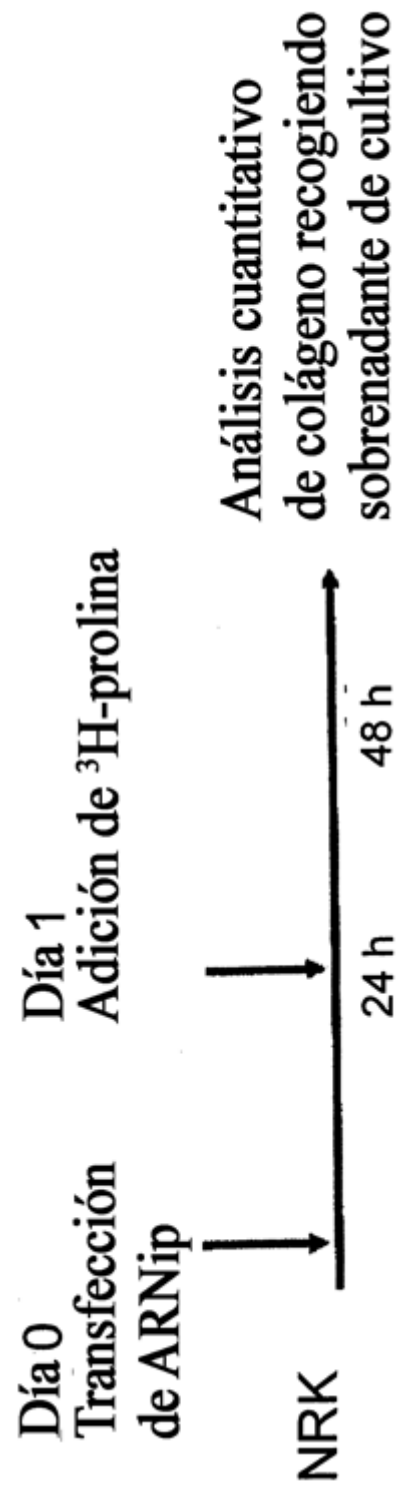
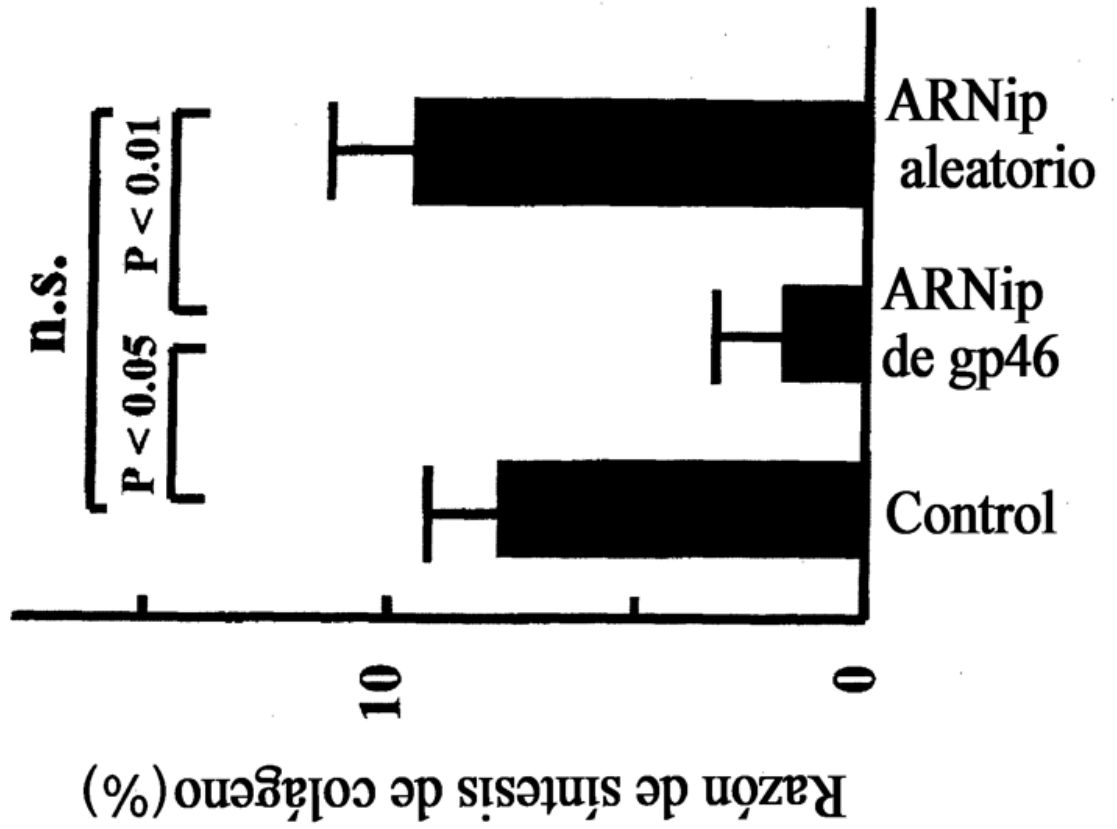
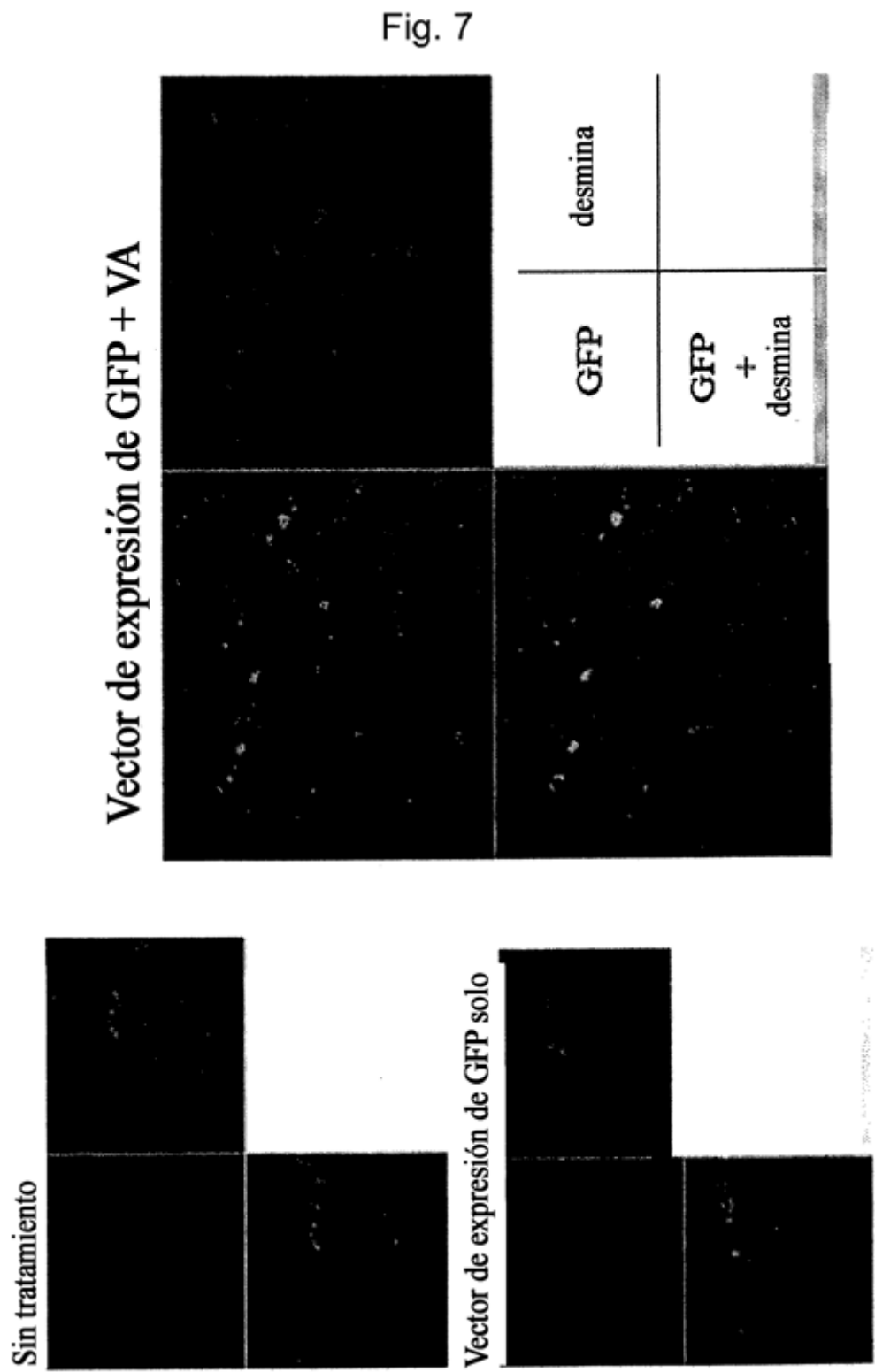
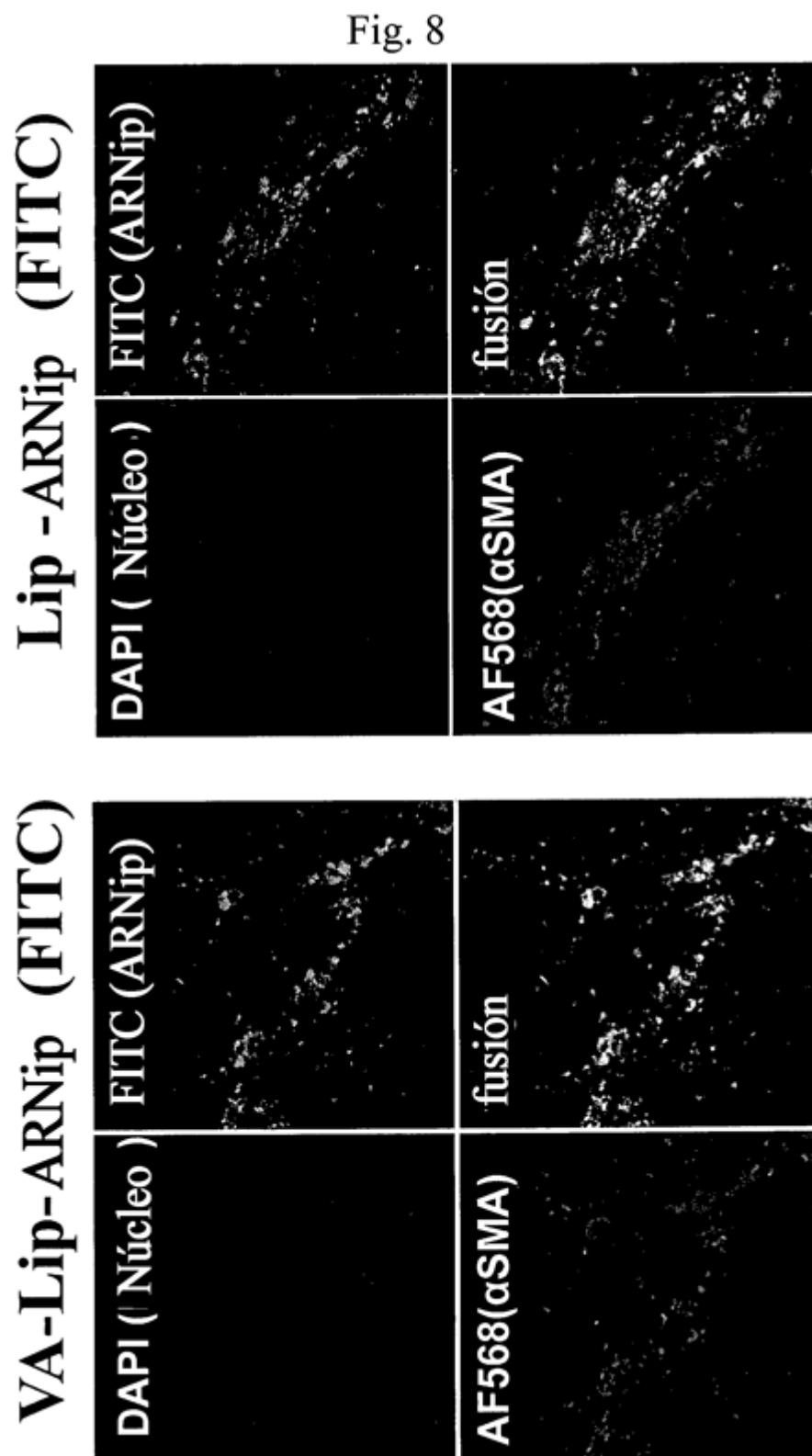


Fig. 6







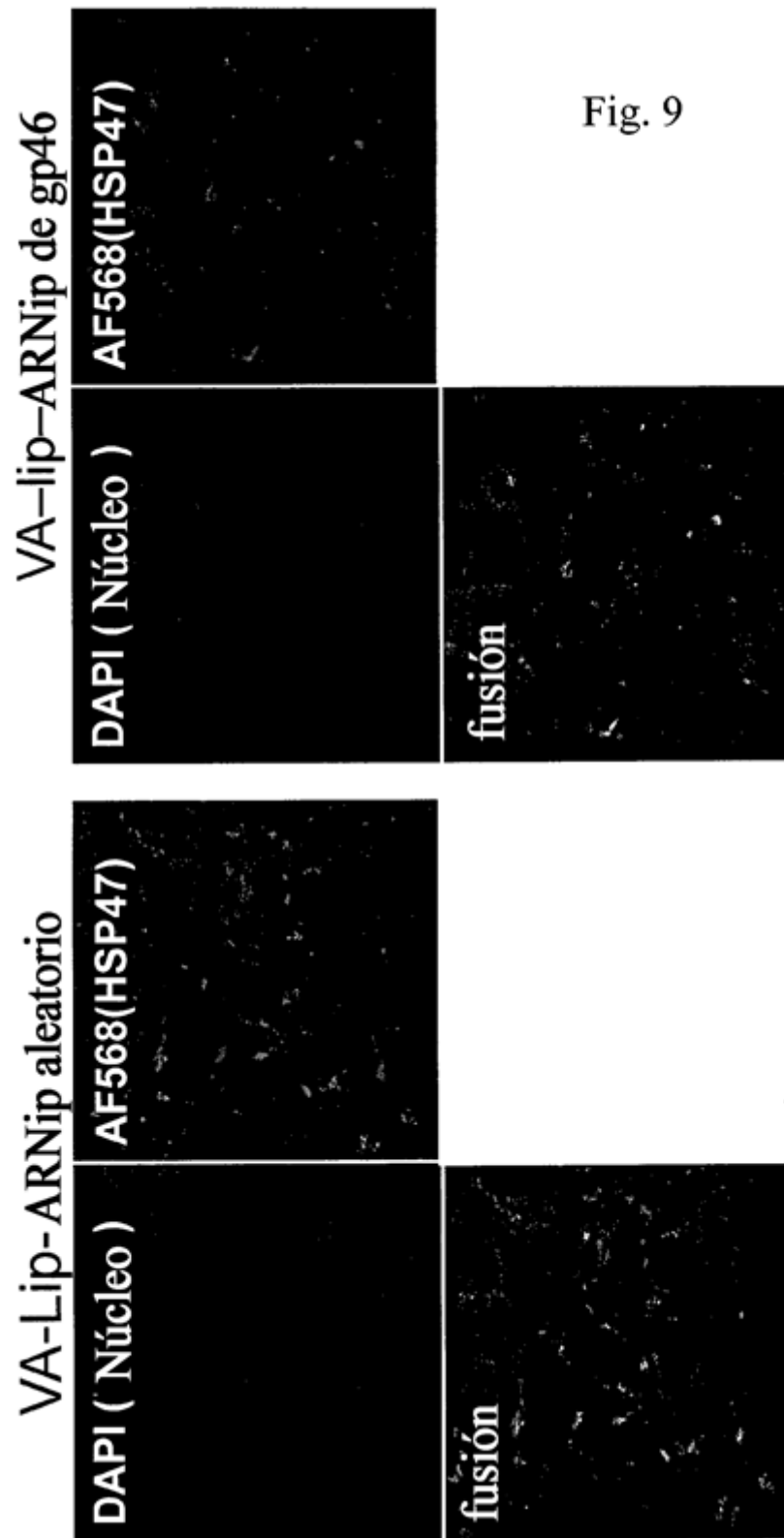


Fig. 10

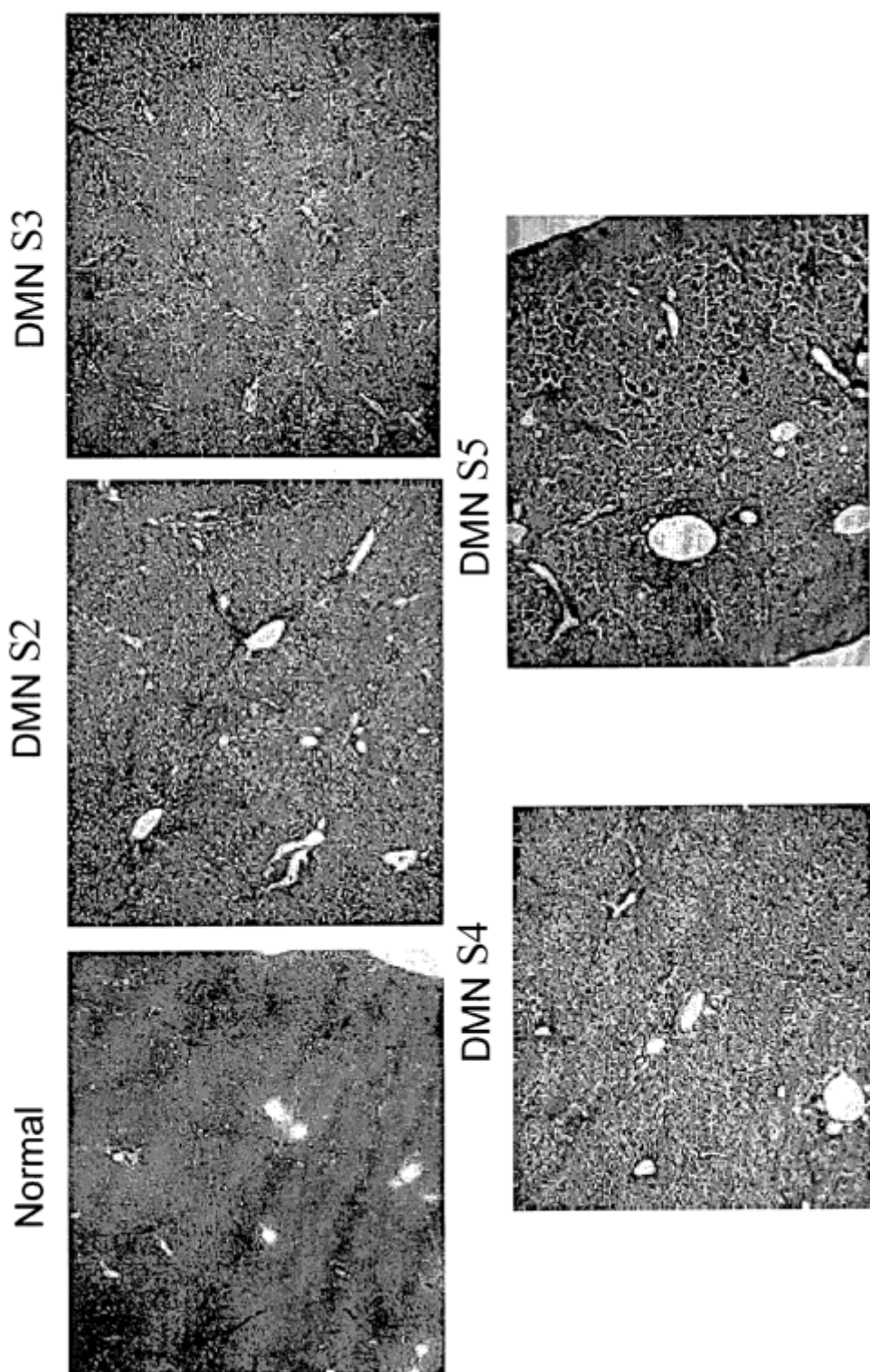
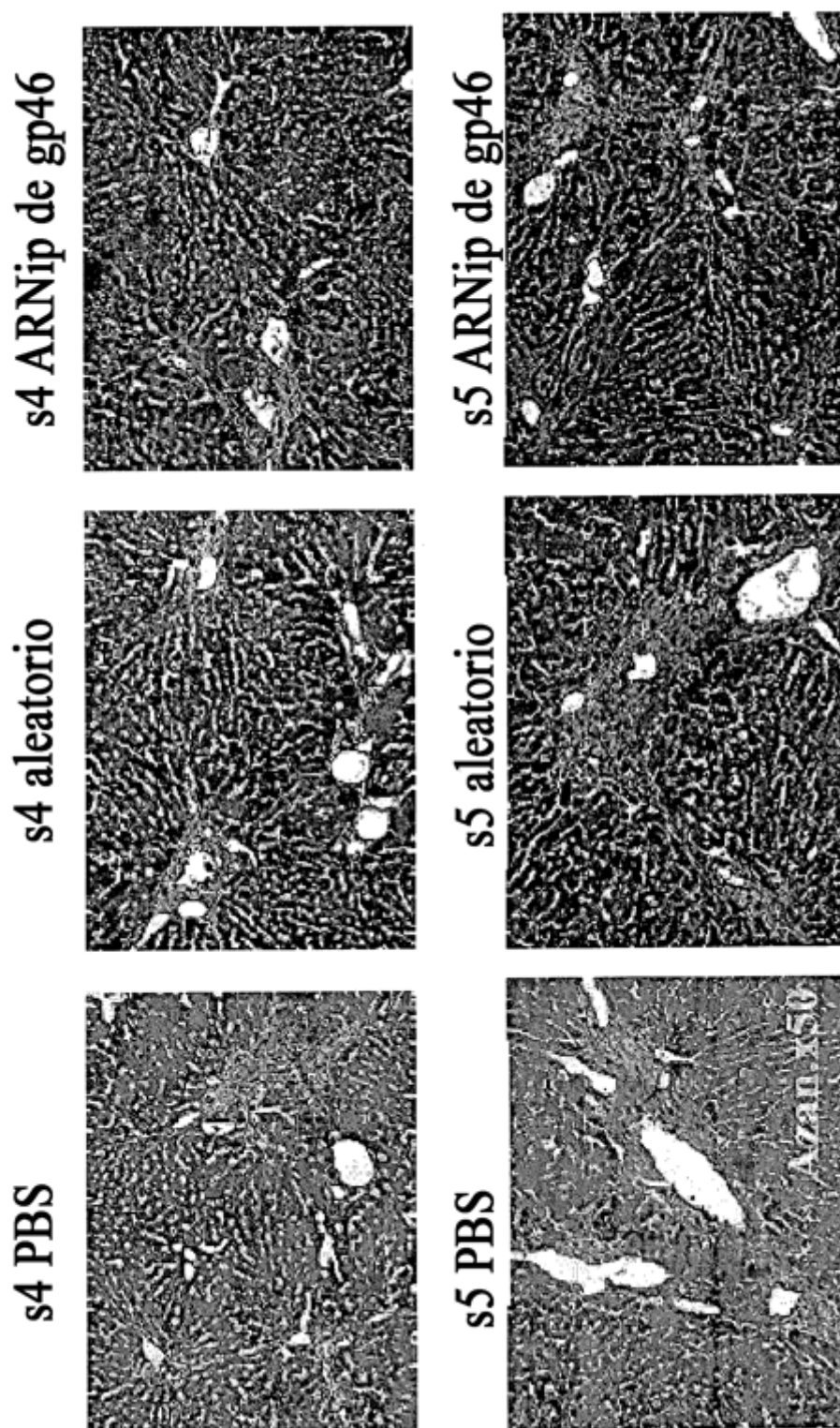


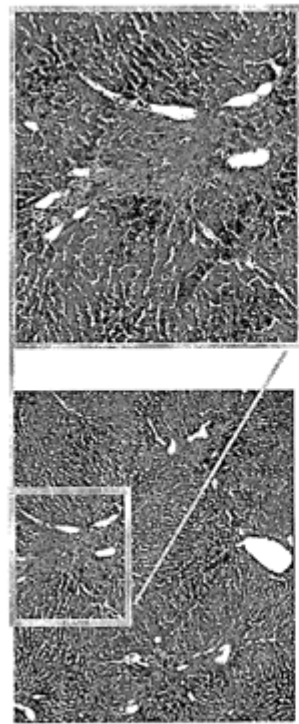
Fig. 11



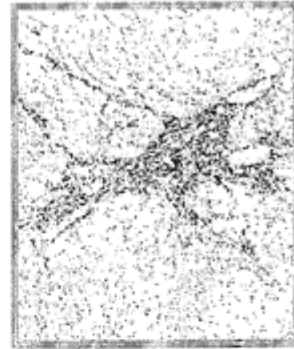
Fig. 12



Tinción con azan, imágenes obtenidas de 6 posiciones aleatorias



Azan.x50 **Azan.x100**



Medido recogiendo el área azul de colágeno
usando el software NIH Image

Fig. 13

Fig. 14

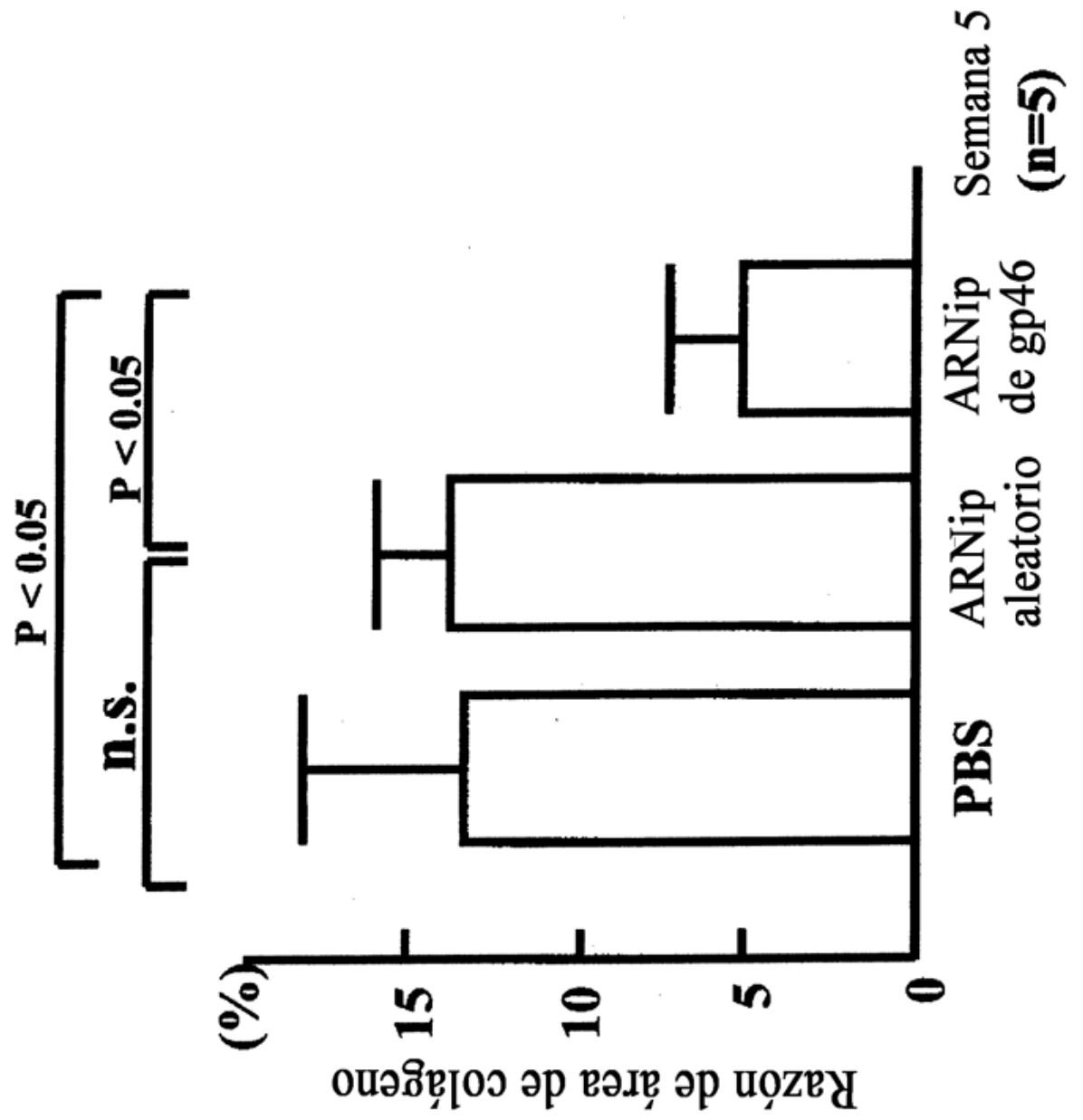


Fig. 15

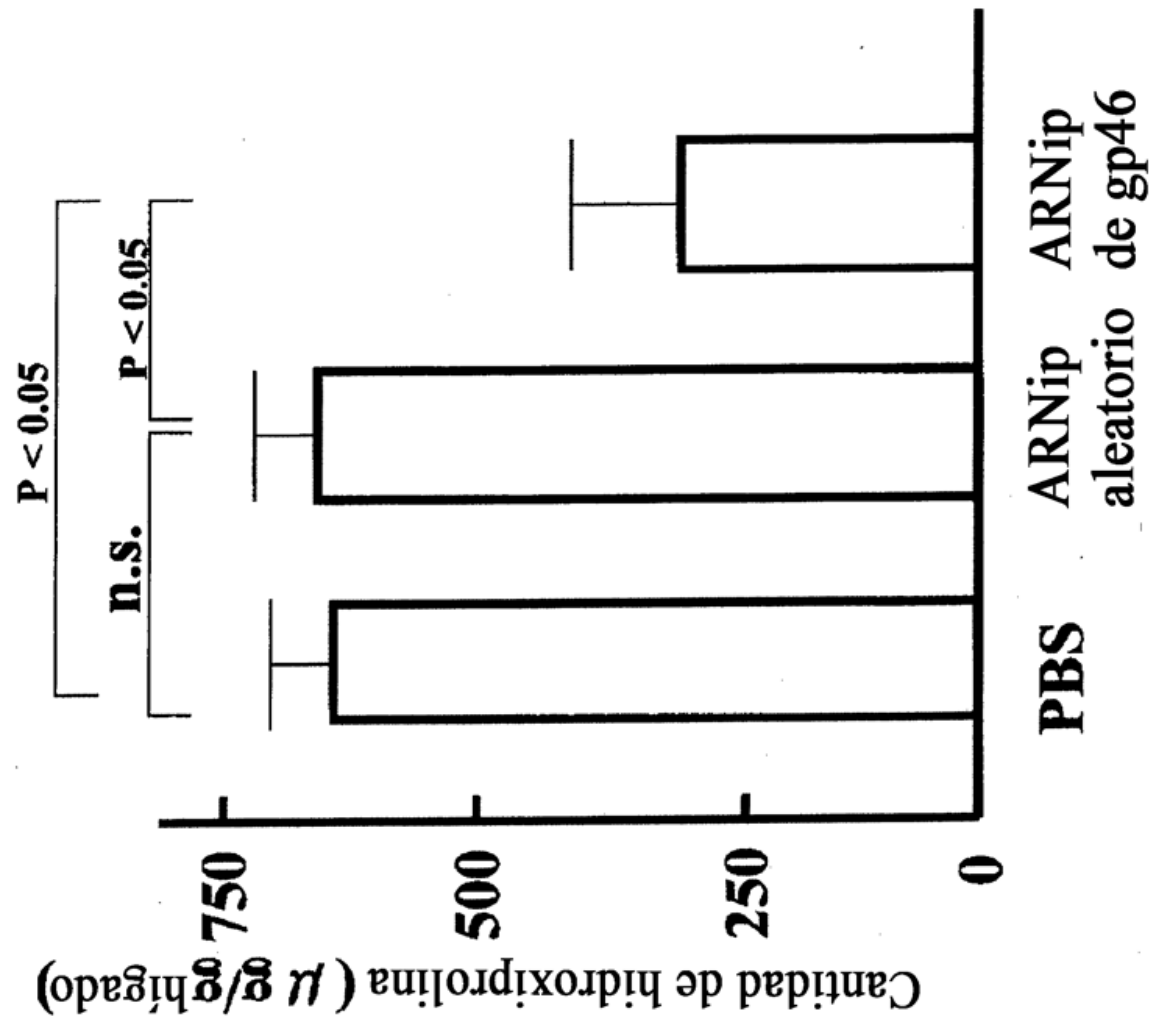


Fig. 16

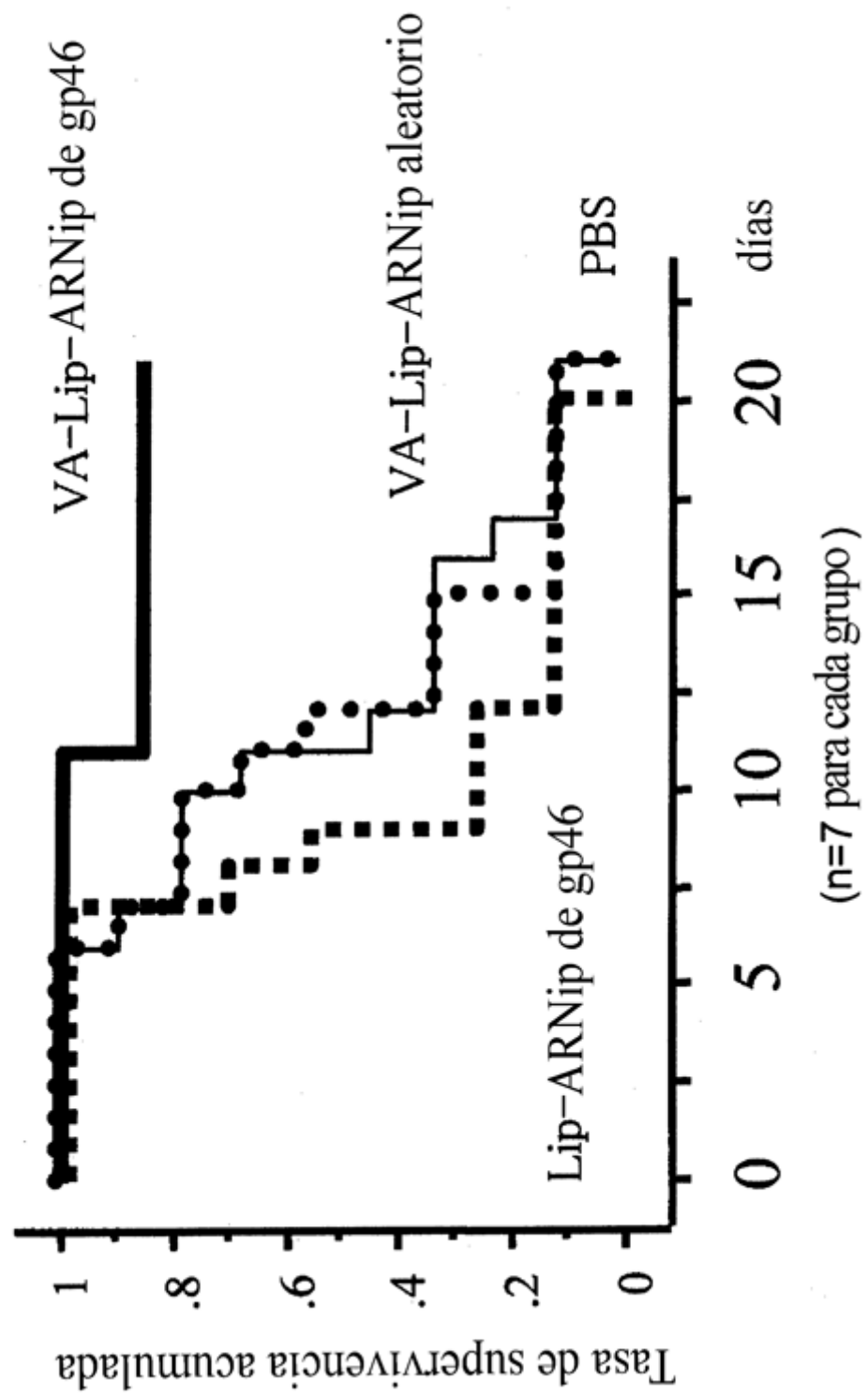


Fig. 17

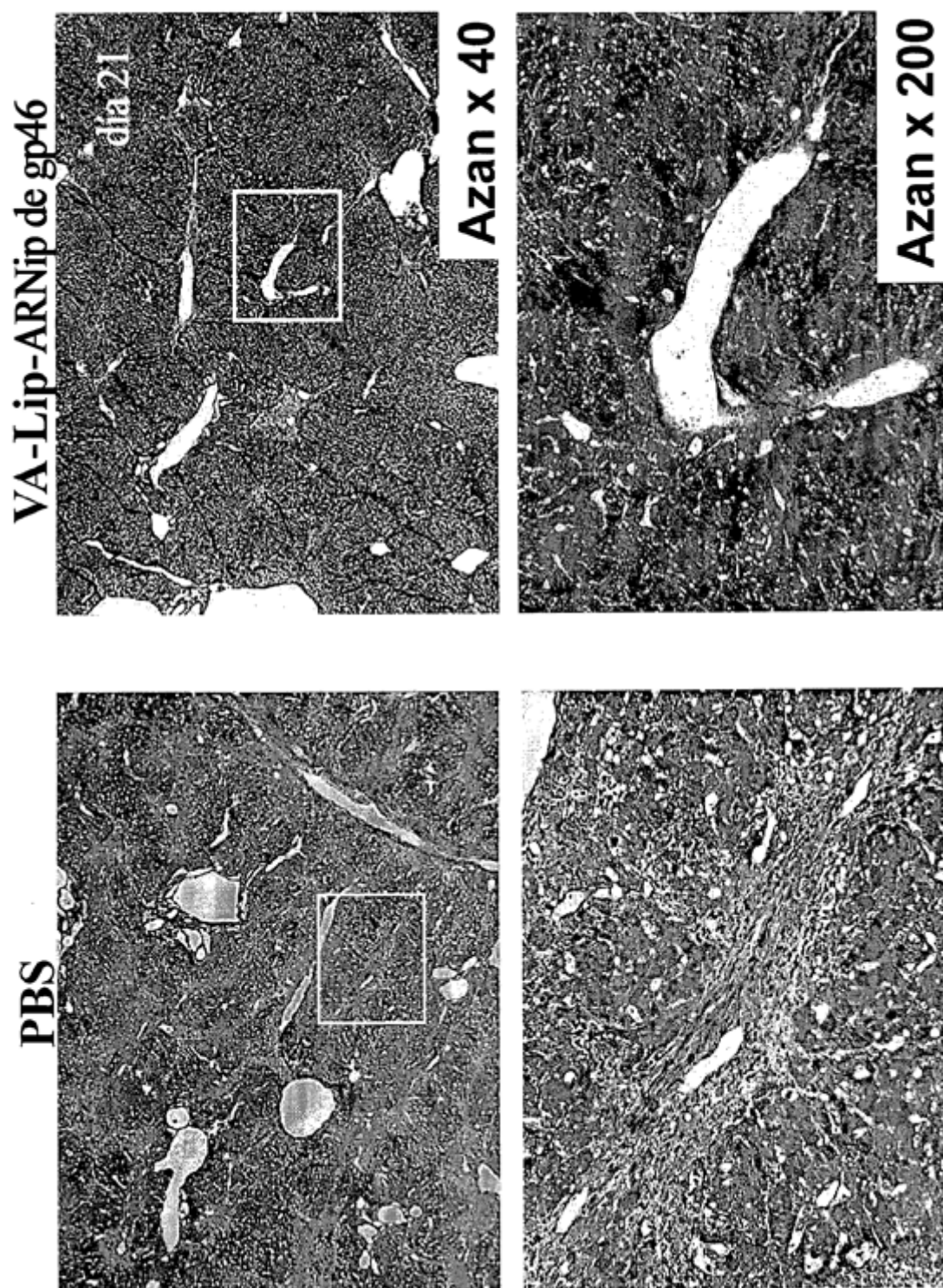
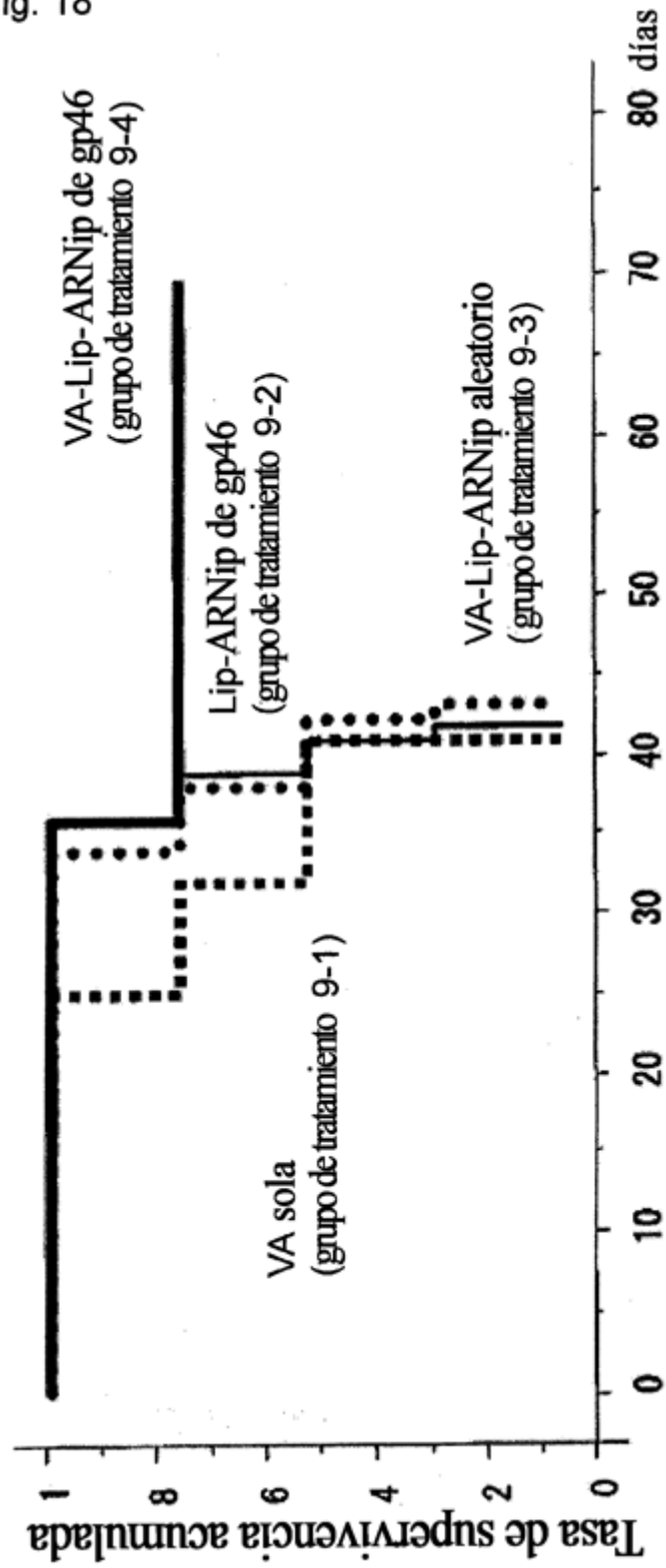
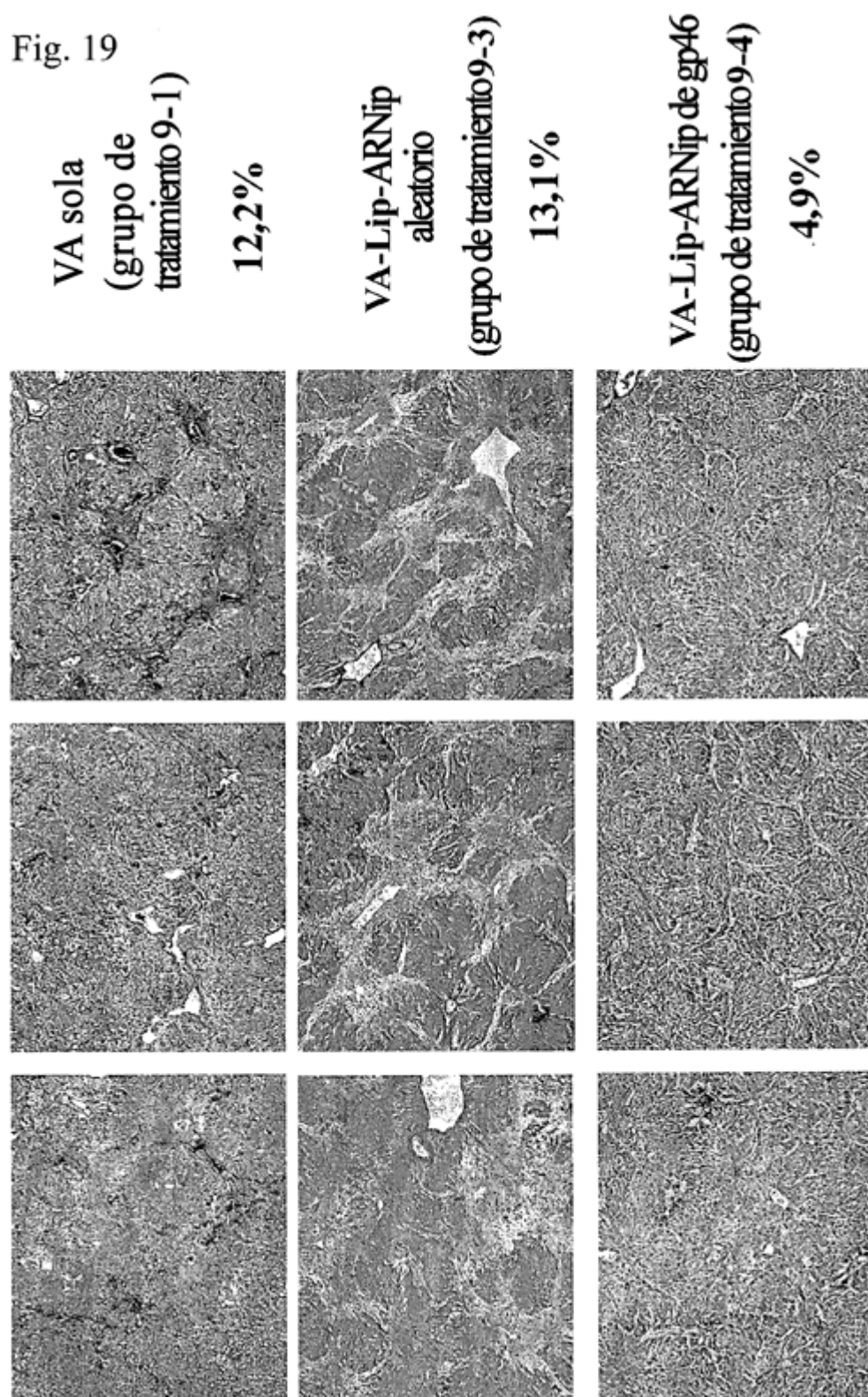


Fig. 18





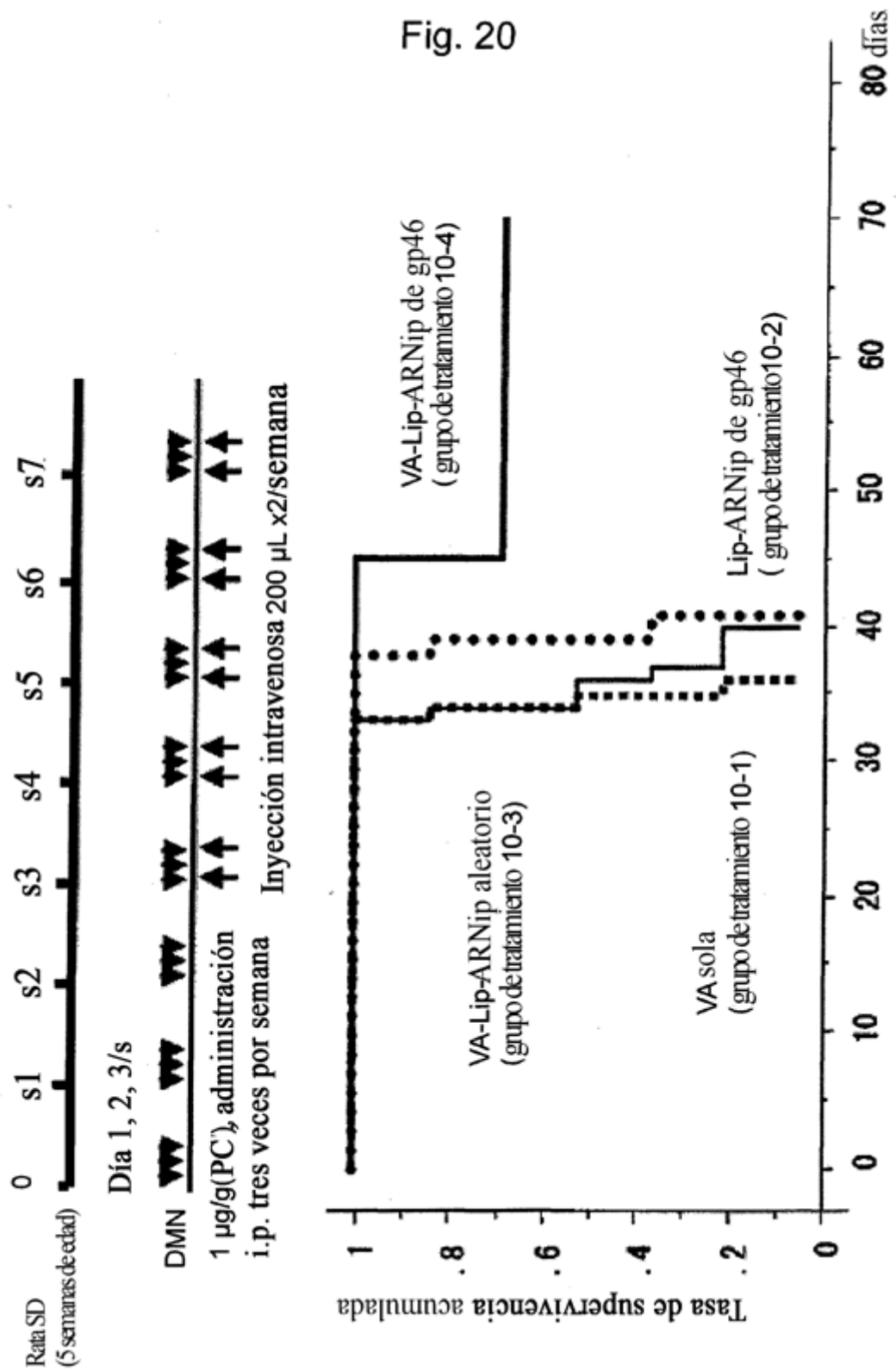
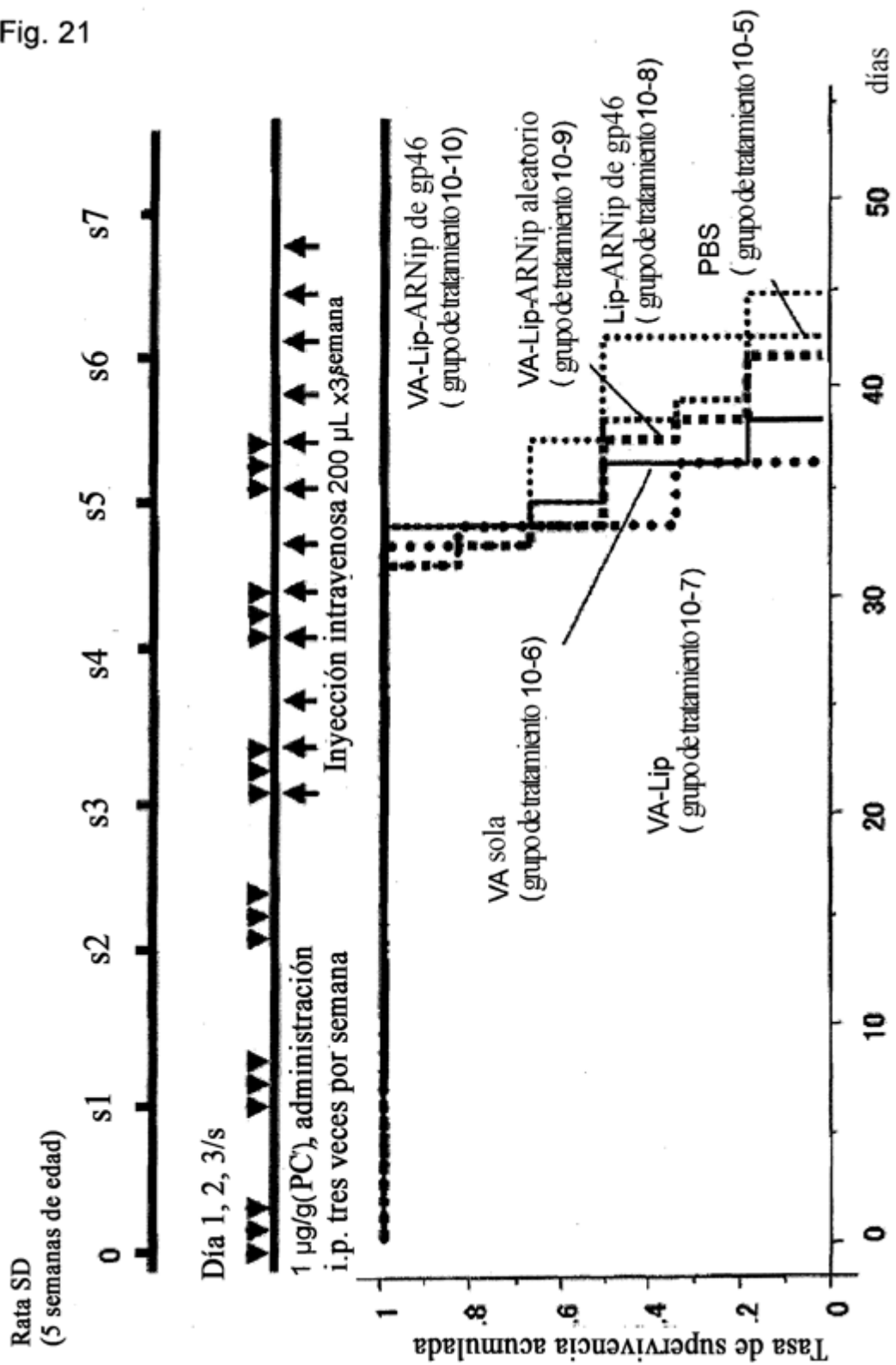


Fig. 21



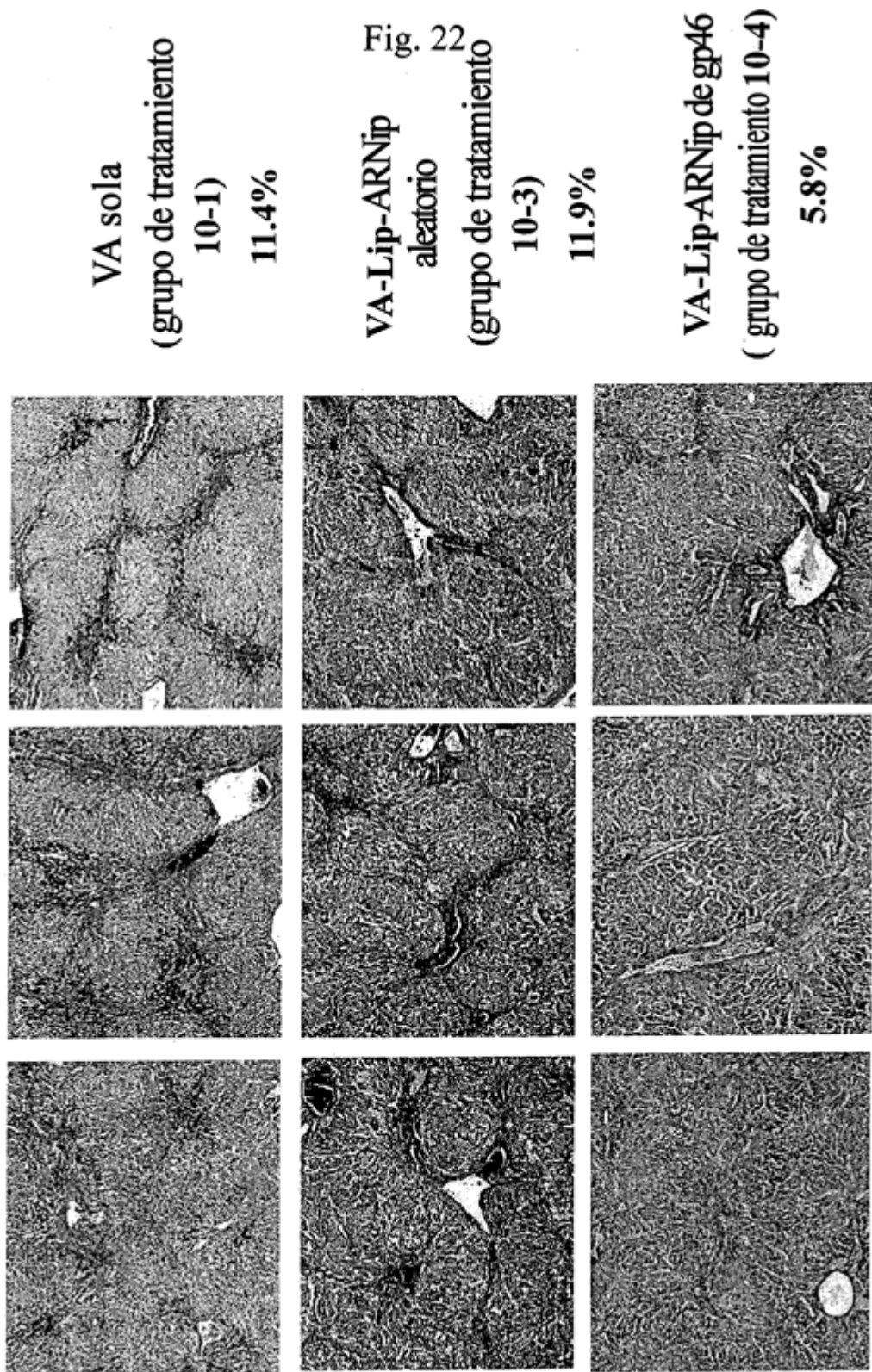


Fig. 23

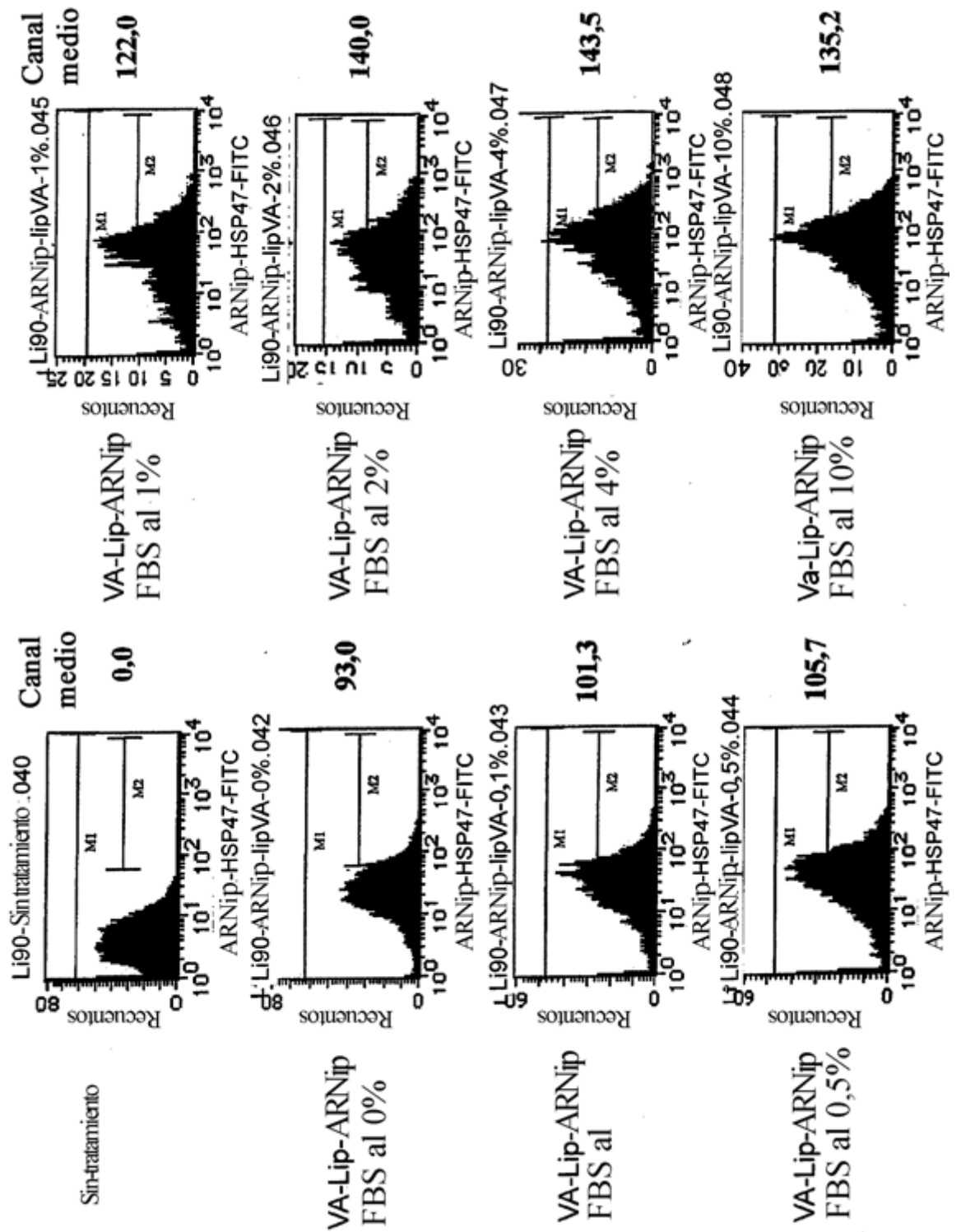


Fig. 24

