

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 673**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)
A61K 9/107	(2006.01)		
A61K 9/50	(2006.01)		
A61K 9/51	(2006.01)		
A61K 31/704	(2006.01)		
A61K 31/713	(2006.01)		
A61K 45/00	(2006.01)		
A61K 47/08	(2006.01)		
A61K 48/00	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2008 PCT/JP2008/056735**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2008 WO08120815**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 08739842 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 2135600**

54 Título: **Agente de direccionamiento para células cancerosas o fibroblastos asociados con cáncer**

30 Prioridad:

30.03.2007 JP 2007091808
04.10.2007 JP 2007261202
17.12.2007 JP 2007324459

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NIITSU, YOSHIRO y
TAKIMOTO, RISHU

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 793 673 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 direccionamiento para células cancerosas o fibroblastos asociados con cáncer

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de cáncer en el que están implicados fibroblastos asociados con cáncer (CAF) y a un kit de preparación para esta composición.

10 **Técnica anterior**

El cáncer es una de las enfermedades más importantes a las que se enfrenta la humanidad, y están realizándose muchos esfuerzos de investigación para tratarla. En el tratamiento del cáncer, en particular en la terapia médica del cáncer, se han desarrollado diversos agentes anticancerosos para suprimir el crecimiento de células cancerosas, y se ha logrado cierto grado de éxito, pero dado que tales fármacos suprimen el crecimiento, no sólo de células cancerosas, sino también de células normales, hay problemas con diversos efectos secundarios tales como náuseas y vómitos, pérdida de cabello, mielosupresión, daño renal y daño a los nervios. Como enfoque para reducir tales efectos secundarios, se han realizado intentos en los últimos años para administrar específicamente un agente anticanceroso a células cancerosas o tejido canceroso. Mediante la administración específica de un agente anticanceroso, no sólo es posible impedir que el agente anticanceroso llegue a las células normales y reducir los efectos secundarios, sino también obtener el beneficio económico de que puede disminuirse la dosis del agente anticanceroso.

Como ejemplo concreto de un método de administración, se han desarrollado técnicas tales como el direccionamiento pasivo en el que se utiliza el efecto EPR (permeabilidad y retención potenciadas) y el direccionamiento activo en el que un fármaco se modifica por un ligando para una molécula de superficie que se expresa específicamente en células cancerosas. Como moléculas que pueden utilizarse en el direccionamiento activo, se han notificado moléculas que se endocitan en las células como resultado de la unión al ligando, tales como por ejemplo, CD19, HER2, un receptor de transferrina, un receptor de folato, un receptor de VIP, EGFR (publicación no de patente 1), RAAG10 (publicación no de patente 1), PIPA (publicación no de patente 2) y KID3 (publicación no de patente 3). Sin embargo, ninguno de los métodos de administración es aún satisfactorio, y ha habido un deseo adicional de desarrollar métodos de administración específicos de células cancerosas.

Además, en la terapia médica del cáncer, partiendo de la idea de que un cáncer puede curarse eliminando las células cancerosas, se han desarrollado y usado diversos agentes anticancerosos dirigidos a las células cancerosas. Sin embargo, tales intentos no siempre pueden lograr resultados satisfactorios debido a los problemas mencionados anteriormente con los efectos secundarios, o a la aparición de fenómenos adicionales tales como la recidiva debido a enfermedad residual mínima, la resistencia de las células tumorales al agente anticanceroso, etc.

Por otro lado, como resultado de investigaciones recientes, ha ido quedando claro gradualmente que el entorno que rodea a un cáncer, por ejemplo, el tejido intersticial que incluye vasos sanguíneos, ECM y fibroblastos, desempeña un papel importante en la aparición y progresión del cáncer. Por ejemplo, Camps *et al.* (véase la publicación no de patente 2) notificó que cuando un ratón desnudo atímico se inoculó con células tumorales que no forman un tumor por sí mismas o para las cuales la tasa de formación de tumor es baja, junto con fibroblastos tumorigénicos, se observó una formación rápida y marcada de un tumor, y Olumi *et al.* (véase la publicación no de patente 3) notificó que cuando se injertaron fibroblastos peritumorales (es decir, CAF) de un paciente con tumor de próstata en un animal atímico, junto con células de próstata humanas, el crecimiento neoplásico de las mismas se aceleró notablemente. Además, se ha aclarado que una sustancia bioactiva tal como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF- β (factor de crecimiento transformante- β), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) o SDF-1 (factor derivado de células del estroma - 1) producida en el intersticio está implicada en tal crecimiento de un tumor (véase la publicación no de patente 4).

A partir de estos hallazgos, se ha puesto de manifiesto la importancia del entorno que rodea a un cáncer, y se han investigado nuevos métodos de tratamiento que, en lugar de a las propias células cancerosas, se dirigen al entorno que las rodea. Entre ellos, los CAF, que secretan diversas sustancias bioactivas y están profundamente implicados en la aparición y progresión del cáncer, han atraído la atención en los últimos años, pero la investigación fundamental al respecto sólo tiene una breve historia de aproximadamente 10 años, y aunque se ha reconocido que algunos de los métodos de tratamiento del cáncer que están dirigidos a sustancias bioactivas secretadas por los CAF tienen cierto grado de efecto, en la situación actual no se reconoce que ninguno tenga efecto como método de tratamiento del cáncer dirigido a los propios CAF (véase la publicación no de patente 4).

60 **Bibliografía**

Publicación de patente 1. Documento JP 2005-532050 A

65 Publicación de patente 2. Documento JP 2006-506071 A

Publicación de patente 3. Documento JP 2007-529197 A

Publicación de patente 4. Documento WO 2006/068232

5 Publicación no de patente 1. Torchilin, AAPS J. 2007; 9(2): E128-47

Publicación no de patente 2. Camps *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87 (1) : 75-9

10 Publicación no de patente 3. Olumi *et al.*, Cancer Res. 1999; 59(19): 5002-11

Publicación no de patente 4. Micke *et al.*, Expert Opin Ther Targets. 2005; 9(6): 1217-33

Divulgación de la invención

15 Problemas que va a resolver la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprende un portador.

20 Medios para resolver los problemas

Mientras se buscaba un método de tratamiento del cáncer nuevo, los presentes inventores descubrieron que todavía no existe un portador que pueda administrar un fármaco específicamente a los CAF, y como resultado de continuar una investigación intensiva para desarrollar tal portador, se ha descubierto que un portador que contiene un retinoide como agente de direccionamiento acelera específicamente la administración de fármacos a los CAF. Como resultado de una investigación adicional sobre el portador anterior, se ha descubierto que el portador también acelera específicamente la administración de una sustancia a las células cancerosas, y por tanto se ha llevado a cabo la presente invención.

25 Se sabe que un portador que contiene retinol administra un fármaco a las células estrelladas que almacenan retinol (véase la publicación de patente 4), pero no se sabía hasta ahora que acelera específicamente la administración de un fármaco a células cancerosas o CAF.

Es decir, la presente invención se refiere a las composiciones para su uso en el tratamiento de cáncer en el que están implicados fibroblastos asociados con cáncer tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas.

35 Efectos de la invención

El portador contenido en la composición de la presente invención selecciona como diana específicamente un CAF, y suministra de manera eficaz a un CAF un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF, permitiendo por tanto que se logre un efecto deseado tal como, por ejemplo, la supresión de la actividad o el crecimiento de un CAF curando de ese modo el cáncer, suprimiendo el avance del mismo e impidiendo la aparición del mismo, con la mayor eficacia y los efectos secundarios mínimos.

45 Puesto que la composición anticancerosa de la presente invención se basa en el enfoque completamente nuevo de tratar un cáncer actuando sobre un CAF, puede esperarse eficacia en cánceres para los que un método de tratamiento convencional podría no dar resultados satisfactorios y, además, puede preverse un efecto sinérgico debido al uso combinado con un agente anticanceroso convencional, inhibidor de la angiogénesis, etc.

Además, puesto que el portador contenido en la composición de la presente invención puede administrar específicamente una sustancia a una célula cancerosa y un CAF, puede utilizarse para marcar específicamente una célula cancerosa y un CAF, para transferencia génica, etc., pero tal uso no forma parte de la presente invención.

50 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama fotográfico de células derivadas de tejido canceroso inmunoteñidas con respecto a α -SMA, vimentina y desmina.

La figura 2 es un gráfico que muestra el cambio en el número de células cancerosas cuando se cocultivan células cancerosas y CAF o fibroblastos normales.

60 La figura 3 es un gráfico en el que se compara el porcentaje de introducción de ARNip en los CAF o fibroblastos normales cuando se administra ARNip mediante diversos liposomas a lo largo del tiempo.

La figura 4 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de ARNip en CAF que se han hecho reaccionar con VA-lip-ARNip o lip-ARNip.

65 La figura 5 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de ARNip en CAF y fibroblastos normales que se

han hecho reaccionar con VA-lip-ARNip, lip-ARNip o VA-lip.

La figura 6 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de DNR en CAF que se han hecho reaccionar con VA-lip-DNR o lip-DNR. Los números en el diagrama muestran el tiempo transcurrido (min) desde el comienzo de la reacción. La ampliación es de 200 veces (400 veces para imágenes ampliadas).

La figura 7 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de DNR en fibroblastos normales que se han hecho reaccionar con VA-lip-DNR o lip-DNR. Los números en el diagrama muestran el tiempo transcurrido (min) desde el comienzo de la reacción. La ampliación es de 200 veces.

La figura 8 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de DNR en fibroblastos de piel que se han hecho reaccionar con VA-lip-DNR o lip-DNR. Los números en el diagrama muestran el tiempo transcurrido (min) desde el comienzo de la reacción. La ampliación es de 200 veces.

La figura 9 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de DNR en CAF que se han hecho reaccionar con VA-lip-DNR (izquierda) o lip-DNR (derecha). La ampliación es de 400 veces (800 veces las para imágenes ampliadas).

La figura 10 es un diagrama fotográfico que muestra daunorubicina que emite fluorescencia roja bajo luz de excitación verde (parte superior izquierda), DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) que emite fluorescencia azul bajo luz de excitación UV (parte superior derecha), y una imagen combinada que muestra un color morado (parte inferior).

La figura 11 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de DNR en CAF que o bien no se han tratado (sin tratamiento: parte superior izquierda) o bien se han hecho reaccionar con DaunoXome® (VA-: parte superior derecha), DaunoXome® + retinol (VA+: parte inferior izquierda), o DaunoXome® + ácido retinoico (ácido retinoico +: parte inferior derecha). La ampliación es de 400 veces.

La figura 12 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de DNR en HT-1080 que o bien no se han tratado (sin tratamiento: parte superior izquierda) o bien se han hecho reaccionar con DaunoXome® (VA-: parte superior derecha), DaunoXome® + retinol (VA+: parte inferior izquierda), o DaunoXome® + ácido retinoico (ácido retinoico +: parte inferior derecha). La ampliación es de 400 veces.

La figura 13 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de DNR en HepG2 que o bien no se han tratado (sin tratamiento: parte superior izquierda) o bien se han hecho reaccionar con DaunoXome® (VA-: parte superior derecha), DaunoXome® + retinol (VA+: parte inferior izquierda), o DaunoXome® + ácido retinoico (ácido retinoico +: parte inferior derecha). La ampliación es de 400 veces.

La figura 14 es un gráfico que muestra el resultado de la evaluación de la actividad inhibidora del crecimiento de VA-lip-ARNip hacia CAF o fibroblastos normales. El eje de ordenadas indica el porcentaje de recuento de células viables después del tratamiento cuando el recuento de células viables antes del tratamiento es de 100.

La figura 15 es un gráfico que muestra el resultado de la evaluación de la actividad inhibidora del crecimiento de VA-lip-DNR hacia CAF o fibroblastos normales. El eje de ordenadas indica el porcentaje de recuento de células viables después del tratamiento cuando el recuento de células viables antes del tratamiento es de 100.

La figura 16 es un diagrama fotográfico que muestra el estado de localización intracelular de DNR liposómica (VA-) o DNR liposómica unida a VA (VA+) en la línea celular HT-1080 derivada de fibrosarcoma humano. La sección superior muestra la localización de DNR, la sección inferior muestra células que se han sometido a tinción nuclear con DAPI, y las figuras muestran el tiempo después de la adición.

La figura 17 es un diagrama fotográfico que muestra el estado de localización intracelular de DNR liposómica (VA-) o DNR liposómica unida a VA (VA+) en la línea celular HS913T derivada de fibrosarcoma humano. La sección superior muestra la localización de DNR, la sección inferior muestra células que se han sometido a tinción nuclear con DAPI, y las figuras muestran el tiempo después de la adición.

La figura 18 es un diagrama fotográfico que muestra el estado de localización intracelular de DNR liposómica (VA-) o DNR liposómica unida a VA (VA+) en la línea celular Sw684 derivada de fibrosarcoma humano. La sección superior muestra la localización de DNR, la sección inferior muestra células que se han sometido a tinción nuclear con DAPI, y las figuras muestran el tiempo después de la adición.

La figura 19 es un diagrama fotográfico que muestra el estado de localización intracelular de DNR liposómica (VA (-)) o DNR liposómica unida a VA (VA (+)) en células HT-1080, HS913T, Sw684, Huh7, MCF7 y Saos2 (15 min después de la adición). Blanco indica una imagen microscópica cuando no se añadieron ni DNR liposómica ni DNR liposómica unida a VA.

La figura 20 es un gráfico de la evaluación de la actividad inhibidora del crecimiento de DNR liposómica o DNR liposómica unida a VA hacia las líneas celulares HT-1080, HS913T, y Sw684 derivadas de fibrosarcoma humano.

La figura 21 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de ARNip en el tejido tumoral de un ratón portador de tumor al que se había administrado VA-lip-ARNip o lip-ARNip por vía intravenosa. El lado derecho muestra un individuo al que se ha administrado VA-lip-ARNip, el lado izquierdo muestra un individuo al que se ha administrado lip-ARNip, la parte de arriba muestra una imagen con FAM, y la parte de abajo muestra una imagen combinada con FAM y Cy3. La ampliación es de 200 veces.

La figura 22 es un diagrama fotográfico que muestra la localización de ARNip en el tejido tumoral de un ratón portador de tumor al que se había administrado VA-lip-ARNip por vía intravenosa. La parte superior izquierda muestra una imagen con FAM, la parte superior derecha muestra una imagen con Cy3, la parte inferior izquierda muestra una imagen combinada con FAM y Cy3, y la parte inferior derecha muestra una imagen combinada con FAM, Cy3 y DAPI. La ampliación es de 200 veces.

La figura 23 es un gráfico que muestra los resultados de evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de VA-lip-DNR (administrado dos veces a la semana). El eje de ordenadas indica el volumen de masa tumoral (mm^3), y el eje de abscisas indica el número de días después de empezar el tratamiento.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se explica en detalle a continuación.

En la presente invención, un fibroblasto asociado con cáncer (CAF) significa un fibroblasto positivo para α -SMA (actina de músculo liso) presente en el interior y/o la periferia de una lesión cancerosa. La presencia de un CAF se confirma con respecto a diversos cánceres tales como carcinoma de colon, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de estómago, carcinoma de las vías biliares y carcinoma de células basales.

En la presente invención, si la célula dada es CAF o no, se determina mediante el siguiente método. Es decir, una célula presente en el interior y/o la periferia de la lesión cancerosa se somete a inmunotinción con un anticuerpo marcado para α -SMA, que es un marcador de CAF, por ejemplo, un anticuerpo anti- α -SMA marcado con FITC o un anticuerpo anti- α -SMA marcado con Cy3, y se determina que la molécula detectada mediante α -SMA es un CAF.

El cáncer acompañado por CAF en la presente invención no está limitado particularmente, y los ejemplos del mismo incluyen carcinomas sólidos tales como tumor cerebral, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma esofágico, carcinoma de estómago, carcinoma duodenal, carcinoma apendicular, carcinoma de colon, carcinoma rectal, carcinoma hepático, carcinoma pancreático, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma de las vías biliares, carcinoma anal, carcinoma de riñón, carcinoma ureteral, carcinoma de vejiga, carcinoma de próstata, carcinoma de pene, carcinoma testicular, carcinoma uterino, carcinoma de ovario, carcinoma vulvar, carcinoma vaginal y carcinoma de piel. Además, un CAF normalmente acompaña a un carcinoma, pero siempre que posean propiedades similares, puede acompañar a un tumor sólido maligno distinto de carcinoma, por ejemplo, un sarcoma tal como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangiosarcoma, sarcoma sinovial, condrosarcoma u osteosarcoma, y están incluidos en el alcance de la presente invención.

En una realización de la presente invención, un CAF está presente preferiblemente en sitios distintos del hígado y el páncreas. Por tanto, en esta realización, el CAF está presente, por ejemplo, en cerebro, cabeza y cuello, mama, extremidades, pulmón, corazón, timo, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon), intestino grueso (colon, ciego, apéndice, recto), vesícula biliar, ano, riñón, uréter, vejiga, próstata, pene, testículo, útero, ovario, vulva, vagina, piel, músculo estriado, músculo liso, membrana sinovial, cartílago, hueso, tiroides, glándula suprarrenal, peritoneo, mesenterio, etc.

Un retinoide es un miembro de la clase de compuestos que tienen un esqueleto en el que cuatro unidades isoprenoides están unidas 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 en la presente invención promueve la administración específica de sustancias a una célula cancerosa y un CAF (es decir, la sustancia selecciona como diana estas células). Un retinoide de este tipo no está limitado particularmente, y ejemplos del mismo incluyen derivados de retinoide tales como retinol, retinal, ácido retinoico, un éster de retinol y un ácido graso, un éster de un alcohol alifático y ácido retinoico, etretinato, tretinoína, isotretinoína, adapaleno, acitretina, tazaroteno y palmitato de retinol, y análogos de vitamina A tales como fenretinida (4-HPR) y bexaroteno.

En la presente invención, retinoide tiene el mismo significado que derivado retinoide y/o análogo de vitamina A. Aunque no se ha dilucidado por completo el mecanismo por el cual un retinoide promueve la administración específica de sustancias a una célula cancerosa y un CAF, se supone que está implicada la captación a través de un determinado tipo de receptor sobre la superficie de un CAF.

Entre ellos, son preferibles retinol, retinal, ácido retinoico, un éster de retinol y un ácido graso (por ejemplo, acetato de

retinilo, palmitato de retinilo, estearato de retinilo y laurato de retinilo) y un éster de un alcohol alifático y ácido retinoico (por ejemplo, retinoato de etilo) desde el punto de vista de la eficacia de la administración específica de una sustancia a una célula cancerosa y un CAF.

5 Todos los isómeros retinoides, tales 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 una forma en disolución o mezcla con un medio que puede disolver o retener el retinoide.

10 El direccionamiento al que se hace referencia en el presente documento significa permitir que una sustancia tal como un fármaco o un portador de fármaco se administre a una diana específica, tal como una célula o tejido específico (en la presente invención, una célula seleccionada del grupo que consiste en fibroblastos asociados con cáncer) de manera más rápida, eficaz y/o en una cantidad mayor que con células o tejidos no diana y una sustancia que no presenta transporte dirigido, es decir, permite la administración específica a una diana, y el agente de direccionamiento significa una sustancia que puede someter a una sustancia al direccionamiento mencionado anteriormente cuando se une a o reacciona con la sustancia. Por tanto, en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, "portador o composición específica de células cancerosas" tiene el mismo significado que "portador o composición que selecciona como diana células cancerosas". Cuando el agente de direccionamiento está en la configuración de una molécula, tiene el mismo significado que una molécula de direccionamiento.

20 La composición de la presente invención puede incluir un elemento constituyente distinto del retinoide, por ejemplo, un elemento para promover o estabilizar la unión entre el agente de direccionamiento y un portador o un fármaco, un elemento para proteger el retinoide durante el almacenamiento, durante el uso en la producción de una formulación, o durante el almacenamiento de una formulación, o un espaciador para separar espacialmente el retinoide de un portador o un fármaco. El agente de direccionamiento se une a cualquier portador o fármaco, y puede seleccionar como diana este portador o fármaco en una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula cancerosa y un fibroblasto asociado con cáncer.

30 Además, la composición de la presente invención emplea un portador de administración de sustancias para un fibroblasto asociado con cáncer, incluyendo el portador el agente de direccionamiento. El portador puede formarse a partir del agente de direccionamiento por sí mismo o puede formarse haciendo que el agente de direccionamiento se una a o quede encerrado en otro componente constituyente, distinto del agente de direccionamiento, del portador. Por tanto, el portador puede incluir un componente constituyente distinto del agente de direccionamiento. 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 agente de direccionamiento, y el retinoide en particular, o pueden unirse al mismo.

40 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 semilla de amapola, un 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, un fosfolípido natural tal como lecitina, un fosfolípido semisintético tal como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o disteardoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilauroilfosfatidilcolina (DLPC) y colesterol.

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

55 La unión del agente de direccionamiento al portador o encerrarlo en el mismo también es posible al unir o encerrar el agente de direccionamiento a o en un componente constituyente, distinto del agente de direccionamiento, del portador mediante un método químico y/o físico. Alternativamente, unir o encerrar el agente de direccionamiento a o en el portador también puede llevarse a cabo mezclando el agente de direccionamiento y un componente constituyente, distinto del agente de direccionamiento, del portador cuando se prepara el portador. La cantidad de agente de direccionamiento unido a o encerrado en el portador puede ser, como razón en peso en los componentes constituyentes del portador que incluyen el agente de direccionamiento, del 0,01% al 100%, preferiblemente del 0,2% al 20%, y más preferiblemente del 1% al 5%. Unir o encerrar el agente de direccionamiento a o en el portador puede llevarse a cabo antes de que un fármaco, etc. quede soportado sobre el portador, puede llevarse a cabo al mismo tiempo que la mezcla del portador, el agente de direccionamiento y un fármaco, etc., o puede llevarse a cabo mezclando el agente de direccionamiento con un portador sobre el que ya ha quedado soportado un fármaco, etc. Por tanto, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para producir una formulación dirigida a un CAF,

incluyendo el procedimiento una etapa de unir un agente de direccionamiento a cualquier portador de unión de fármacos o portador de encapsulación de fármacos existente, por ejemplo, una formulación liposómica tal como DaunoXome®, Doxil, Caelyx® o Myocet®.

5 La configuración del portador contenido en la composición de la presente invención puede ser cualquier configuración, siempre que pueda portarse una sustancia o cuerpo deseado a un CAF, y aunque no se limita a los mismos, los ejemplos del mismo incluyen una micela macromolecular, un liposoma, una emulsión, microesferas y nanoesferas. El tamaño del portador puede cambiarse según el tipo, etc. de fármaco. Tal tamaño no está limitado particularmente y, por ejemplo, el diámetro es preferiblemente de 50 a 200 μm , y más preferiblemente de 75 a 150 μm . Esto se debe a que tal tamaño es adecuado para mostrar el efecto de EPR que promueve la acumulación en tejido canceroso, y también es adecuado para administrar un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF, que se describe más tarde. Tal diámetro se mide mediante un método de dispersión de luz dinámica.

10 En el portador contenido en la composición de la presente invención, la razón molar (razón de abundancia) del agente de direccionamiento con respecto a los componentes constituyentes, distintos del agente de direccionamiento, del portador cuando se administra es preferiblemente de 8:1 a 1:4, más preferiblemente de 4:1 a 1:2, aún más preferiblemente de 3:1 a 1:1, y de manera particularmente preferible 2:1. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que tal razón molar es eficaz para dar buenos resultados al unir o encerrar el agente de direccionamiento a o en un portador (es decir, la función de direccionamiento del agente de direccionamiento no resulta afectada) y para administrar específicamente una sustancia a un CAF.

15 En la presente invención, desde el punto de vista de la alta eficacia de administración, la amplia selección de sustancias que van a administrarse, la facilidad de obtener una formulación, etc., es preferible una configuración liposómica entre las configuraciones, y es particularmente preferible un liposoma catiónico que incluye un lípido catiónico.

20 El portador contenido en la composición de la presente invención puede contener una sustancia que va a portarse en su interior, que puede unirse al exterior de una sustancia que va a portarse, o puede mezclarse con una sustancia que va a portarse, siempre que el agente de direccionamiento contenido en el mismo esté presente en una configuración tal que pueda mostrar una función de direccionamiento. "Mostrar una función de direccionamiento" a lo que se hace referencia en el presente documento significa que el portador que contiene el agente de direccionamiento alcanza y/o se capta por el CAF de manera más rápida, eficaz y/o en una cantidad mayor que con un portador que no contiene el agente de direccionamiento, y esto puede confirmarse fácilmente, por ejemplo, añadiendo un portador marcado o que contiene un marcador a una célula cancerosa y/o CAF en cultivo, y analizando sitios donde el marcador está presente después de un periodo de tiempo predeterminado. De manera impredecible, los presentes inventores han descubierto que la administración específica de sustancias a un CAF se realiza eficazmente al exponer al menos parcialmente el agente de direccionamiento sobre el exterior de una formulación que contiene el portador, como muy tarde en el momento en que alcanza el CAF. Los presentes inventores consideran que se trata de un fenómeno en el cual el CAF capta agente de direccionamiento expuesto sobre el exterior de la formulación que contiene el portador más eficazmente que mediante difusión normal, a través de un determinado tipo de receptor sobre la superficie del CAF. Una técnica para exponer el agente de direccionamiento sobre el exterior de la formulación que contiene el portador no está limitada particularmente; por ejemplo, cuando se prepara un portador, puede añadirse agente de direccionamiento en exceso en relación a los componentes constituyentes, distintos del agente de direccionamiento, del portador. Más específicamente, con el fin de exponer eficazmente el agente de direccionamiento sobre el exterior de una formulación que contiene el portador, la razón molar (razón de combinación) del agente de direccionamiento con respecto a los componentes constituyentes, distintos del agente de direccionamiento, del portador cuando se combina, es preferiblemente de 8:1 a 1:4, más preferiblemente de 4:1 a 1:2, aún más preferiblemente de 3:1 a 1:1, y de manera particularmente preferible 2:1.

30 La sustancia o el cuerpo que se administra mediante el presente portador no está limitado particularmente, y preferiblemente tiene un tamaño de manera que pueda moverse físicamente dentro del cuerpo de un ser vivo desde un sitio de administración hasta un sitio de lesión donde está presente un CAF. Por tanto, el portador puede portar, no sólo una sustancia tal como un átomo, una molécula, un compuesto, una proteína o un ácido nucleico, sino también un cuerpo tal como un vector, una partícula viral, una célula, un sistema de liberación de fármacos formado a partir de uno o más elementos, o una micromáquina. La sustancia o el cuerpo anterior se selecciona de fármacos que controlan (por ejemplo aumentan o suprimen) la actividad y el crecimiento de un CAF.

35 Por tanto, en la presente invención, la sustancia que administra el portador es "un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF".

40 Además, la actividad de un CAF se refiere a diversas actividades tales como secreción, captación, migración, etc. mostrada por un CAF, y en la presente invención normalmente se refiere a actividades implicadas en la aparición y/o progresión de un cáncer en particular. Los ejemplos de tales actividades incluyen la producción/secreción de sustancias bioactivas tales como TGF- β , HGF, PDGF, VEGF, IGF (IGF1, IGF2, etc.), MMP (MMP1, 2, 3, 9, 11, 13, 14, etc.), FGF (FGF7, bFGF, etc.), uPA, cathepsina, y SDF-1, y componentes de la matriz extracelular tales como colágeno, proteoglicano, tenascina, fibronectina, trombospondina, osteopontina, osteonectina y elastina.

Además, el “fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF” al que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquier fármaco que suprime directa o indirectamente las acciones físicas, químicas y/o fisiológicas, etc. de un CAF relacionado con la aparición y/o progresión de un cáncer, y ejemplos del mismo incluyen, sin limitarse a los mismos, fármacos que inhiben la actividad o la producción de las sustancia bioactivas anteriores, por ejemplo, receptores de TGF- β II que antagonizan con TGF- β (receptor de TGF- β II truncado, receptor de TGF- β II soluble, etc.), inhibidores de MMP tales como batimastat, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que neutralizan las sustancias bioactivas anteriores, sustancias que suprimen la expresión de las sustancia bioactivas anteriores, tales como un ARNip, una ribozima, un ácido nucleico antisentido (incluyendo ARN, ADN, PNA, y moléculas compuestas de los mismos), sustancias que tienen un efecto negativo dominante, tal como un mutante negativo dominante, vectores que expresan el mismo, inhibidores de la activación celular tales como un inhibidor de los canales de sodio, inhibidores del crecimiento celular tales como agentes alquilantes (por ejemplo ifosfamida, clorhidrato de nimustina, ciclofosfamida, dacarbazina, melfalán, ranimustina, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo clorhidrato de idarubicina, clorhidrato de epirubicina, clorhidrato de daunorubicina, citrato de daunorubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de pirarubicina, clorhidrato de bleomicina, sulfato de peplomicina, clorhidrato de mitoxantrona, mitomicina C, etc.), antimetabolitos (por ejemplo clorhidrato de gemcitabina, encitabina, octofosfato de citarabina, una formulación de citarabina, tegafur/uracilo, una mezcla de tegafur/gimeracilo/oteracilo potásico, doxifluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato y mercaptopurina, etc.), alcaloides tales como etopósido, clorhidrato de irinotecán, tartrato de vinorelbina, hidrato de docetaxel, paclitaxel, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina y sulfato de vinblastina, y complejos de platino tales como carboplatino, cisplatino, nedaplatino, etc., e inductores de apoptosis tales como compuesto 861 y gliotoxina. Además, el “fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF” al que se hace referencia en la presente invención puede ser cualquier fármaco que promueva directa o indirectamente las acciones físicas, químicas, y/o fisiológicas, etc. de un CAF relacionado directa o indirectamente con suprimir la aparición y/o progresión de un cáncer.

Otros ejemplos del “fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF” incluyen fármacos que controlan el metabolismo de una matriz extracelular, por ejemplo, colágeno, y ejemplos de los mismos incluyen sustancias que tienen un efecto en la supresión de la expresión de una molécula diana, tal como un ARNip, una ribozima y un ácido nucleico antisentido (incluyendo ARN, ADN, PNA, o una molécula compuesta de los mismos), que se dirige a una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por un CAF o se dirige a una o más moléculas implicadas en la producción o secreción de la molécula constituyente de la matriz extracelular, sustancias que tienen un efecto negativo dominante tal como un mutante negativo dominante, y vectores que expresan el mismo.

Un ARNip es un ARN bicatenario que tiene una secuencia específica para una molécula diana, tal como un ARNm, y suprime la expresión de una sustancia, por ejemplo, una proteína, formada por la molécula diana, al promover la descomposición de la molécula diana (interferencia de ARN). Desde que Fire *et al.* publicaron el principio (Nature, 391: 806-811, 1998), se ha llevado a cabo una amplia variedad de investigaciones sobre la optimización de los ARNip, y un experto en la materia está familiarizado con tales técnicas. Además, se ha llevado a cabo una exhaustiva investigación sobre sustancias, distintas de los ARNip, que provocan interferencia de ARN o una reacción de inhibición de la expresión génica, y en la actualidad hay un gran número de tales sustancias.

Por ejemplo, el documento JP 2003-219893 A divulga un polinucleótido bicatenario formado a partir de ADN y ARN que inhibe la expresión de un gen diana. Este polinucleótido puede ser o bien un híbrido de ADN/ARN en el que una de las cadenas dobles es ADN y la otra es ARN, o bien una quimera de ADN/ARN en la que una parte de la misma cadena es ADN y la otra parte es ARN. Tal polinucleótido está formado preferiblemente por de 19 a 25 nucleótidos, más preferiblemente de 19 a 23 nucleótidos, y aún más preferiblemente de 19 a 21 nucleótidos; en el caso de un híbrido de ADN/ARN, es preferible que la cadena sentido sea ADN y la cadena antisentido sea ARN, y en el caso de una quimera de ADN/ARN, es preferible que la parte en el lado en el sentido de 5' del polinucleótido bicatenario sea ARN. Un polinucleótido de este tipo puede prepararse para que tenga cualquier secuencia mediante un procedimiento convencional de un método sintético químico conocido.

La molécula diana es preferiblemente una molécula que puede suprimir completamente la producción y/o la secreción de una molécula constituyente de la matriz extracelular, por ejemplo, y ejemplos de la misma incluyen, sin limitarse a ellos, HSP47. La secuencia génica de HSP47 o un homólogo de la misma se divulgan, por ejemplo, en el número de registro de GenBank AB010273 (humano), X60676 (ratón) y M69246 (rata, gp46).

Por tanto, como fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF contenido en la composición de la presente invención, son preferibles, por ejemplo, un ARNip, un híbrido de ADN/ARN, un polinucleótido quimérico, un ácido nucleico antisentido, etc., que se dirigen a HSP47.

La sustancia o el cuerpo administrado por el portador de la presente invención puede estar marcado o no. El marcaje permite monitorizar el éxito o el fracaso del transporte, los aumentos y las disminuciones en CAF, etc., y es particularmente útil a nivel de ensayos/investigación. Un marcador puede seleccionarse a partir de cualquier marcador conocido por un experto en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier radioisótopo, material magnético, una sustancia que se une a una sustancia de marcaje (por ejemplo, un anticuerpo), una sustancia fluorescente, un fluoróforo, una sustancia quimioluminiscente, una enzima, etc.

En la presente invención, "a un fibroblasto asociado con cáncer" significa que es adecuado usar fibroblastos asociados con cáncer como diana, y esto incluye que sea posible administrar una sustancia a una célula diana, es decir, un fibroblasto asociado con cáncer, de manera más rápida, eficaz, y/o en una cantidad mayor que a otras células (células no diana), por ejemplo, una célula no cancerosa o un fibroblasto normal. Por ejemplo, el portador de la presente invención puede administrar una sustancia a un fibroblasto asociado con cáncer a una tasa y/o eficacia de al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, o incluso al menos 3 veces, en comparación con otras células. La "eficacia" a la que se hace referencia en el presente documento significa la proporción de células a las que se administra una sustancia en relación con todas las células de la diana de evaluación.

La presente invención se refiere a una composición que incluye el agente de direccionamiento o portador, y uno o más tipos de los fármacos mencionados anteriormente que controlan la actividad o el crecimiento de un CAF, siendo la composición para controlar la actividad o el crecimiento de un CAF (composición anti-CAF), o para tratar un cáncer en el que está implicado un CAF, y al uso del agente de direccionamiento o portador en la producción de estas composiciones.

En la presente invención, el cáncer es cualquier tumor maligno, y ejemplos del mismo incluyen fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangiosarcoma, sarcoma sinovial, condrosarcoma, osteosarcoma y, además, tumor cerebral, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma esofágico, carcinoma de estómago, carcinoma duodenal, carcinoma apendicular, carcinoma de colon, carcinoma rectal, carcinoma hepático, carcinoma pancreático, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma de las vías biliares, carcinoma anal, carcinoma de riñón, carcinoma ureteral, carcinoma de vejiga, carcinoma de próstata, carcinoma de pene, carcinoma testicular, carcinoma uterino, carcinoma de ovario, carcinoma vulvar, carcinoma vaginal, carcinoma de piel, leucemia, y linfoma maligno, siempre que el cáncer esté acompañado por un CAF. En una realización de la presente invención, el cáncer es preferiblemente un cáncer distinto de carcinoma hepático o carcinoma pancreático.

Además, el cáncer en el que está implicado un CAF en la presente invención no es sólo un "cáncer acompañado por CAF" para el que está presente un CAF en el interior o en la periferia del cáncer, sino que también incluye un cáncer del que el CAF está separado espacialmente, pero cuyo crecimiento y actividad se promueven por las sustancias bioactivas mencionadas anteriormente liberadas del CAF. Por tanto, el cáncer en el que está implicado un CAF significa ampliamente un tumor maligno, e incluye cualquier carcinoma, que sea un tumor maligno epitelial, tal como por ejemplo tumor cerebral, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma esofágico, carcinoma de estómago, carcinoma duodenal, carcinoma apendicular, carcinoma de colon, carcinoma rectal, carcinoma hepático, carcinoma pancreático, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma de las vías biliares, carcinoma anal, carcinoma de riñón, carcinoma ureteral, carcinoma de vejiga, carcinoma de próstata, carcinoma de pene, carcinoma testicular, carcinoma uterino, carcinoma de ovario, carcinoma vulvar, carcinoma vaginal y carcinoma de piel y, además, cualquier otro tumor sólido maligno, que sea un tumor maligno no epitelial, tal como por ejemplo fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangiosarcoma, sarcoma sinovial, condrosarcoma y osteosarcoma. En la presente invención, un cáncer en el que está implicado un CAF, seleccionado de carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma de estómago, carcinoma de las vías biliares, y un carcinoma de piel tal como carcinoma de células basales, puede tratarse ventajosamente debido a un alto grado de contribución de CAF al crecimiento. En una realización de la presente invención, el cáncer en el que está implicado un CAF no incluye carcinoma hepático o carcinoma pancreático. Además, en otra realización, el tratamiento de un cáncer en el que está implicado un CAF no incluye la prevención de carcinoma hepático o carcinoma pancreático.

Una realización de la composición anticancerosa de la presente invención incluye el agente de direccionamiento o el portador, y un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF, y administrar esta a un CAF y controlar la actividad o el crecimiento del mismo permite que se muestre indirectamente una acción anticancerosa. Aún otra realización de la composición anticancerosa de la presente invención incluye el agente de direccionamiento o el portador, y un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de una célula cancerosa y un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF, y puesto que el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de una célula cancerosa actúa sobre una célula cancerosa, y el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF actúa sobre un CAF, se duplica la acción anticancerosa. En esta realización, el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de una célula cancerosa y el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF pueden ser idénticos entre sí o diferentes entre sí.

En la composición de la presente invención, siempre que el agente de direccionamiento esté presente en un modo que permita que se muestre una función de direccionamiento, el portador puede contener una sustancia que va a portarse en su interior, que puede unirse al exterior de una sustancia que va a portarse, o puede mezclarse con una sustancia que va a portarse. Por tanto, dependiendo de la vía de administración, de la manera en que se libera el fármaco, etc., la composición puede cubrirse con un material apropiado tal como, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material que se disgrega a lo largo del tiempo, o puede incorporarse en un sistema de liberación de fármacos apropiado.

La composición de la presente invención puede administrarse a través de diversas vías incluyendo tanto oral como parenteral, y ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, las vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosa, percutánea, intranasal, intraperitoneal, intratumoral, intrapulmonar e intrauterina, y puede formularse en una forma de dosificación adecuada para cada vía administración. Tal forma de dosificación y método de formulación pueden seleccionarse según sea apropiado de cualquier forma y método conocido (véase, por ejemplo Hyojun Yakuzaijaku (Standard Pharmaceuticals), editado por Yoshiteru Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003).

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

El agente de direccionamiento, el portador o la composición de la presente invención pueden administrarse en cualquier configuración, pero desde el punto de vista de la estabilidad en almacenamiento, se proporcionan preferiblemente en una configuración que puede prepararse en el momento de uso, por ejemplo en una configuración que permite que un médico y/o un farmacéutico, un enfermero, otro paramédico, etc. lo prepare en el lugar de tratamiento o en las proximidades del mismo. En este caso, el agente de direccionamiento, el portador, o la composición de la presente invención se proporciona como uno o más envases que contienen al menos un elemento constituyente 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 de manera más preferible inmediatamente antes de su uso. Cuando se lleva a cabo la preparación, puede usarse un reactivo, un disolvente, equipos de preparación, etc. que normalmente están disponibles en un lugar de preparación, según sea apropiado.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un kit de preparación para la composición, incluyendo el kit uno o más envases que contienen individualmente o en combinación un agente de direccionamiento y una sustancia que va a portarse, y una sustancia constituyente del portador distinta del agente de direccionamiento, y también a un elemento constituyente necesario para el portador o la composición proporcionados en forma de un kit de este tipo. El kit de la presente invención puede contener, además de lo anterior, instrucciones, un medio de grabación electrónica tal como un CD o un DVD relacionado con un procedimiento para preparar el agente de direccionamiento, el portador y la composición de la presente invención, o un método de administración, etc. Además, el kit de la presente invención puede incluir todos los elementos constituyentes para completar el agente de direccionamiento, el portador o la composición de la presente invención, pero no siempre es necesario que incluya todos los elementos constituyentes. Por tanto, no es necesario que el kit de la presente invención incluya un reactivo o un disolvente que normalmente está disponible en el lugar del tratamiento médico, una instalación experimental, etc. tal como, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica o una disolución de glucosa.

La presente divulgación se refiere además a un método para controlar la actividad o el crecimiento de un CAF o para tratar un cáncer en el que está implicado un CAF, incluyendo el método administrar una cantidad eficaz de la composición a un sujeto que lo requiere. La cantidad eficaz a la que se hace referencia en el presente documento es, en un método para tratar un cáncer, por ejemplo, una cantidad que suprime la aparición de un cáncer, alivia los síntomas, o retrasa o detiene la progresión del cáncer, y es preferiblemente una cantidad que impide la aparición de un cáncer o que cura un cáncer. También es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que supere al beneficio de la administración. Tal cantidad puede determinarse según sea apropiado mediante una prueba *in vitro* usando células en cultivo o mediante una prueba en un animal modelo tal como un ratón, una rata, un perro, o un cerdo, y tales métodos de prueba se conocen bien por un experto en la técnica. Además, un experto en la técnica conoce la dosis del agente de direccionamiento contenido en el portador y la dosis del fármaco usado en el método de la presente divulgación, o puede determinarse según sea apropiado mediante la prueba mencionada anteriormente, etc.

Una realización del método de tratamiento de cáncer implica administrar la composición anticancerosa que incluye un agente de direccionamiento o un portador y un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF, y administrar el fármaco a un CAF para controlar la actividad o el crecimiento del mismo, tratando así indirectamente el cáncer. Aun otra realización del método de tratamiento de cáncer incluye administrar la composición anticancerosa que incluye un agente de direccionamiento o un portador y un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de una célula cancerosa y un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF, y administrar el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de una célula cancerosa a una célula cancerosa y el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF a un CAF respectivamente, tratando así el cáncer a través de dos vías. En esta realización, el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de una célula cancerosa y el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un CAF pueden ser idénticos entre sí o diferentes entre sí.

En el método de la presente divulgación, la dosis específica de la composición administrada puede determinarse a la vez que se tienen en cuenta diversos estados con respecto a un sujeto que requiere el tratamiento, tales como por ejemplo la gravedad de los síntomas, el estado de salud general del sujeto, la edad, el peso, el sexo del sujeto, la

dieta, el momento y la frecuencia de administración, un medicamento usado en combinación, la reacción al tratamiento, el cumplimiento con el tratamiento, etc.

Como vía de administración, hay diversas vías incluyendo administraciones tanto orales como parenterales, y ejemplos de las mismas incluyen las vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosa, percutánea, intranasal, intraperitoneal, intratumoral, intrapulmonar e intrauterina.

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

En el método de la presente divulgación, el término "sujeto" significa un individuo vivo, preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero, y aún más preferiblemente un individuo humano. En la presente divulgación, el sujeto puede estar sano o aquejado de algún trastorno, y cuando se desea tratamiento de un cáncer, normalmente significa un sujeto aquejado por un cáncer o que está en riesgo de estar aquejado.

Además, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervenciones preventivas y/o terapéuticas medicamente aceptables con el fin de la cura, la remisión temporal o la prevención de un trastorno. Por ejemplo, el término "tratamiento" incluye la intervención médicamente aceptable para diversos fines, incluyendo el retraso o la detención de la progresión de un cáncer, la involución o la desaparición de lesiones, la prevención de la aparición de un cáncer, y la prevención de recidiva.

La presente invención también se refiere a un método para administrar un fármaco a una célula cancerosa y/o un CAF, utilizando el portador anterior. Este método incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una etapa de soportar una sustancia que va a portarse sobre el portador, y una etapa de administrar o añadir el portador que tiene la sustancia que va a portarse sobre el mismo a un ser vivo o a un medio, por ejemplo un medio de cultivo, que contiene una célula cancerosa y/o un CAF. Estas etapas pueden lograrse según sea apropiado según cualquier método conocido o un método descrito en la presente memoria descriptiva, etc. El método de administración anterior puede combinarse con otro método de administración, por ejemplo, un método de administración dirigido a un órgano en el que está presente una célula cancerosa y/o un CAF. Además, el método anterior incluye un modo realizado *in vitro* y un modo en el que se selecciona como diana una célula cancerosa y/o un CAF dentro del cuerpo.

La presente invención se explica más específicamente haciendo referencia a los ejemplos a continuación, pero el alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas no está limitado por estos ejemplos.

Ejemplo 1. Separación de CAF

Se cortó finamente tejido canceroso o tejido normal periférico (tejido normal separado de un sitio espaciado desde el tejido canceroso en al menos 2 cm) extraído de un paciente con cáncer de colon, para dar fragmentos de 1 x 1 x 1 mm, luego se lavó con centrifugación con PBS dos veces, y los sedimentos se cultivaron en un líquido de cultivo (DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco) que contenía colagenasa tipo I (225 U/ml), hialuronidasa (125 U/ml), FBS (suero bovino fetal) al 10%, estreptomycin/penicilina) durante 24 horas. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante y se continuó con el cultivo tras cambiar el cultivo líquido por FBS al 10%/DMEM. Cuando se inmunotifieron las células cultivadas con un anticuerpo marcado con FITC con respecto a α -SMA, que es un marcador para CAF, y vimentina, que es un marcador para células mesenquimatosas, se detectó α -SMA sólo en células derivadas de tejido canceroso, y se confirmó que estas células eran CAF (véase la figura 1). La vimentina fue positiva para células derivadas de cualquier tejido, y la desmina, que es un marcador para células epiteliales, fue negativa.

Ejemplo 2. Actividad de crecimiento tumoral de CAF

Se sembró una placa de 6 pocillos con CAF o fibroblastos normales obtenidos en el ejemplo 1 a una densidad de 1 x 10⁵ células/pocillo y se cultivó con FBS al 10%/DMEM, se reemplazó el cultivo líquido por FBS al 0,5%/DMEM en un estado confluyente al tercer día, y se sembró en cultivo líquido con la línea de células de cáncer de colon M7609 (2 x 10⁵ células), y se llevó a cabo cocultivo durante 7 días. Se contó el número de células M7609 con un contador Coulter (Beckman) a los 0 días y en los días 3^o y 5^o. Los resultados se facilitan en la figura 2. Esto muestra que los CAF promueven el crecimiento de células cancerosas.

Ejemplo 3. Preparación de ARNip

Se adquirieron tres tipos de ARNip dirigidos a gp46 (n.º de registro de GenBank M69246), que es un homólogo de rata de HSP47 humana, y un control de ARNip al azar, de Hokkaido System Science Co., Ltd. Cada ARNip consiste en 27 bases que sobresalen en el lado 3', y las secuencias son las siguientes.

Secuencia A: 5'-GUUCCACCAUAAGAUGGUAGACAACAG-3' (sentido, SEQ ID NO: 1)

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

Secuencia B: 5'-CCACAAGUUUUUAUAUCCAAUCUAGCAG-3' (sentido, SEQ ID NO: 3)

5'-GCUAGAUUGGAUUAUAAAACUUGUGGAU-3' (antisentido, SEQ ID NO: 4)

Secuencia C: 5'-CUAGAGCCAUUACAUUACAUUGACAAG-3' (sentido, SEQ ID NO: 5)

5'-UGUCA AUGUAAUGUAAUGGCUCUAGAU-3' (antisentido, SEQ ID NO: 6)

ARNip al azar: 5'-CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUGCAG-3' (sentido, SEQ ID NO: 7)

5'-GCAAUGAAGCCGGUCUAGCGAAUCGAU-3' (antisentido, SEQ ID NO: 8)

Además, también se preparó ARNip marcado en el lado 5' con el tinte fluorescente 6'-carboxifluoresceína (6-FAM).

Ejemplo 4. Preparación de liposoma unido a VA que contiene ARNip

Como liposoma, se usó un liposoma catiónico que contiene DC-6-14, colesterol y DOPE a una razón molar de 4:3:3 (Lipotrust, Hokkaido System Science Co., Ltd.). Se mezclaron 10 nmol de liposoma y 20 nmol de retinol todo trans (a continuación en el presente documento, denominado "VA") en DMSO usando un tubo de 1,5 ml, luego se disolvió en cloroformo, se evaporó una vez y luego se suspendió en PBS. Posteriormente, se mezcló el ARNip (10 µg/ml) obtenido en el ejemplo 3 y la suspensión de liposomas a una razón de 1:1 (p/p). Se retiraron el VA y el ARNip libres contenidos en la suspensión de liposomas obtenidos de este modo mediante un sistema de micropartición (Sartorion VIVASPIN 5000MWCO PES), dando de ese modo un liposoma unido a VA que contenía ARNip (VA-lip-ARNip). La cantidad de VA añadida y la cantidad de VA contenida en el liposoma purificado se midieron mediante HPLC, y cuando se examinó la proporción de VA unido al liposoma, se encontró que la mayoría del VA (el $95,6 \pm 0,42\%$) se unía al liposoma. Además, cuando se midió la eficacia de captación de ARNip en el liposoma mediante un ensayo RiboGreen (Molecular Probes), fue del $94,4 \pm 3,0\%$, que es alta. Parte del VA quedaba expuesto sobre la superficie del liposoma.

Del mismo modo que antes, se prepararon liposomas que contenían ARNip (lip-ARNip) y liposomas unidos a VA (VA-lip).

Ejemplo 5. Captación de VA-lip-ARNip

Se sembró una placa de 6 pocillos con CAF o fibroblastos normales a una densidad de 5×10^5 células/pocillo, y se llevó a cabo el cultivo en FBS al 10%/DMEM. Después de 2 días, se lavó con medio libre de suero en un estado subconfluente y el medio se reemplazó con OPTI-MEM que contenía suero. Posteriormente, se añadió al medio la suspensión de liposomas que contenía ARNip (concentración final de 50 pmol/ml) obtenida en el ejemplo 4, y se hizo reaccionar a 37°C durante 24 horas. Cuando se añadió el liposoma unido a VA, la concentración final de VA se ajustó a 40 nmol/ml. Además, como ARNip, se usó ARNip al azar marcado con 6-FAM. Se evaluó la captación de ARNip en cada especie celular 0, 0,5, 1, 3, 6, 12, 18, y 24 horas tras haber comenzado la reacción mediante citometría de flujo (figura 3). Una vez completada la reacción, se tiñeron las células con DAPI (Molecular Probe) y anticuerpo anti- α -SMA marcado con Cy3, y se analizó la localización de ARNip (figuras 4 a 5).

Tal como queda claro a partir de la figura 3, se ha encontrado que cuando se usó el portador que contenía VA, la tasa de transferencia de ARNip en los CAF era al menos 3 veces la tasa de transferencia en fibroblastos normales, la captación por los CAF cuando han transcurrido 24 horas se mantuvo a casi el 100%, y la especificidad y la eficacia de transferencia fueron muy altas. Además, la figura 4 muestra un campo de visión representativo utilizado en la evaluación de la localización de ARNip, y según esto, cuando se usó el liposoma unido a VA (VA-lip-ARNip-FAM), el ARNip se incorporó en todos los CAF en el campo de visión, pero cuando se usó el liposoma que no contenía VA (lip-ARNip-FAM), el ARNip se incorporó sólo en 1 CAF de entre 5 CAF en el campo de visión. Además, la figura 5 muestra que el ARNip no se localiza dentro de la célula de CAF para el liposoma que no contenía VA (lip-ARNip-FAM), pero que la mayoría del ARNip se localiza dentro de la célula para el liposoma unido a VA (VA-lip-ARNip-FAM), y que la transferencia de alta eficacia de ARNip en el CAF es dependiente de VA. A partir de los resultados anteriores, queda claro que el portador que contiene VA promueve de manera específica y marcada la captación de una sustancia en CAF.

Ejemplo 6. Captación de VA-lip-DNR

Se examinó la captación por los CAF usando un liposoma unido a VA que contenía daunorubicina (DNR) en lugar de ARNip.

Se mezclaron DNR encapsulada en liposoma (lip-DNR, DaunoXome®, a continuación en el presente documento también denominada DNR liposómica) y VA en DMSO a una razón molar de liposoma:VA = 1:2, luego se disolvió en cloroformo, se evaporó una vez y luego se suspendió en PBS. El VA libre contenido en la suspensión de liposomas obtenido de ese modo se retiró mediante un sistema de micropartición (Sartorion VIVASPIN 5000MWCO PES), dando así liposoma unido a VA que contiene DNR (VA-lip-DNR, a continuación en el presente documento también denominado DNR liposómica unida a VA). La cantidad de VA añadida y la cantidad de VA contenida en el liposoma

purificado se midieron mediante HPLC, y cuando se examinó la proporción de VA unido al liposoma, se encontró que la mayoría del VA (el 98%) se unía al liposoma. Se expuso parte del VA sobre la superficie del liposoma. En DaunoXome®, se encapsuló citrato de daunorubicina en un liposoma formado a partir de diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC) y colesterol (Chol), y la razón molar de DSPC:Chol:citrato de daunorubicina es de 10:5:1.

5 Se sembró un portaobjetos de cámara con los CAF obtenidos en el ejemplo 1, fibroblastos normales, o fibroblastos comerciales (fibroblastos cutáneos, Cells System, n.º de producto CS-2FO-101) respectivamente a una densidad de 2×10^4 células/cámara, se cultivó con FBS al 10%/DMEM durante la noche, luego se lavó con medio libre de suero una vez en un estado subconfluyente, y se reemplazó el medio con OPTI-MEM que contenía suero. Posteriormente, se
10 añadió al medio una suspensión de liposomas que contenía lip-DNR o VA-lip-DNR obtenido anteriormente a 5 µg/ml como concentración de DaunoXome® y se hizo reaccionar a 37°C. Además, se tiñeron los núcleos con DAPI. Se examinó la localización de DNR, que mostró un color rojo, bajo un microscopio de fluorescencia antes de que comenzara la reacción (0 min), y 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos después de que comenzara la reacción. Los resultados se facilitan en las figuras 6 a 9.

15 En los CAF a los que se añadió VA-lip-DNR, ya se observó un color rojo dentro de la célula a los 15 minutos después de la adición, pero en un grupo al que se añadió lip-DNR no se observó localización de DNR en las células (figuras 6 y 9). Además, en fibroblastos normales (figura 7) y fibroblastos de piel (figura 8), no se observó localización de DNR ni en el grupo al que se añadió VA-lip-DNR ni el grupo al que se añadió lip-DNR. Estos resultados muestran que el portador unido a VA provoca la administración de fármacos específicos de CAF.

Ejemplo 7. Direccionamiento de ácido retinoico (RA) derivado de VA a células cancerosas y CAF

(1) Células cultivadas

25 Se establecieron células CAF mediante clonación a partir de una muestra clínica de un paciente humano con cáncer. Se adquirieron células de fibrosarcoma humano HT-1080 (fibrosarcoma) y células derivadas de cáncer hepático humano HepG2 de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Todas las células se cultivaron con un medio DMEM (Sigma Aldrich) al que se añadió suero bovino fetal (FBS) al 10%. Se sometieron a tripsinización, luego se sembró un portaobjetos de cultivo de 4 pocillos (BD Falcon n.º 354114) con ellas a 2×10^5 células/ml, y se cultivaron durante la noche en las condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

(2) Preparación de la formulación liposómica que contiene VA

35 Como fármaco modelo, se usó DaunoXome® (Gilead Sciences, Inc.), que es una formulación de daunorubicina encapsulada en liposoma. DaunoXome® contiene el fármaco daunorubicina a una concentración de 2 mg/ml. Se añadieron 990 µl de DMEM que contenía FBS al 10% a 10 µl de DaunoXome®, dando de ese modo una disolución de 20 µg/ml. Esto se mezcló con 7,14 µl de retinol todo trans (VA) y ácido retinoico todo trans (ácido retinoico, RA) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para dar 100 mM, dando de ese modo una formulación liposómica que contenía
40 VA (VA+) y una formulación liposómica que contenía RA (ácido retinoico+), respectivamente. Al menos parte del VA y el RA se expusieron sobre la superficie del liposoma. Además de estas formulaciones liposómicas, como grupo de control se preparó una formulación (VA-), que era una disolución de DaunoXome® que no contenía VA ni RA.

(3) Administración de formulaciones liposómicas de VA y RA

45 Se retiró el medio del portaobjetos de cultivo y se añadieron al mismo 750 µl de DMEM que contenía FBS al 10% recién preparado. A excepción del portaobjetos de cultivo que no tenía tratamiento (sin tratamiento), se añadieron 250 µl de formulación (VA-), que era la disolución de DaunoXome® que no contenía VA ni RA, la formulación liposómica que contenía VA (VA+) y la formulación liposómica que contenía RA (ácido retinoico+), respectivamente y se incubó
50 en condiciones de 37°C y el CO₂ al 5% durante 15 minutos. Se retiró el medio de cada uno de los portaobjetos de cultivo, se lavaron con 1 ml de PBS dos veces, posteriormente se añadió al mismo 1 ml de una disolución de paraformaldehído al 4% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se fijaron las células a temperatura ambiente durante 5 minutos. Entonces se retiró la disolución de fijación y se lavaron las células con PBS tres veces. Se extrajo el portaobjetos de vidrio de cada portaobjetos de cultivo, se añadió gota a gota Prolong Gold (Invitrogen) y se selló el
55 portaobjetos de vidrio con un cubreobjetos de vidrio.

(4) Examen microscópico

60 Se examinó el portaobjetos de vidrio usando un microscopio de fluorescencia (Keyence BZ8000). Se sabe que la daunorubicina se incorpora en el núcleo de una célula y emite fluorescencia roja bajo luz de excitación verde (figura 10, parte superior izquierda). Además, el Prolong Gold usado cuando se sella contiene el tinte fluorescente DAPI. DAPI se une al núcleo de una célula y muestra fluorescencia azul bajo luz de excitación UV (figura 10, parte superior derecha). Por tanto, en el examen microscópico, cuando hay captación de una formulación liposómica, se observa tanto fluorescencia roja como azul, y como resultado se muestra un color morado cuando se superponen las dos
65 imágenes (figura 10, parte inferior). Por otra parte, cuando no se incorpora una formulación liposómica en una célula,

sólo se detecta fluorescencia azul debido a DAPI.

Se examinó el portaobjetos de vidrio mediante un microscopio de contraste de fases y el microscopio de fluorescencia. Se fusionaron electrónicamente una imagen del portaobjetos de vidrio tomada por el microscopio de contraste de fases bajo campo brillante, una imagen tomada por el microscopio de fluorescencia bajo luz de excitación verde, y una imagen tomada bajo luz de excitación UV (fusión). Las imágenes combinadas se muestran en las figuras 11 a 13, y los resultados de la observación se muestran en las tablas 1 a 3. En las tablas, + indica que se observó fluorescencia, y - indica que no se observó fluorescencia.

10 Tabla 1. Captación de la formulación liposómica en los CAF (figura 11)

	DAPI (fluorescencia azul)	Daunorubicina (fluorescencia roja)
Sin tratamiento (sin tratamiento)	+	-
DaunoXome® (VA-)	+	-
DaunoXome® + retinol (VA+)	+	+
DaunoXome® + ácido retinoico (ácido retinoico+)	+	+

Tabla 2. Captación de la formulación liposómica en HT-1080 (comparativo) (figura 12)

	DAPI (fluorescencia azul)	Daunorubicina (fluorescencia roja)
Sin tratamiento (sin tratamiento)	+	-
DaunoXome® (VA-)	+	-
DaunoXome® + retinol (VA+)	+	+
DaunoXome® + ácido retinoico (ácido retinoico+)	+	+

15 Tabla 3. Captación de la formulación liposómica en HepG2 (comparativo) (figura 13)

	DAPI (fluorescencia azul)	Daunorubicina (fluorescencia roja)
sin tratamiento (sin tratamiento)	+	-
DaunoXome® (VA-)	+	-
DaunoXome® + retinol (VA+)	+	+
DaunoXome® + ácido retinoico (ácido retinoico+)	+	+

20 Tal como queda claro a partir de estos resultados, se confirmó la presencia de núcleos celulares para todos los portaobjetos de vidrio debido a la fluorescencia azul de DAPI. La fluorescencia roja de daunorubicina mostró que en los portaobjetos de vidrio que emplean VA y RA, se observó localización de daunorubicina en los núcleos celulares incluso tras una incubación de tan solo 15 minutos. En cambio, en el portaobjetos de vidrio que no emplea VA ni RA, no hubo localización de daunorubicina en los núcleos celulares. Esto sugiere que puede usarse un retinoide como agente de direccionamiento hacia un CAF o una célula cancerosa.

25 Ejemplo 8. Inhibición del crecimiento específico de CAF mediante fármaco encapsulado en liposoma unido a VA

Se examinó la actividad inhibidora del crecimiento de CAF de ARNip que contiene liposoma unido a VA hacia gp46 o DNR.

30 (1) Inhibición del crecimiento mediante VA-lip-ARNip

35 Como ARNip, se usó la secuencia A descrita en el ejemplo 3. Se sembró una placa de 24 pocillos con CAF y fibroblastos normales, respectivamente, a 1×10^4 células y se cultivó con FBS al 10%/DMEM durante 24 horas, se añadió VA-lip-ARNip a una concentración final de 50 pmol/ml, se llevó a cabo incubación durante 1 hora, y posteriormente se lavaron las células. El recuento de células viables se midió mediante el método de WST-1 tras cultivar con FBS al 10%/DMEM durante 48 horas. Como control, se usaron liposomas con VA unido y no unido que contenían lip-ARNip y ARNip al azar (VA-lip-ARNip (al azar) y lip-ARNip (al azar)), y se llevó a cabo la evaluación de la diferencia significativa mediante la prueba de la U. Los resultados se facilitan en la figura 14. A partir de la figura, 40 puede observarse que en los CAF a los que se añadió VA-lip-ARNip, el recuento de células viables disminuyó enormemente hasta menos del 50% de antes del tratamiento, pero en los otros grupos de tratamiento, apenas hubo ningún cambio en el recuento de células viables.

45 (2) Inhibición del crecimiento mediante VA-lip-DNR

Se sembró una placa de 96 pocillos con CAF o fibroblastos normales respectivamente a 2×10^3 células, y se cultivaron con FBS al 10%/DMEM durante 24 horas, posteriormente se añadió VA-lip-DNR obtenido en el ejemplo 6 o lip-DNR a

una concentración final de DaunoXome® de 5 µg/ml y tras exponer durante 15 minutos, se lavaron las células. El cultivo se llevó a cabo con FBS al 10%/DMEM durante 24 horas, y el recuento de células viables se midió mediante el método de WST-1. La evaluación de la diferencia significativa se llevó a cabo mediante la prueba de la U. Los resultados se muestran en la figura 15. A partir de esta figura, puede observarse que en los CAF a los que se añadió VA-lip-DNR, el recuento de células viables disminuyó enormemente hasta aproximadamente el 40% de antes del tratamiento, pero en los CAF a los que se añadió lip-DNR o fibroblastos normales, apenas hubo cambio en el recuento de células viables.

Los resultados anteriores sugieren que un fármaco soportado sobre un portador unido a VA muestra una actividad inhibitoria del crecimiento específica de CAF.

Ejemplo 9 (comparativo). Examen de la eficacia de incorporar VA-lip-DNR en células cancerosas

Se sembraron portaobjetos de cámara (Falcon) con las líneas celulares derivadas de fibrosarcoma humano HT-1080, HS913T y Sw684, la línea celular derivada de cáncer de mama humano MCF7, la línea celular derivada de osteosarcoma humano Saos2 (todas ellas adquiridas de ATCC) y la línea celular derivada de cáncer hepático humano Huh7 (adquirida de JCRB Cell Bank) a una densidad celular de 1×10^4 células/pocillo, se cultivaron durante la noche, y se lavaron con DMEM que contenía FBS al 10%. Posteriormente, se añadieron a las mismas 5 µg/ml (8,85 µM como daunorubicina, 89,25 µM como liposoma) de lip-DNR (DaunoXome®) o 5 µg/ml de VA-lip-DNR (que contenía 178,5 µM de retinol) obtenidos en el ejemplo 6, se lavaron las células durante 15 minutos y/o 30 minutos tras la adición y se fijaron mediante formaldehído al 4%. Tras lavar con PBS, se llevó a cabo el sellado con Prolong Gold (Invitrogen), y se examinó la localización de DNR mediante un microscopio de fluorescencia.

A partir de los resultados mostrados en las figuras 16 a 18, en todas las células, en el grupo de adición de VA-lip-DNR, se localizó DNR, que muestra un color rojo bajo un microscopio de fluorescencia, en el interior de la mayoría de las células sólo 15 minutos después de la adición, mientras que apenas se incorporó lip-DNR incluso después de haber transcurrido 30 minutos. Esto sugiere que la unión de VA promueve enormemente la captación de DNR liposómica en una célula. Además, a partir del resultado mostrado en la figura 19, queda claro que se observa el efecto promotor mencionado anteriormente en diversas células cancerosas, incluyendo células de sarcoma y carcinoma.

Ejemplo 10 (comparativo). Examen del efecto antitumoral de daunorubicina liposómica unida a VA

Se sembró una placa de 96 pocillos con las líneas celulares derivadas de fibrosarcoma humano HT-1080, HS913T y Sw684 a una densidad celular de 2×10^3 células/pocillo y se cultivaron durante la noche, posteriormente se añadieron 5 µg/ml de lip-DNR o 5 µg/ml de VA-lip-DNR usados en el ejemplo 6, y se llevó a cabo el cultivo durante 15 minutos. Tras esto, se lavaron las células para retirar el fármaco que estaba fuera de las células, y luego se cultivaron con DMEM que contenía FBS al 10% durante 22 horas. Dos horas después, se añadió a las mismas el kit de proliferación celular WST-1 (Cayman Chemical), se midió la absorbancia y se calculó la proporción relativa al número de células cuando no se llevó a cabo el tratamiento. A partir del resultado mostrado en la figura 20, puede observarse que la unión de VA aumenta de manera notable la actividad antitumoral de la DNR liposómica.

Ejemplo 11. Administración específica de CAF *in vivo*

Se inoculó a ratones NOD-scid (6 semanas de edad, hembra, n = 8, adquiridos de Sankyo Labo Service Corporation) por vía subcutánea la línea celular de cáncer de estómago KATO-III a 2×10^6 células, obteniendo de ese modo ratones que portan tumor. En el día 28 después de la inoculación, se administraron liposoma unido a VA (VA-lip-ARNip-FAM) o liposoma que no contenía VA (lip-ARNip-FAM) usados en el ejemplo 5 a través de la vena de la cola a dosis de 200 nmol de VA, 100 nmol de lip y 100 µg de ARNip. En este liposoma unido a VA, parte del VA ya estaba expuesto sobre la superficie del liposoma cuando se administró. Veinticuatro horas después de la administración, se recogió el tejido tumoral, se preparó una muestra de tejido, ésta se tiñó con DAPI (Molecular Probe) y el anticuerpo anti- α -SMA marcado con Cy3, y se analizó la localización de ARNip. Los resultados se muestran en las figuras 21 y 22.

Tal como queda claro a partir de la figura 21, en el liposoma que no contenía VA, a pesar de la presencia de CAF en el tejido mostrado por el color rojo debido a Cy3, apenas hubo ningún ARNip mostrado por el color verde debido a FAM, mientras que en el liposoma unido a VA, se observó colocalización de CAF y ARNip.

Ejemplo 12 (comparativo). Actividad antitumoral de VA-lip-DNR *in vivo*

Se inoculó a ratones desnudos (6 semanas de edad, hembra, n = 10, adquiridos de Sankyo Labo Service Corporation) por vía subcutánea con células de la línea celular de cáncer de colon M7609 a 2×10^6 células, obteniendo de ese modo ratones que portan tumor. Desde el día 14 después de la inoculación, se administró VA-lip-DNR o lip-DNR a través de la vena de la cola dos veces a la semana a una dosis 1/40 (0,05 µg por g de peso del ratón) de la cantidad de administración normal contra el cáncer de DaunoXome®. En este VA-lip-DNR, parte del VA ya estaba expuesto sobre la superficie del liposoma cuando se administró. El cambio en volumen del tumor tras comenzar la administración se muestra en la figura 23. Puede observarse a partir de esta figura que el fármaco soportado sobre el portador unido

a VA suprimió notablemente el crecimiento del tumor.

Los resultados anteriores muestran que la composición de la presente invención es extremadamente eficaz en el tratamiento de un cáncer.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para su uso en el tratamiento de cáncer en el que están implicados fibroblastos asociados con cáncer, caracterizada porque la composición comprende un portador de administración de sustancias que comprende un retinoide que promueve la administración específica de sustancias a un fibroblasto asociado con cáncer, y un fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un fibroblasto asociado con cáncer.
- 10 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque el retinoide comprende retinol.
- 10 3. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque el contenido del agente que promueve la administración específica de sustancias a un fibroblasto asociado con cáncer es del 0,2 al 20% en peso de todo el portador.
- 15 4. Composición para su uso según la reivindicación 3, caracterizada porque la razón molar del agente que promueve la administración específica de sustancias a un fibroblasto asociado con cáncer con respecto a los componentes constituyentes del portador distintos del agente que promueve la administración específica de sustancias a un fibroblasto asociado con cáncer es de 8:1 a 1:4.
- 20 5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el fármaco que controla la actividad o el crecimiento de un fibroblasto asociado con cáncer se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la actividad o la producción de una sustancia bioactiva seleccionada del grupo que consiste en TGF- β , HGF, PDGF, VEGF, IGF, MMP, FGF, uPA, catepsina y SDF-1, un supresor de la actividad celular, un inhibidor del crecimiento, un inductor de apoptosis, y un ARNip, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido quimérico de ADN/ARN o un vector que expresa el mismo que
25 selecciona como diana una o más moléculas de entre una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por fibroblastos asociados con cáncer y una molécula implicada en la producción o secreción de la molécula constituyente de la matriz extracelular.
- 30 6. Composición para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque la molécula implicada en la producción o secreción de la molécula constituyente de la matriz extracelular es HSP47.
- 35 7. Kit de preparación para la composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque comprende uno o más envases que comprenden individualmente o en combinación el fármaco, el agente que promueve la administración específica de sustancias a un fibroblasto asociado con cáncer, y sustancias constituyentes del portador distintas del agente que promueve la administración específica de sustancias a un fibroblasto asociado con cáncer.

Fig. 1

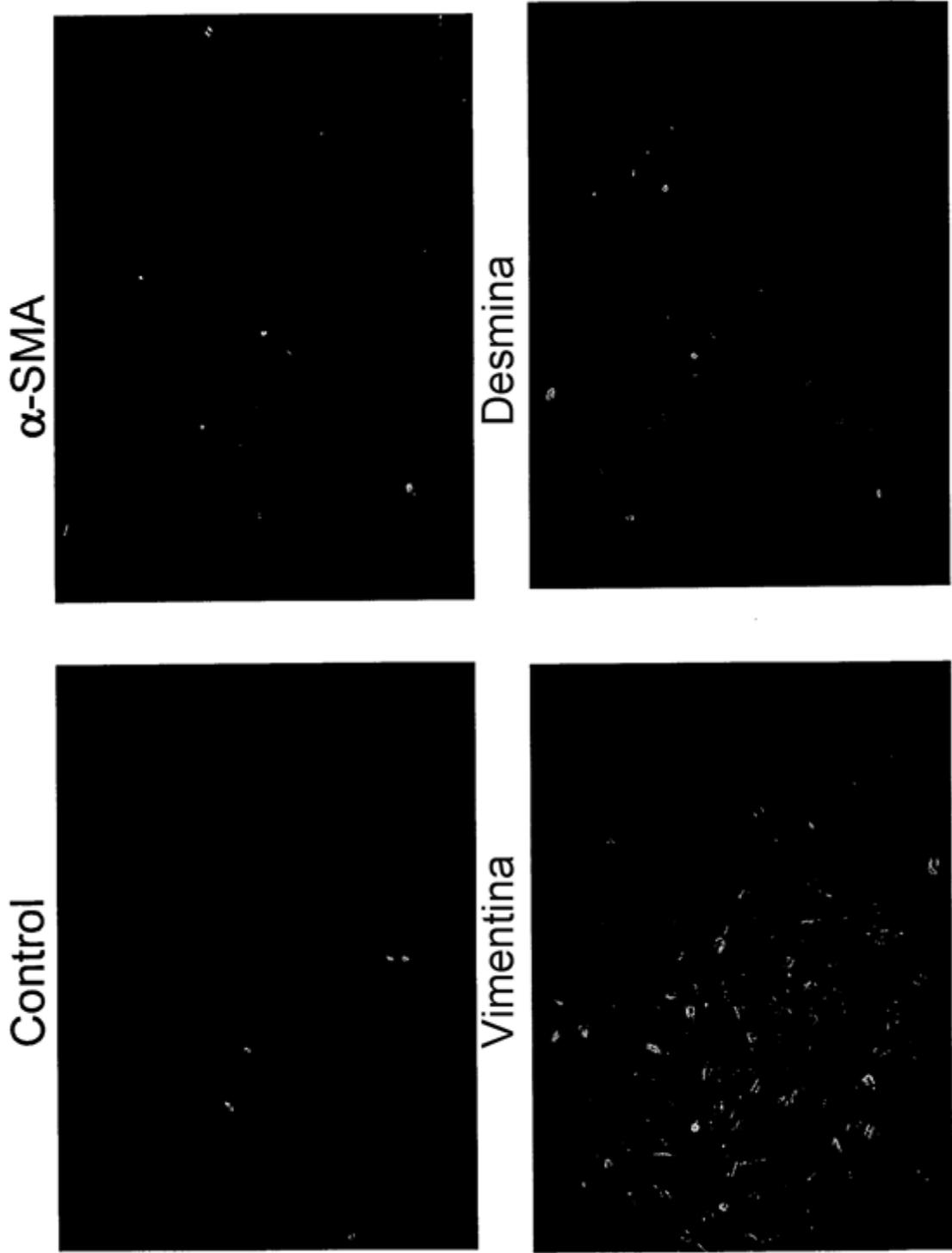
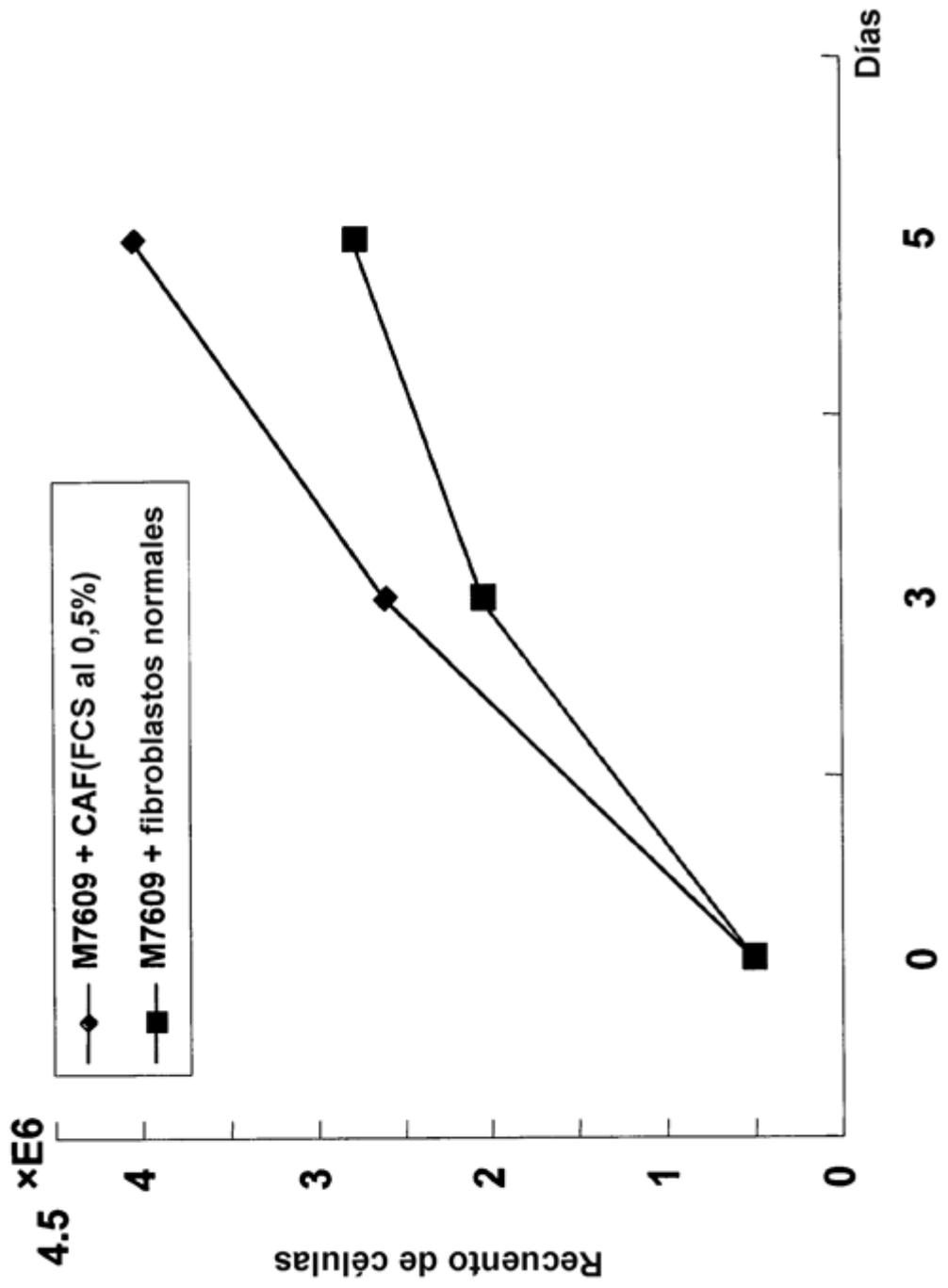


Fig. 2



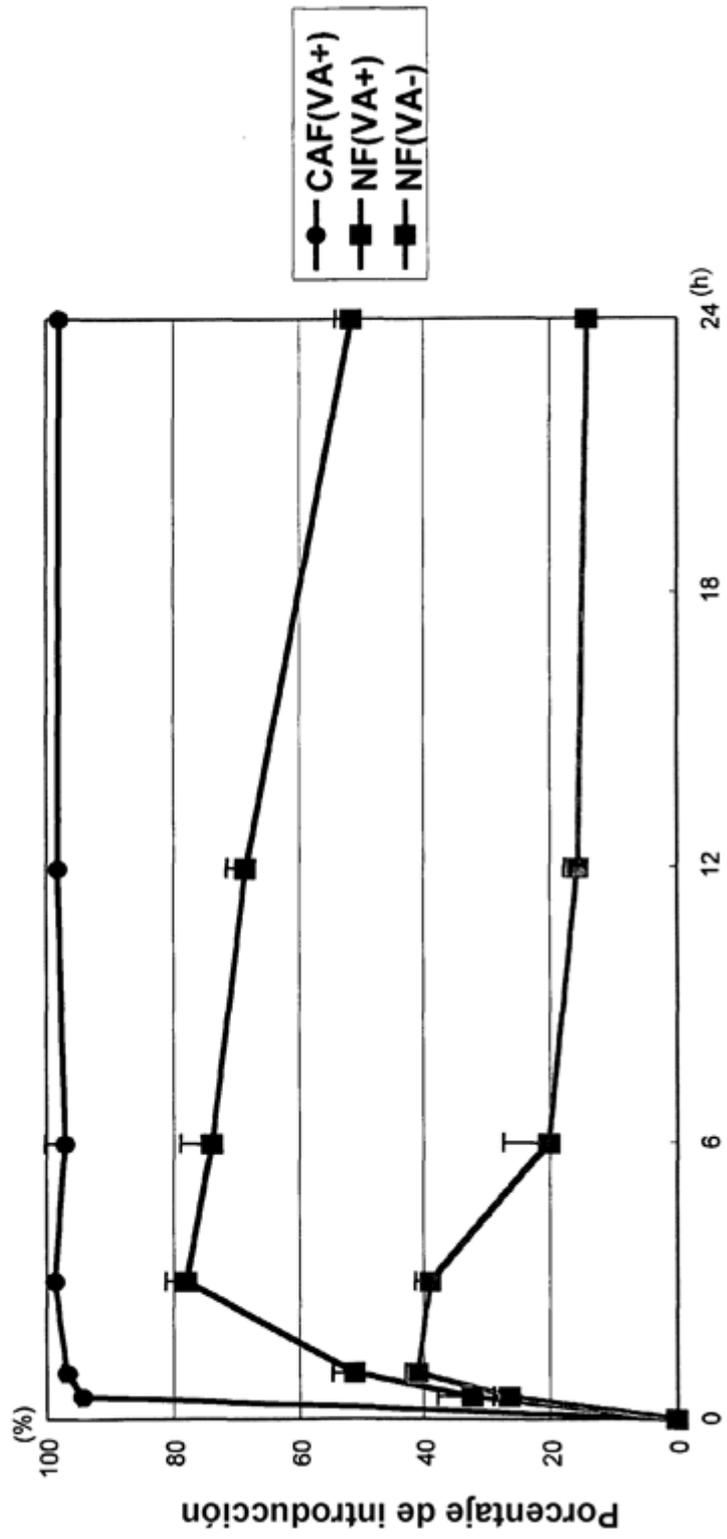
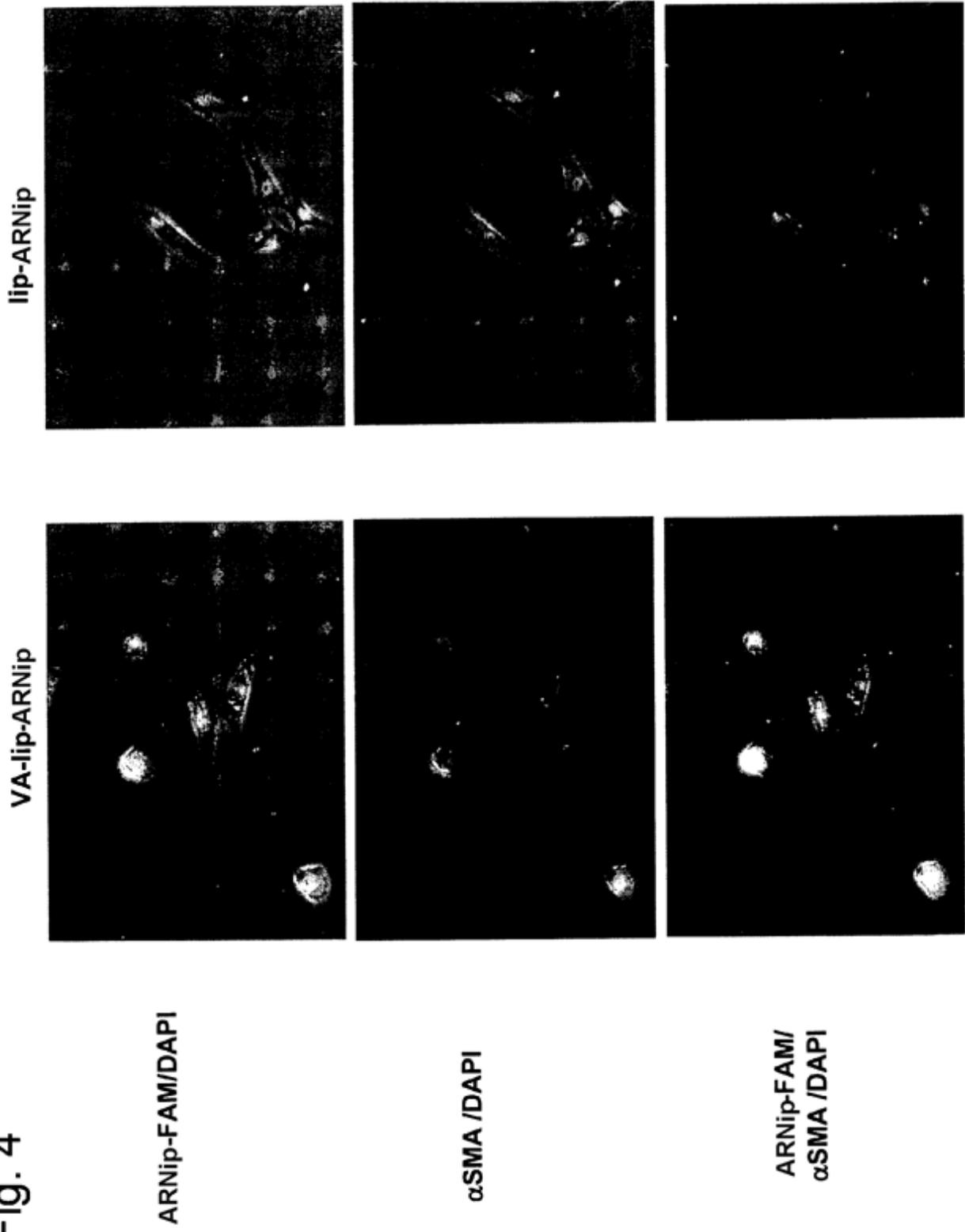


Fig. 3

Fig. 4



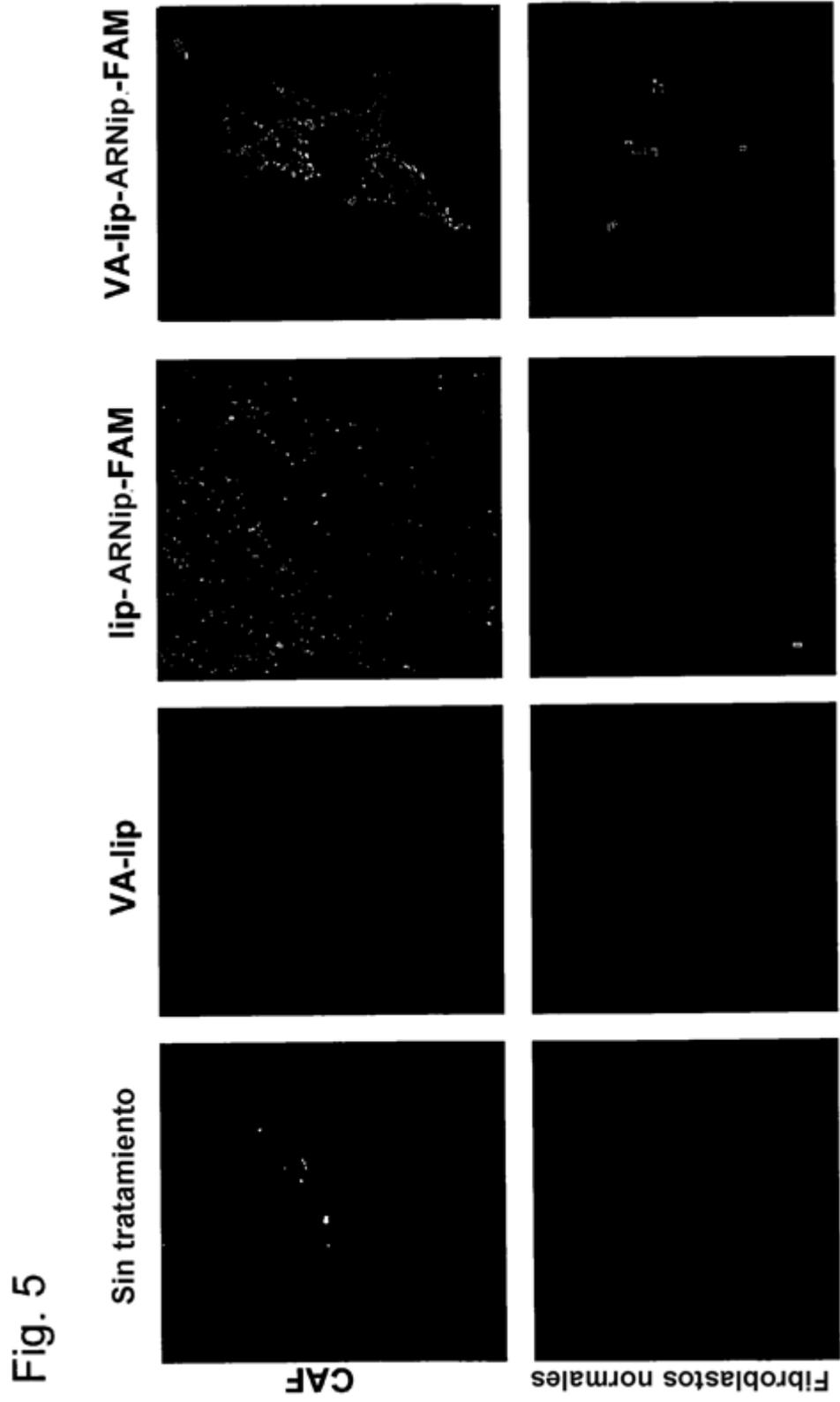


Fig. 6

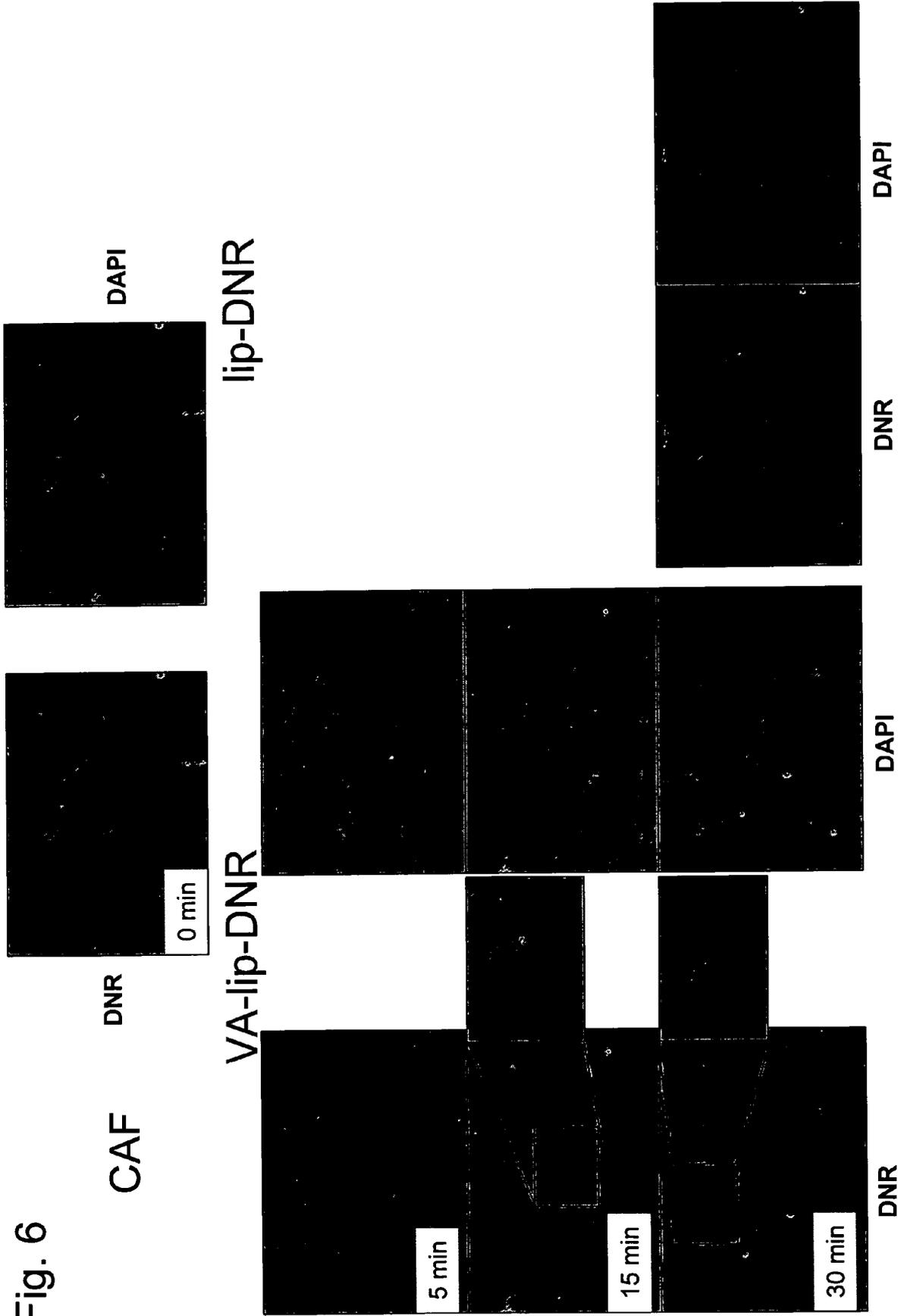


Fig. 7

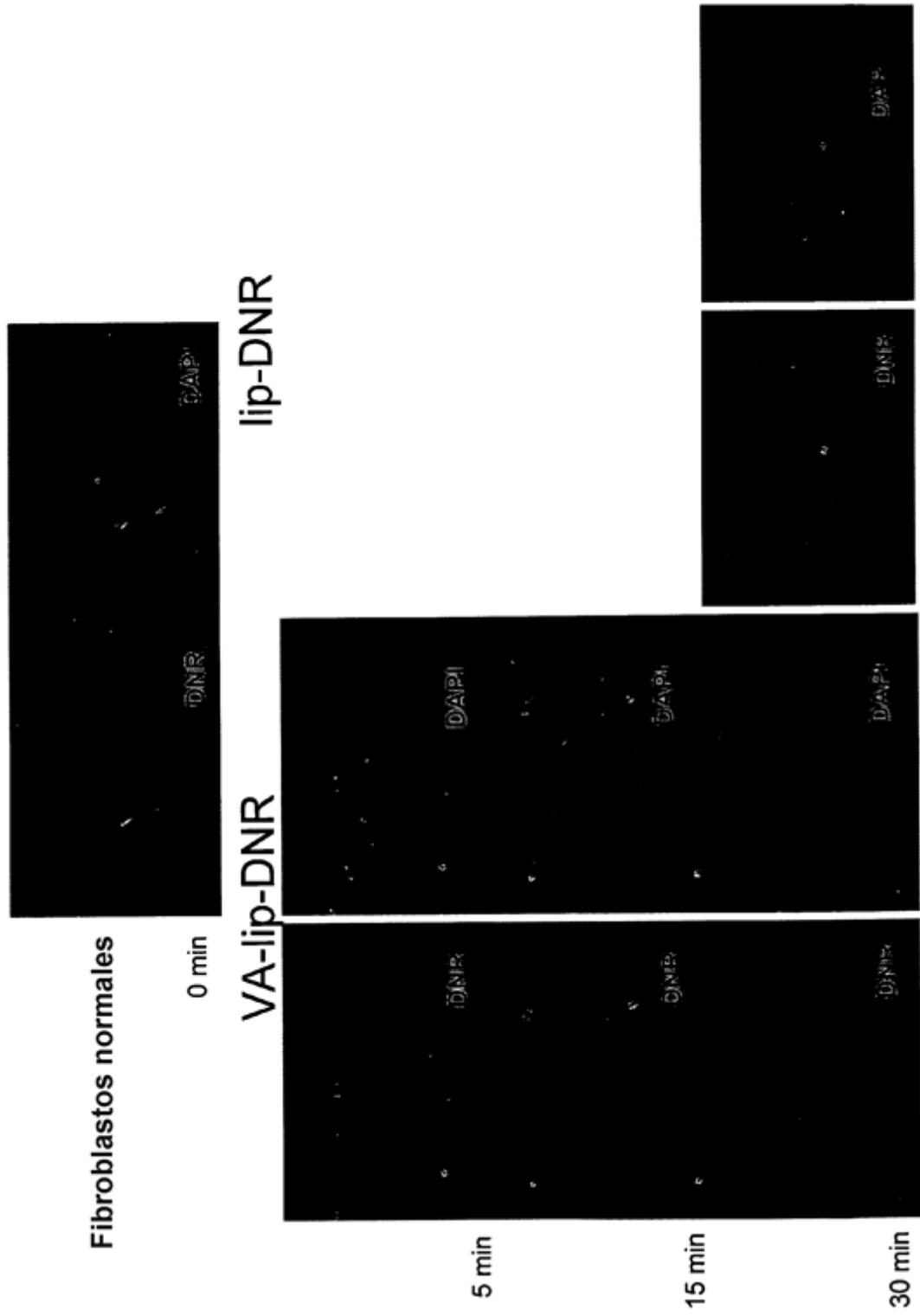


Fig. 8

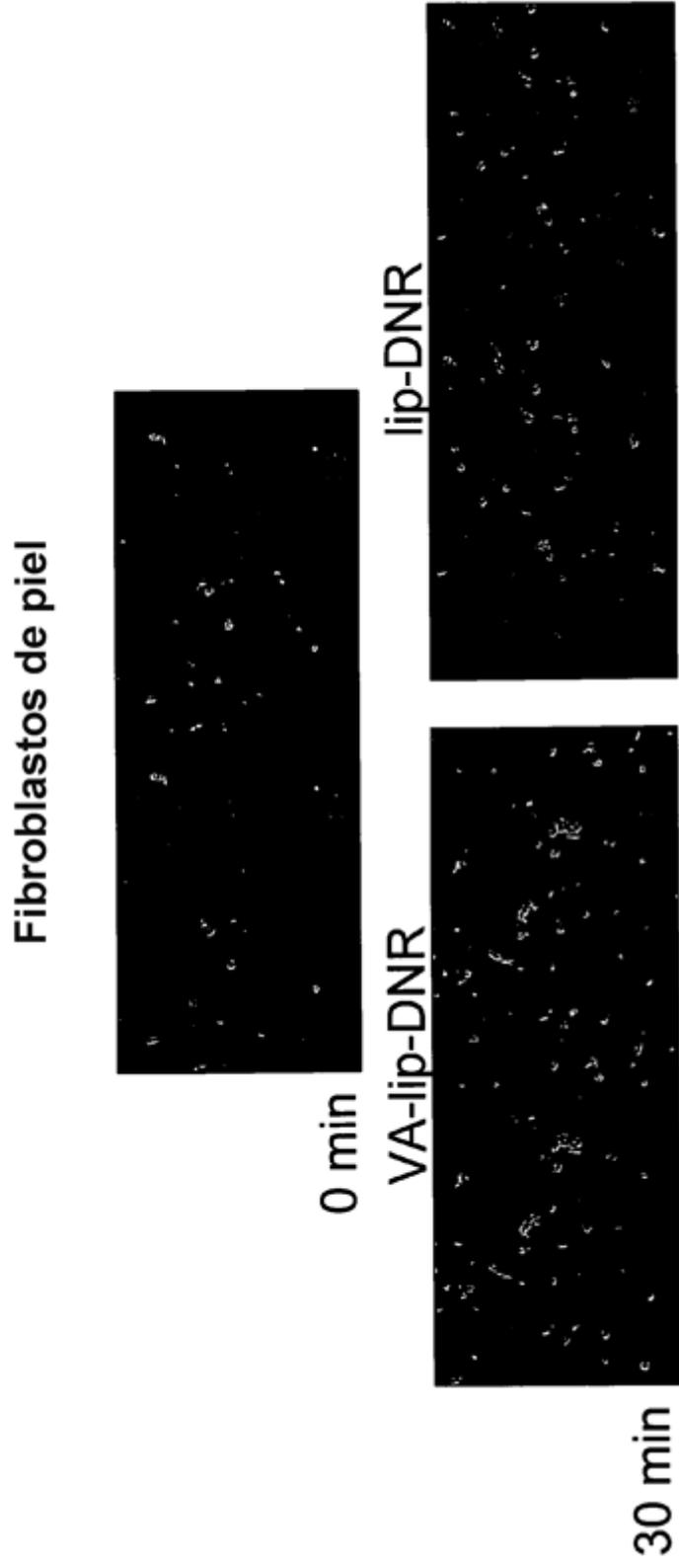
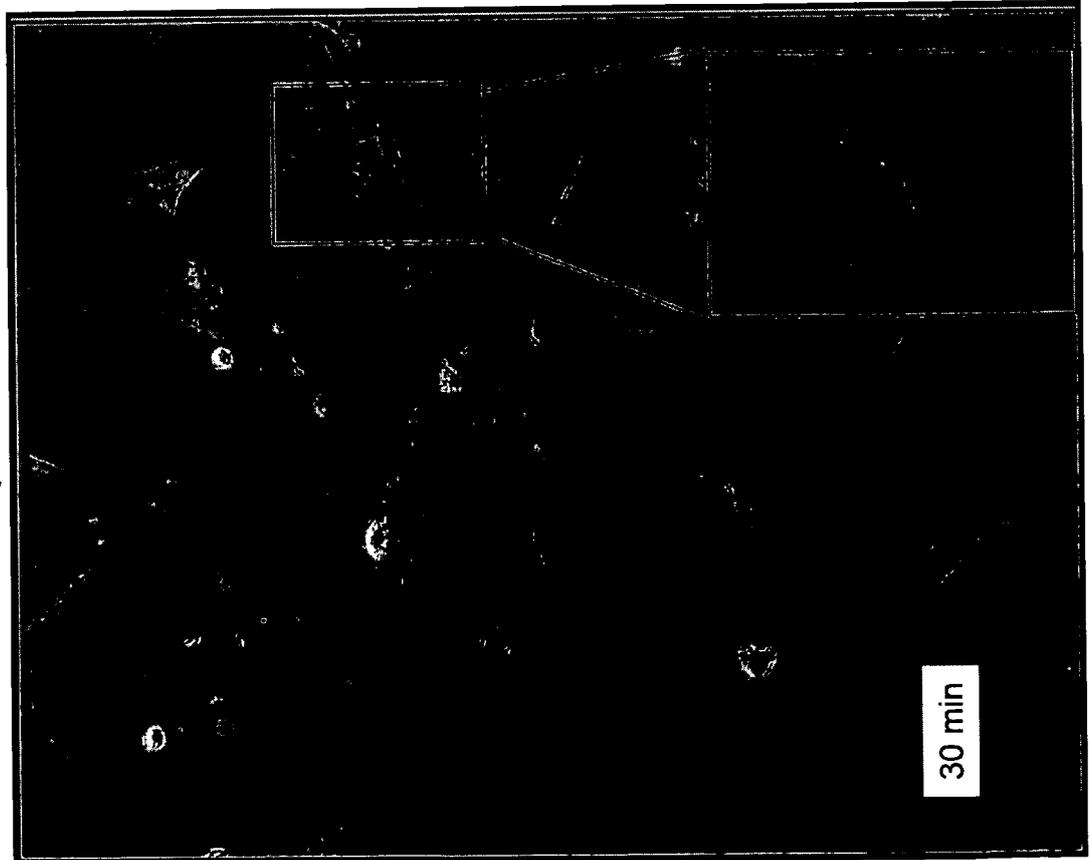


Fig. 9

VA-lip-DNR



lip-DNR

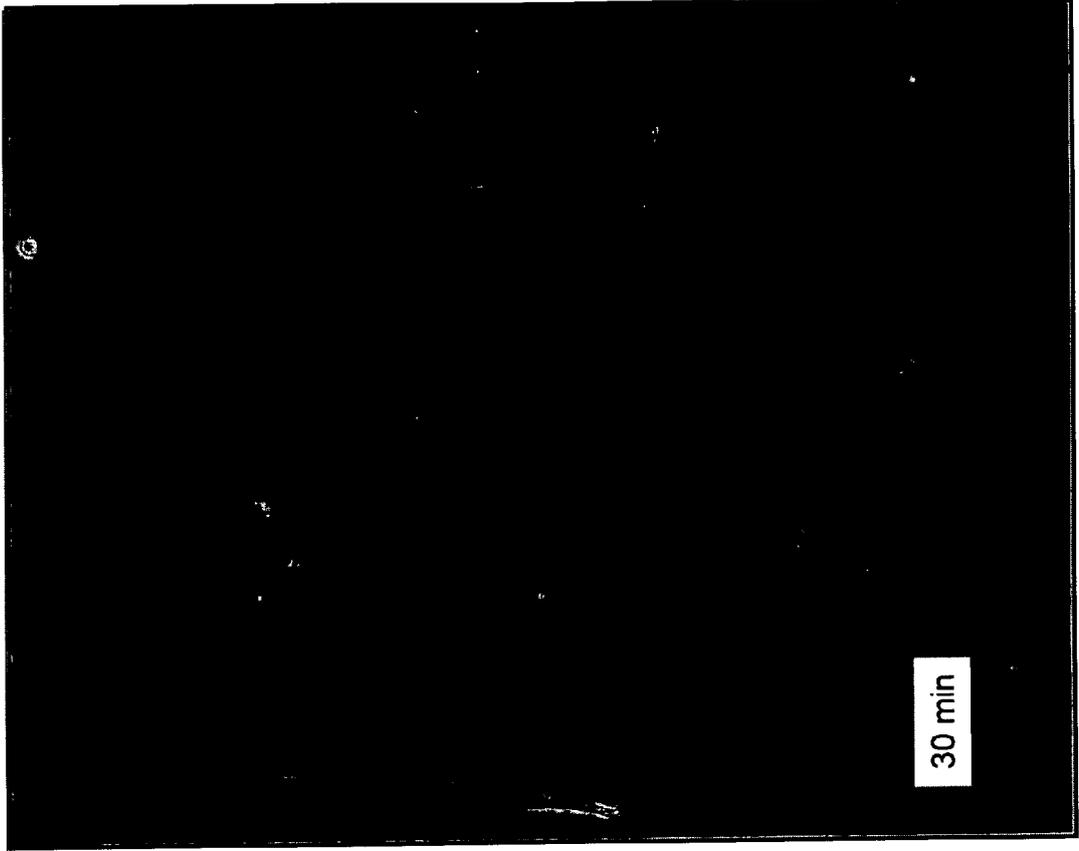
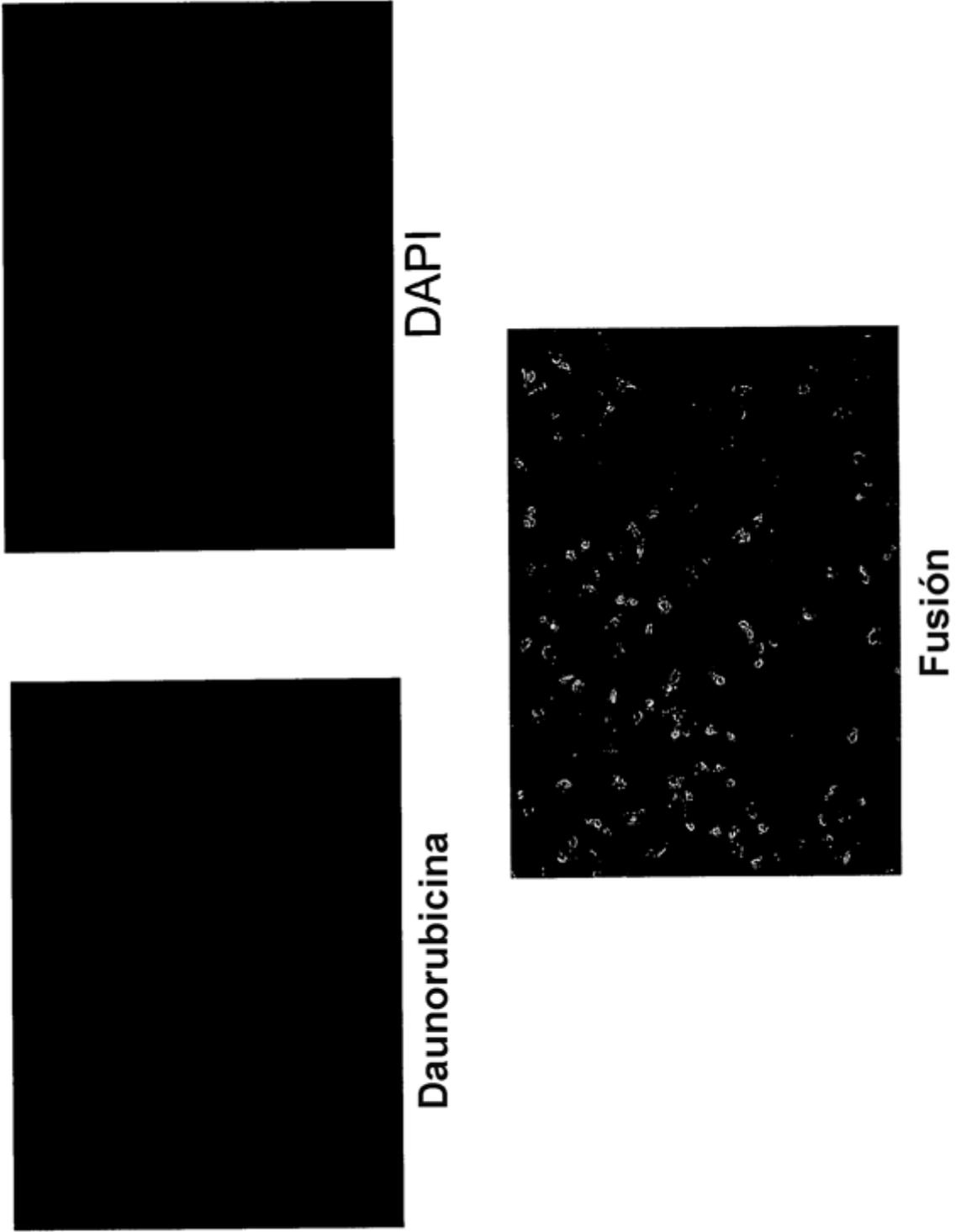
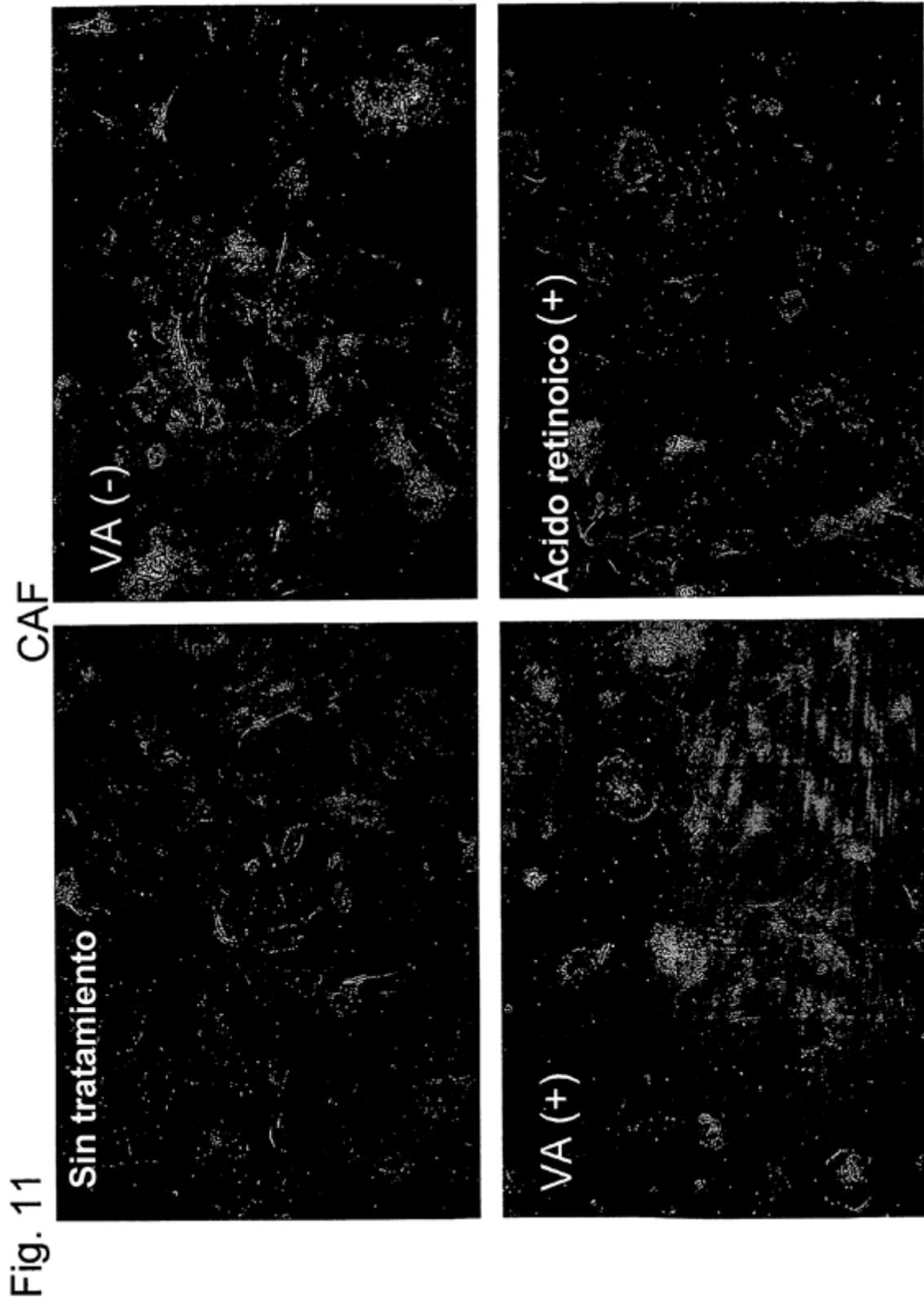
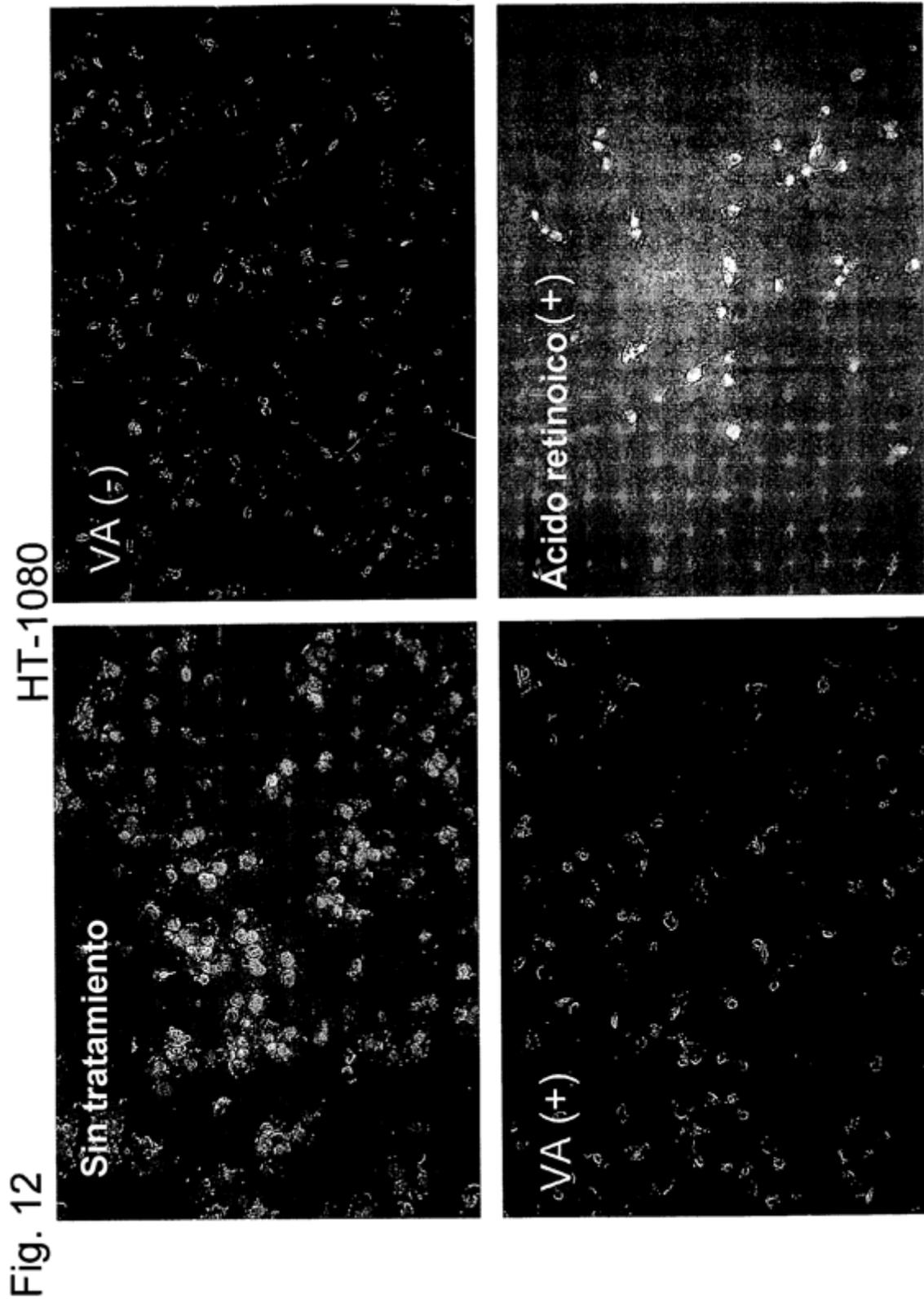


Fig. 10







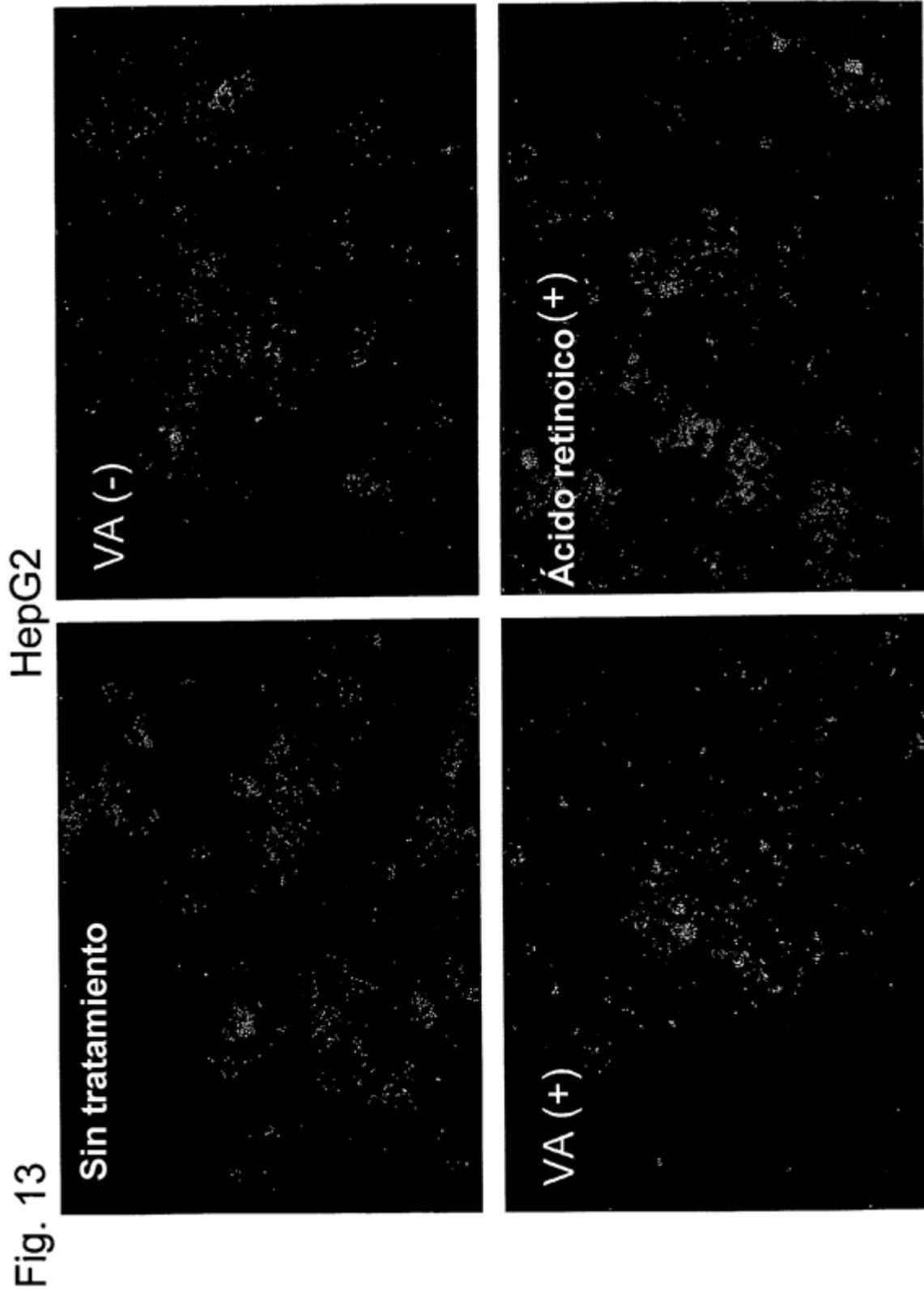


Fig. 14

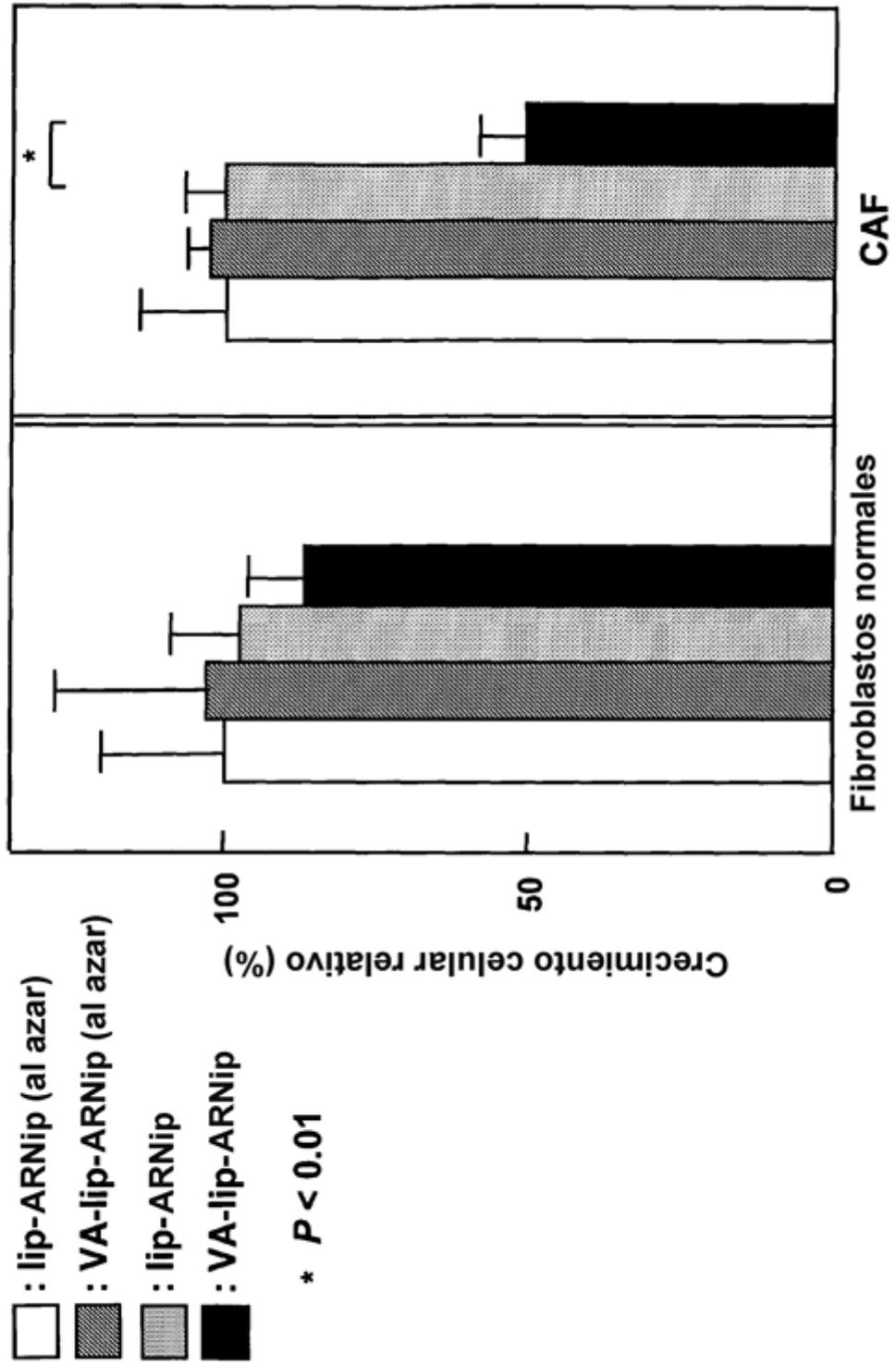


Fig. 15

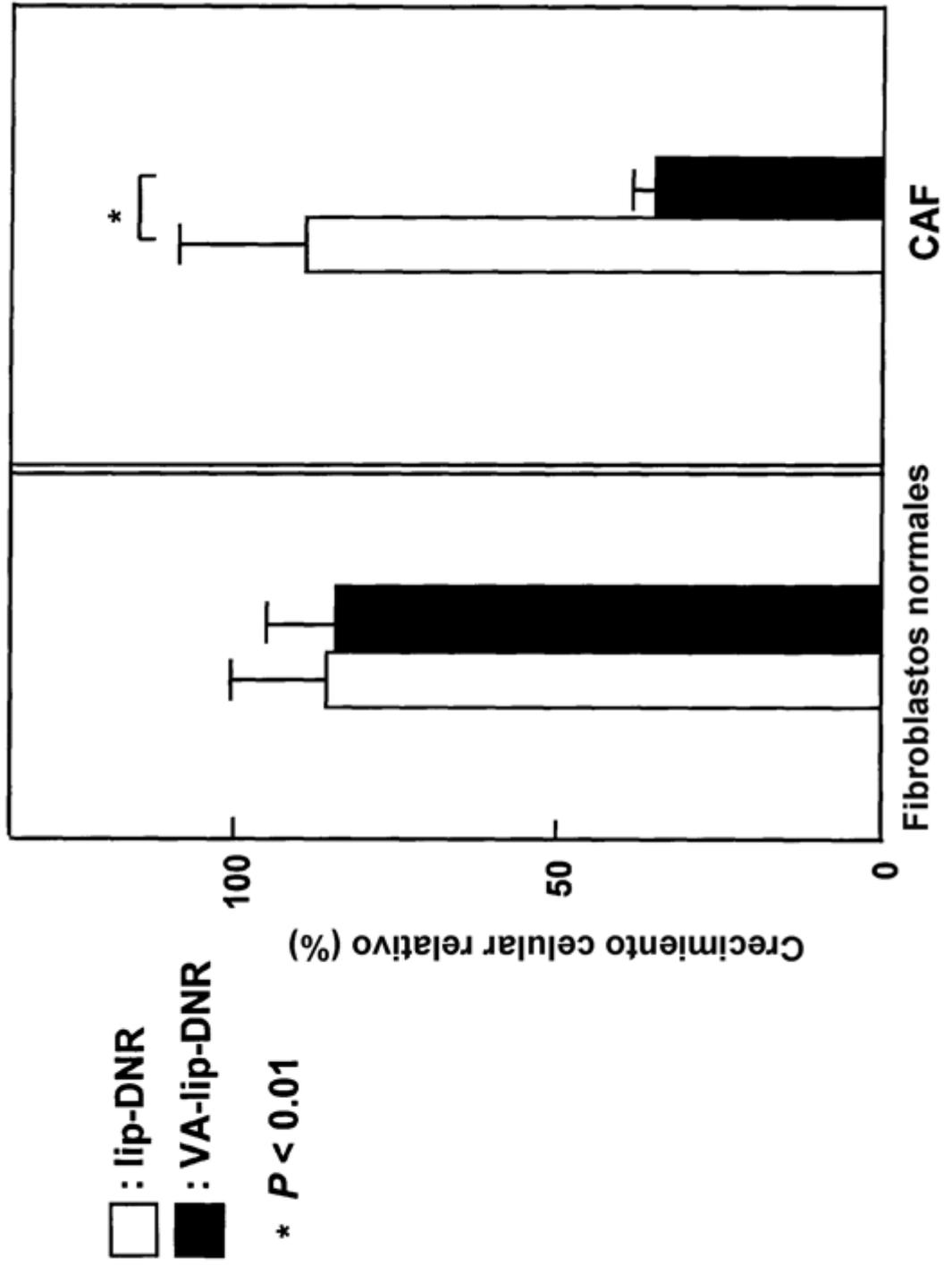


Fig. 16

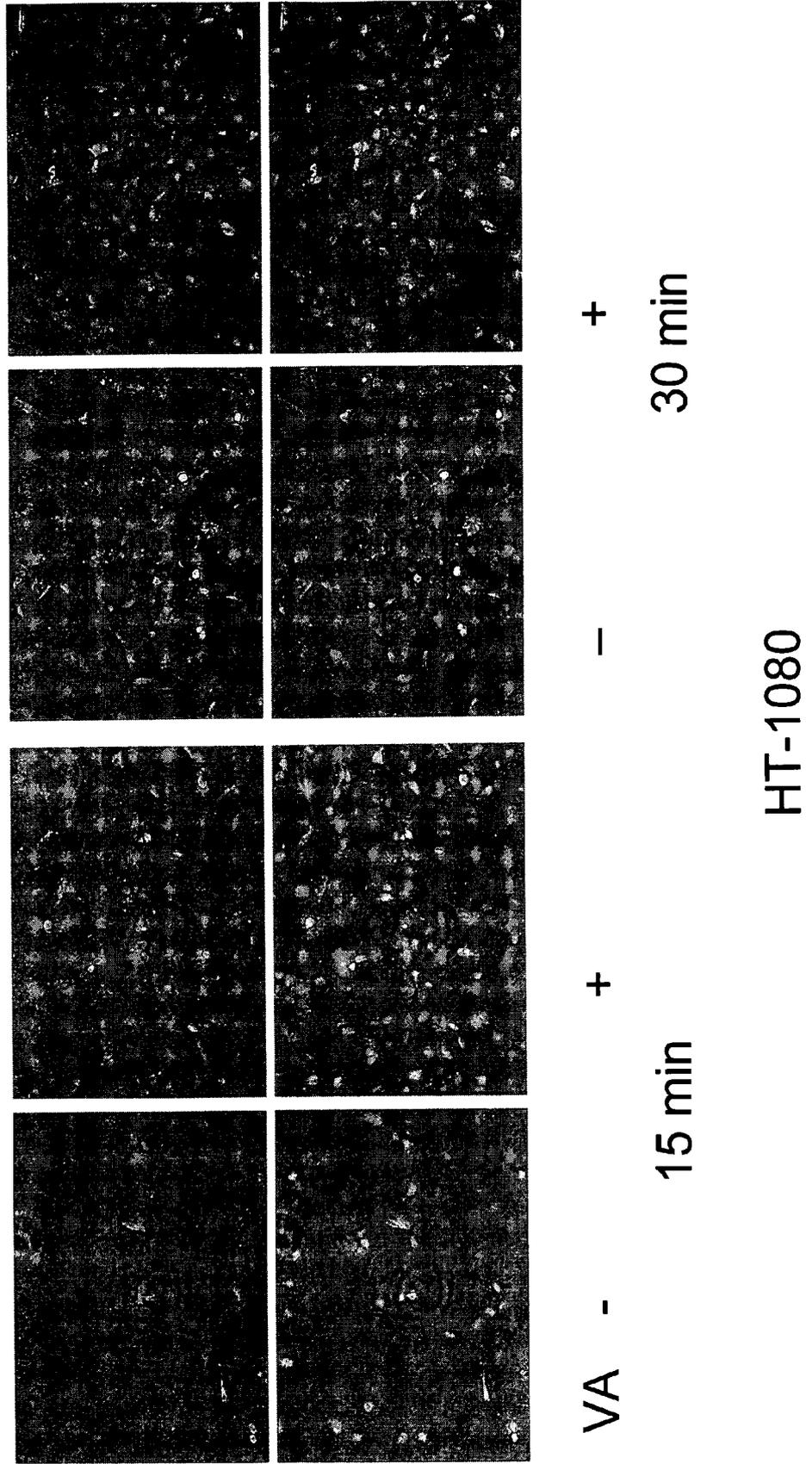


Fig. 17

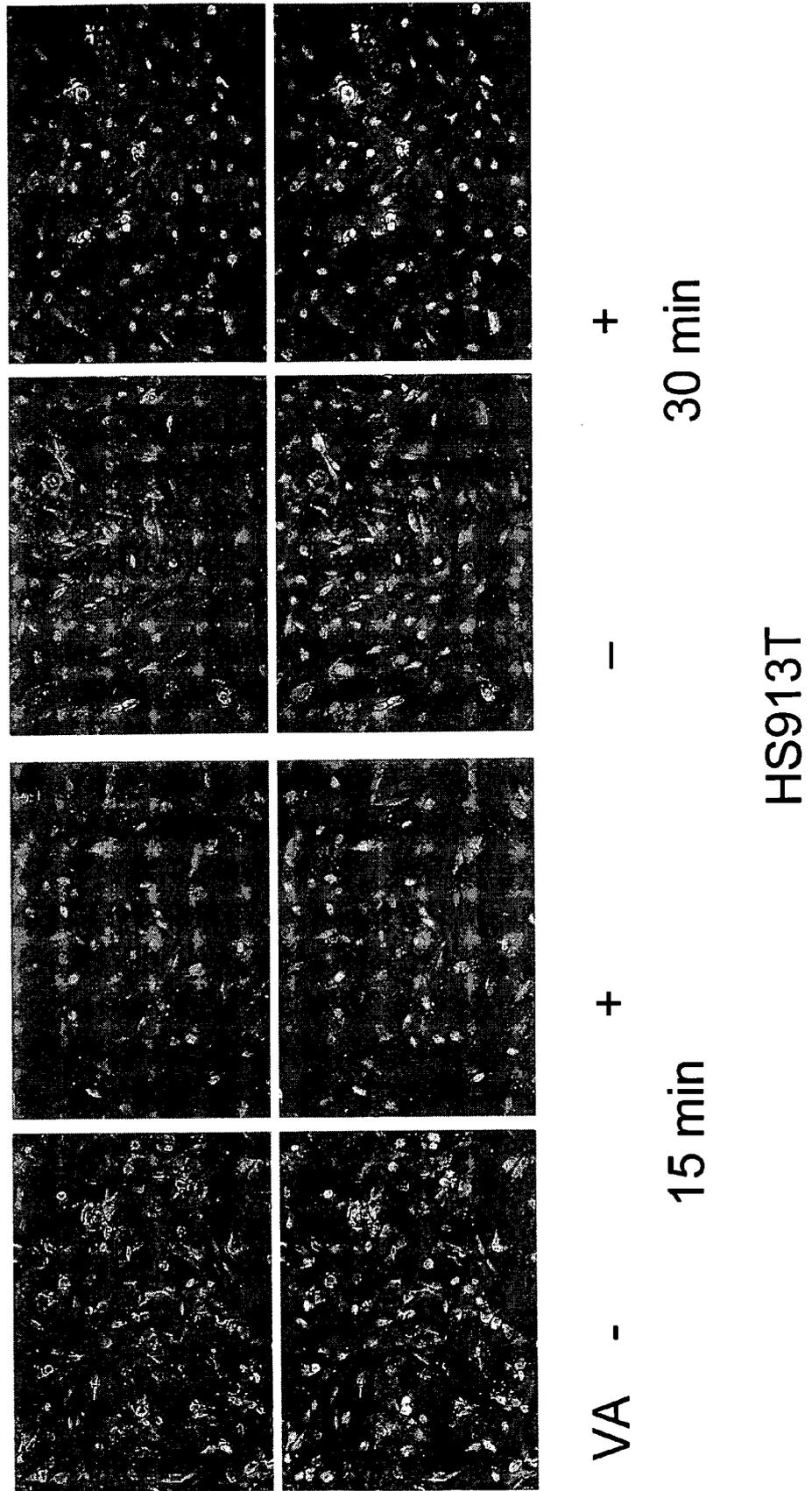


Fig. 18

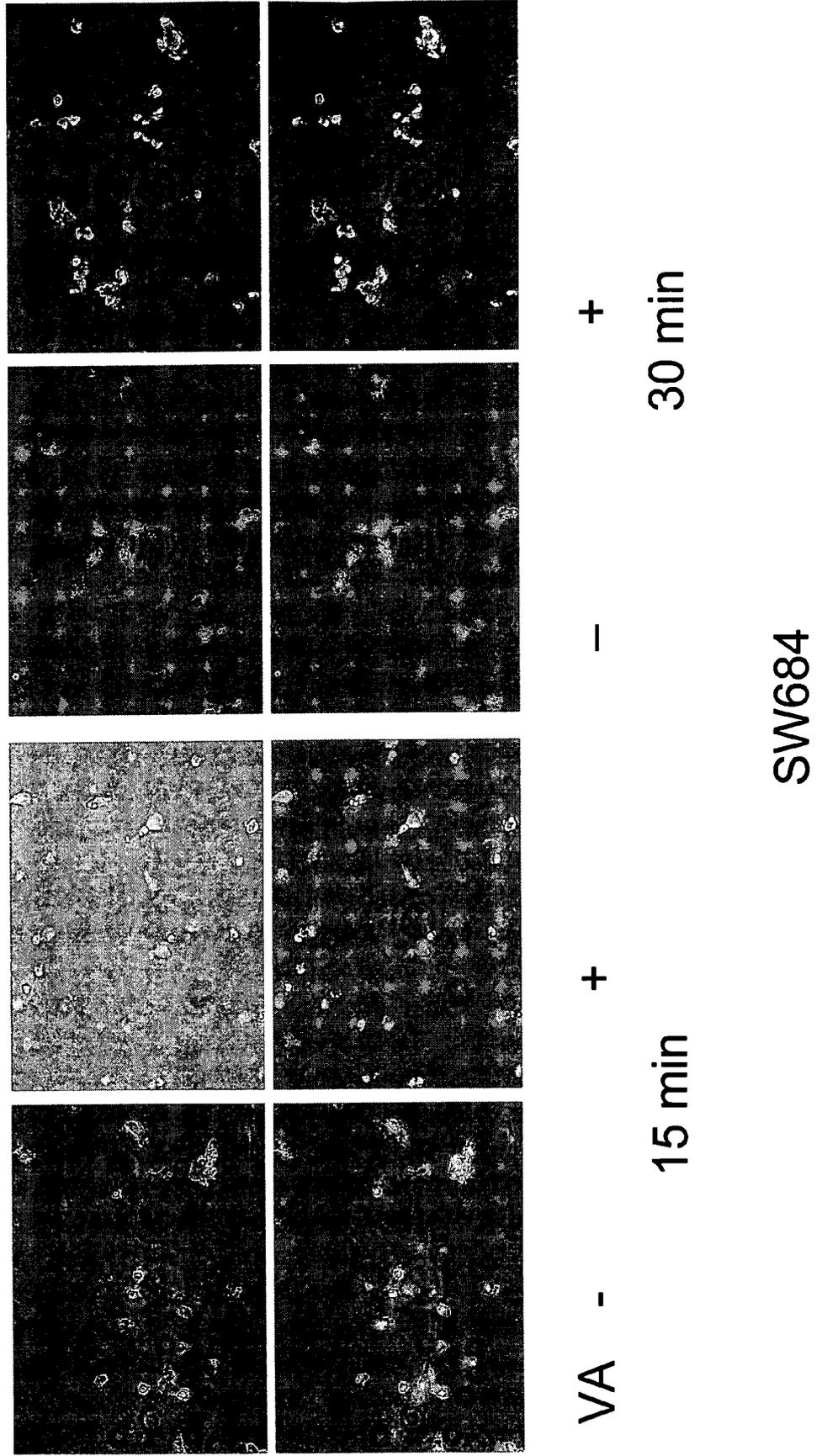


Fig. 19

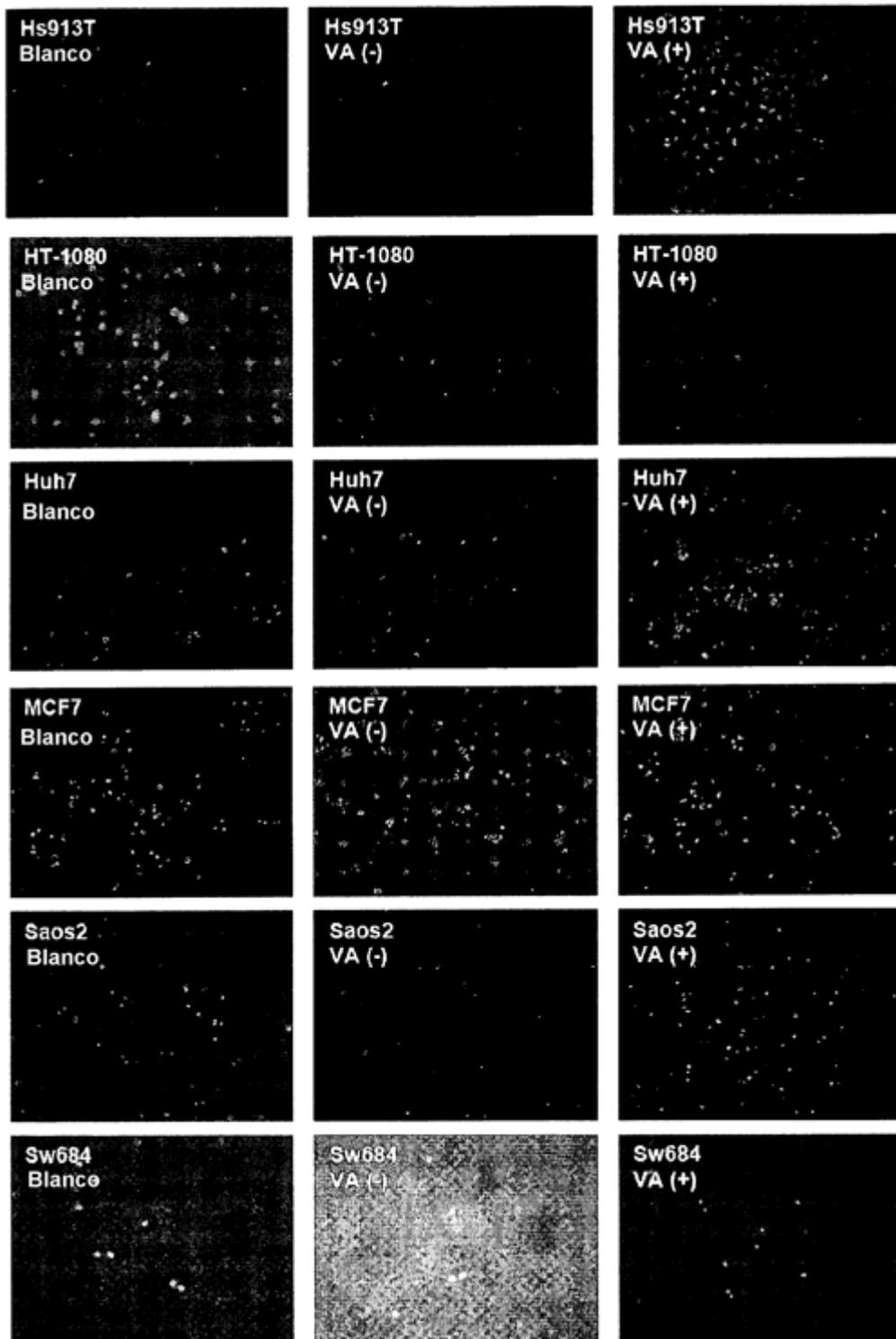


Fig. 20

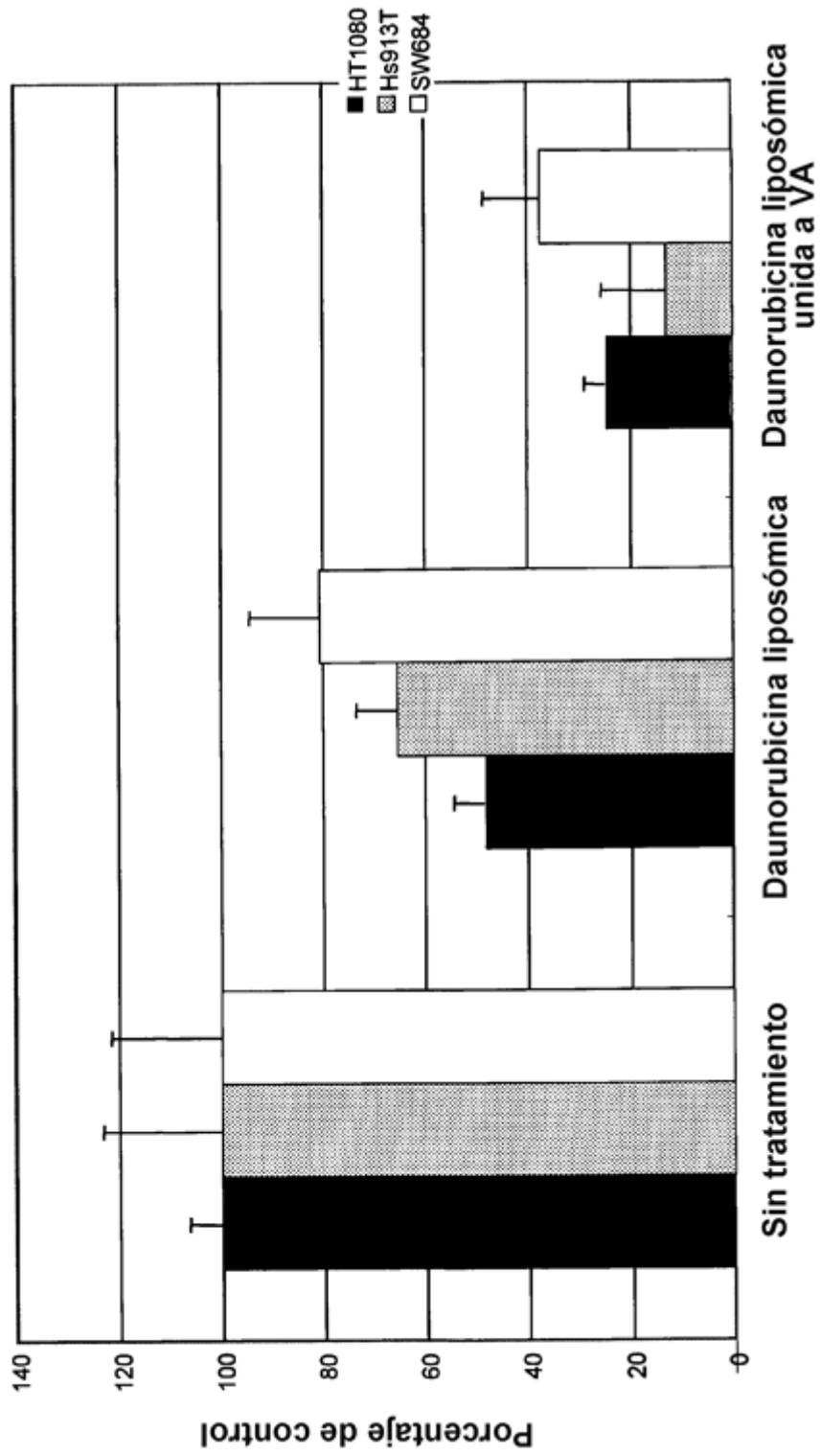


Fig. 21

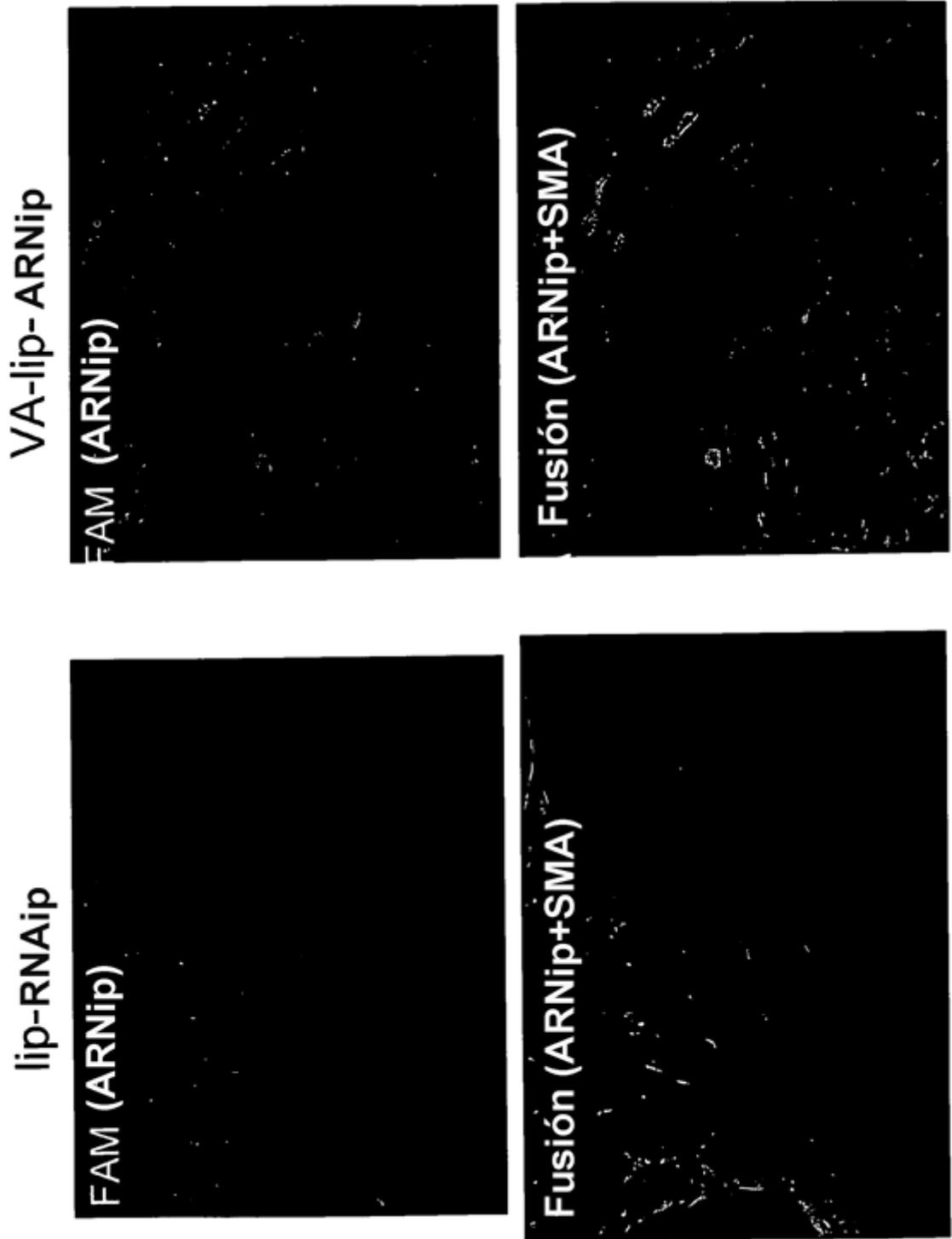


Fig. 22

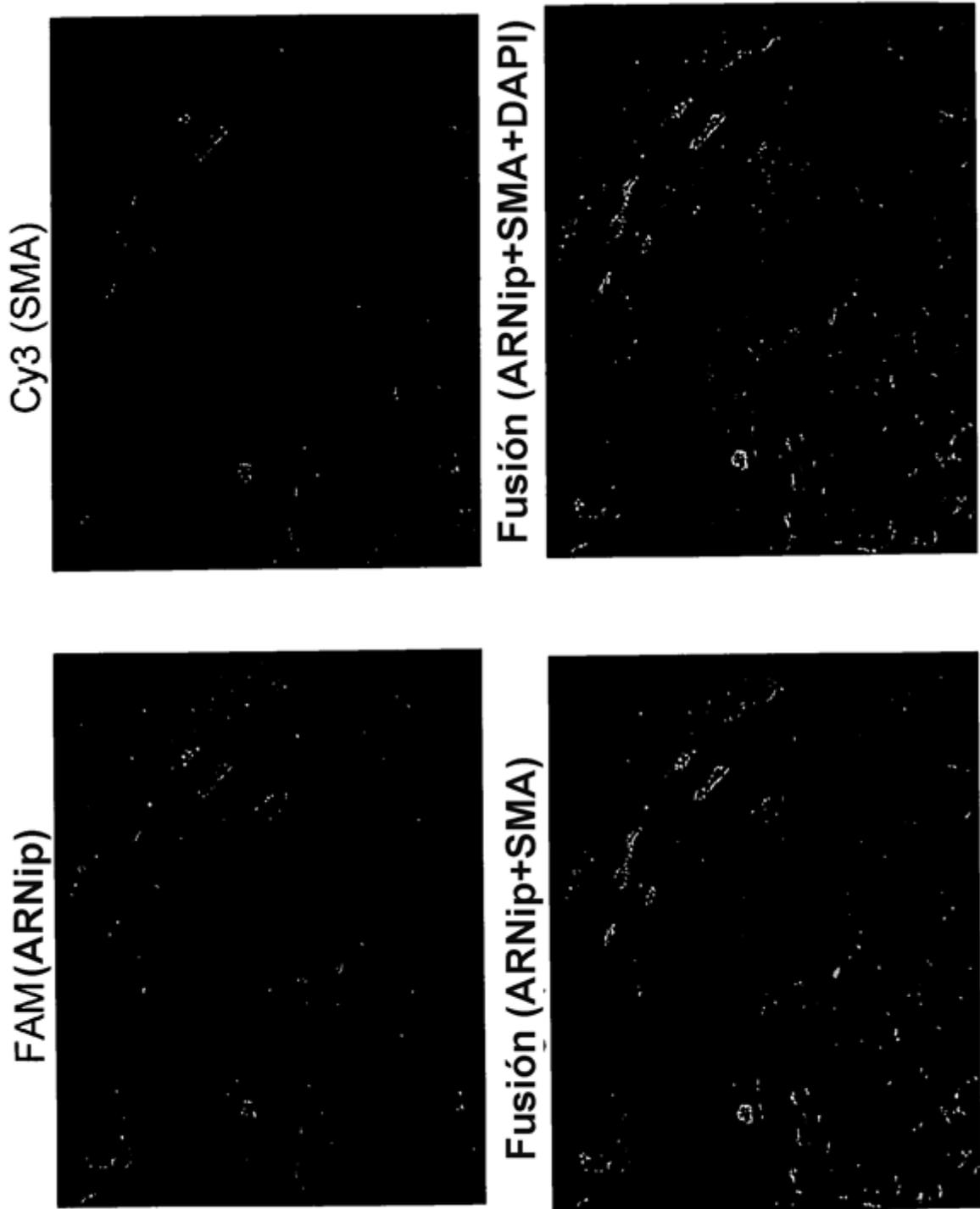


Fig. 23

