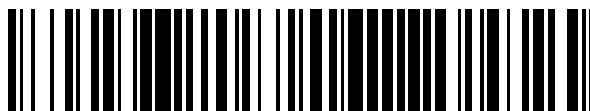


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 177**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2009** **E 09811296 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 2338519**

54 Título: **Agente para tratar la mielofibrosis**

30 Prioridad:

05.09.2008 JP 2008228338

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

27.04.2016

73 Titular/es:

NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)

1-1-2, Shimohozumi

Ibaraki-shi, Osaka 567-8680, JP

72 Inventor/es:

NIITSU, YOSHIRO y

MATSUNAGA, TAKUYA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 568 177 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agente para tratar la mielofibrosis

5 **[Campo técnico]**

La presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis, que comprende un fármaco que controla la actividad o crecimiento de una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea y un vehículo de suministro de sustancias dirigido a las células productoras de la matriz extracelular en la médula ósea, así como a un kit para preparar dicha composición.

10 **[Técnicas anteriores]**

La mielofibrosis es un término general que se refiere a enfermedades que provocan una fibrosis difundida extensa en la médula ósea, e incluye la mielofibrosis primaria de etiología desconocida y la mielofibrosis secundaria con una enfermedad subyacente. La mielofibrosis primaria pertenece a un trastorno mieloproliferativo crónico, que se caracteriza por la afectación de una fibrosis en la médula ósea en todo el cuerpo y hematopoyesis extramedular en hígado y bazo, así como la manifestación de leucoeritroblastosis en la que aparecen granulocitos y eritroblastos inmaduros en la sangre periférica. Se considera que lo esencial de la mielofibrosis primaria es una proliferación monoclonal de células hematopoyéticas debido a anomalía génica incluyendo mutación génica de Jak2 provocada a nivel de las células madre hematopoyéticas. Varias citocinas producidas por las células hematopoyéticas proliferadas (principalmente megacariocitos) actúan sobre las células estromales de médula ósea para provocar una proliferación de células estromales de médula ósea policlonales reactivas, lo que da lugar a la fibrosis de médula ósea, osteosclerosis y angiogénesis. Esto da como resultado síntomas clínicos característicos tales como una hematopoyesis ineficaz, una aparición de dacriocitos en la sangre periférica, leucoeritroblastosis y una hematopoyesis extramedular que provoca una esplenomegalia. Aproximadamente un 40 % de la mielofibrosis primaria tiene una mutación génica en Jak2, una tirosina cinasa esencial para la transducción de señales de citocinas, lo que da como resultado una activación constitutiva de Jak2, incluso en ausencia de una estimulación de citocinas. Aparte de Jak2, existen unos pocos casos con mutación génica en c-mpl (un receptor de trombopoyetina). Actualmente se considera que es difícil curar la mielofibrosis primaria por tratamiento con fármacos, y un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas es el único tratamiento curativo. Sin embargo, la tasa de mortalidad asociada con el trasplante es tan alta como de un 25 a un 48 %, lo que limita la tasa de supervivencia total a alrededor de un 50 %. Recientemente, se ha puesto de manifiesto la utilidad del trasplante no disruptivo de células madre de médula ósea (minitransplante) con menos toxicidad asociada al tratamiento, sin embargo, sólo se ha estudiado un número limitado de casos y todavía no se conocen sus pronósticos a largo plazo.

Como tratamiento de fármacos, aún siendo paliativa, se ha demostrado la eficacia de hormonas anabólicas tales como danazol y Primobolan, inhibidor de la angiogénesis tal como talidomida y lenalidomida, fármaco antitumoral tal como hidroxycarbamida, anagrelida, imatinib, 2-clorodesoxiadenosina, melfalán, busulfano y etopósido, y otros fármacos tales como eritropoyetina, para anemia, trombocitopenia y esplenomegalia (véanse las literaturas distintas de patente 1 y 2).

Por otro lado, la mielofibrosis secundaria es la que se produce secundaria a una enfermedad tal como leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, policitemia vera, trombocitemia primaria, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, linfoma maligno, carcinoma, lupus eritematoso sistémico y esclerodermia generalizada, o radiación, y muestra una imagen de médula ósea similar a la mielofibrosis primaria. El tratamiento para la mielofibrosis secundaria se centra en la mejora de la enfermedad subyacente. Sin embargo, muchas de estas enfermedades subyacentes son difíciles de curar radicalmente. Por tanto, existe una fuerte necesidad de aliviar el efecto adverso debido a la propia mielofibrosis.

En estas circunstancias, se ha realizado una gran cantidad de investigación para el desarrollo de tratamientos para la mielofibrosis. Como resultado, ha habido informes de que se proporcionaron éxitos en cierta medida en modelos animales de mielofibrosis o en ensayos clínicos, por ejemplo, inhibidores de una tirosina cinasa JAK2V617F, inhibidores de TGF- β tales como receptor de TGF- β soluble, inhibidores de NFkB tales como bortezomib, inhibidores de ADN metiltransferasa tales como decitabina, inhibidores de la histona desacetilasa tales como tricoestatina A, inhibidores de VEGF tales como PTK787/ZK222584 y bevacizumab (véase la literatura distinta de patente 1) y ciertos tipos de anticuerpos anti-linfocito humano (véase la literatura de patentes 1). La literatura distinta de patente 3 es un artículo sobre el tratamiento de la mielofibrosis idiopática que emplea ARNip para el encapsulado de proteína de choque térmico 47 (ARNip/HSP47) en liposomas. Sin embargo, ninguno de estos fármacos es satisfactorio, y se ha deseado el desarrollo de otro agente para tratar la mielofibrosis.

[Literatura de patente 1] JP A N.º 8-002.799

[Literatura de patente 2] WO 2006/068232

[Literatura distinta de patente 1] Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007; 2007:346-54

[Literatura distinta de patente 2] The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine, Vol. 96, N.º 7, Julio 10, 2007, pp. 1398-1404

5 [Literatura distinta de patente 3] WATANABE, J., *et al.* en ASH Annual Meeting Abstracts. 2007, vol. 110, n.º 11, p. 4646.

[Divulgación de la invención]

10 **[Problemas que debe solucionar la invención]**

La presente invención está dirigida a proporcionar un agente novedoso para tratar la mielofibrosis.

[Medios para solucionar los problemas]

15 Los inventores han descubierto, a través de la exploración de un agente terapéutico novedoso para la mielofibrosis, que se puede tratar eficazmente la mielofibrosis administrando una composición en la que un inhibidor de la producción de la matriz extracelular se lleva por un vehículo que comprende un retinoide, completando de este modo la invención. Aunque se ha sabido que un vehículo que comprende vitamina A puede suministrar un fármaco a células
20 estrelladas células que almacenan la vitamina A (véase la literatura de patente 2), su relación con la mielofibrosis ha sido completamente desconocida hasta la fecha. Tampoco ha habido ningún informe de que se pueda tratar la mielofibrosis por una composición que comprende como ingrediente activo un inhibidor de la producción de la matriz extracelular. Por lo tanto, los hallazgos actuales son bastante sorprendentes.

25 A saber, la presente invención se refiere a lo siguiente:

1. Una composición para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis, que comprende un fármaco que controla la actividad o crecimiento de una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, y un vehículo que
30 comprende un retinoide como un agente dirigido, en la que el fármaco que controla la actividad o crecimiento de la célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea se selecciona del grupo que consiste en un fármaco que suprime la expresión del componente de la matriz extracelular y se selecciona de un ARNip, una ribozima y ácido nucleico antisentido o un vector que expresa estos o un ARNip, una ribozima, un ácido nucleico antisentido que se dirigen a moléculas implicadas en la producción o secreción de dicho componente de la matriz extracelular, y un vector que expresa dicho ARNip, ribozima y ácido nucleico antisentido.

35 2. La composición para su uso de acuerdo con el punto 1, en la que la molécula implicada en la producción o secreción del componente de la matriz extracelular es HSP47.

40 3. La composición para su uso de acuerdo con el punto 1 o 2, en la que el retinoide comprende retinol.

4. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que el contenido de retinoide es de un 0,2 - 20 % en peso de todo el vehículo.

45 5. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en la que el vehículo tiene una forma, que se selecciona del grupo que consiste en una micela macromolecular, un liposoma, una emulsión, microesferas y nanoesferas.

50 6. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en la que el vehículo tiene una forma de un liposoma, y la proporción molar del retinoide con respecto al lípido contenido en el liposoma es de 8:1 - 1:4.

7. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 6, que se proporciona en una forma que se puede preparar inmediatamente antes de su uso.

55 8. Un kit para preparar una composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 7, que comprende uno o más recipientes que comprende individualmente o bien en combinación el fármaco que controla la actividad o crecimiento de una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, el retinoide, y si es necesario, una sustancia constitutiva de vehículo distinta del retinoide, que comprende además instrucciones para administrar la composición tal como se especifica en el punto 1,

60 en el que el fármaco que controla la actividad o crecimiento de la célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea se selecciona del grupo que consiste en un fármaco que suprime la expresión del componente de la matriz extracelular y se selecciona de un ARNip, una ribozima y ácido nucleico antisentido o un vector que expresa estos o un ARNip, una ribozima, un ácido nucleico antisentido que se dirigen a moléculas implicadas en la producción o secreción de dicho componente de la matriz extracelular, y un vector que expresa dicho ARNip, ribozima y ácido nucleico antisentido.

[Efectos de la invención]

Aunque el mecanismo de acción exacto de la composición para tratar la mielofibrosis de la presente invención aún no se ha aclarado completamente, el mecanismo se considera como sigue: con la composición, el retinoide funciona como agente dirigido a las células productoras de la matriz extracelular en la médula ósea tales como fibroblastos de médula ósea, y suministra ingredientes activos tales como agentes farmacéuticos que controlan la actividad o crecimiento de células productoras de la matriz extracelular en la médula ósea para dichas células, presentando así el efecto contra la mielofibrosis.

Puesto que los ingredientes activos se pueden administrar eficazmente en un sitio de acción y además en una célula diana, al usar el vehículo de la presente invención, se permiten el tratamiento, la supresión de la evolución, y la prevención de la aparición de la mielofibrosis, en particular, mielofibrosis primaria, de la que su tratamiento ha sido difícil hasta la fecha; por tanto, el presente vehículo contribuye significativamente a la medicina y la veterinaria.

Además, puesto que la composición de la presente invención comprende como agente activo un fármaco que controla la actividad o crecimiento de una célula productora de la matriz extracelular como se especifica en la reivindicación adjunta 1, con una eficacia para la mielofibrosis que no se conoce, puede tratar la mielofibrosis por un mecanismo diferente de los conocidos actualmente. Por lo tanto, se espera que mejore las afecciones patológicas que no se podían tratar por fármacos del mecanismo convencional, y que incremente el efecto terapéutico del uso combinado con esos fármacos convencionales.

Por otra parte, se puede combinar el vehículo que se va a usar en la presente invención con cualquier fármaco farmacéutico como se especifica en la reivindicación adjunta 1 (por ejemplo, agentes terapéuticos existentes para la mielofibrosis) para incrementar su eficacia de acción; por lo tanto, también es ventajoso por su amplia gama de aplicación en términos de formulación, lo que facilita la producción de agentes terapéuticos eficaces.

[Breve descripción de los dibujos]

[Fig. 1]

La fig. 1 muestra fotografías que muestran imágenes de médula ósea de pacientes con mielofibrosis idiopática. Tanto el paciente 1 como el paciente 2 mostraron engrosamiento trabecular por tinción con HE (columna izquierda), hiperplasia de fibra reticular por tinción de Gitter (columna central) y depósito de colágeno por tinción con azán (columna derecha).

[Fig. 2]

La fig. 2 es un diagrama que muestra la patogénesis de un ratón del modelo de mielofibrosis.

[Fig. 3]

La fig. 3 muestra fotografías que muestran imágenes de médula ósea de ratones transgénicos TPO de 4 y 7 meses de edad. La columna izquierda muestra imágenes de tinción con HE, la columna central muestra imágenes de tinción de Gitter y la columna de la derecha muestra imágenes de tinción con azán.

[Fig. 4]

La fig. 4 muestra fotografías que muestran imágenes de médula ósea de ratones transgénicos TPO de 9 y 12 meses de edad. La columna izquierda muestra imágenes de tinción con HE, la columna central muestra imágenes de tinción de Gitter y la columna de la derecha muestra imágenes de tinción con azán.

[Fig. 5]

La fig. 5 muestra fotografías que muestran la transición en el engrosamiento trabecular en ratones transgénicos TPO. El panel superior izquierdo es una imagen de tinción con HE de médula ósea a los 4 meses de edad (4M), el panel superior derecho es a los 7 meses de edad (7M), el panel inferior izquierdo es a los 9 meses de edad (9M) y el panel inferior derecho es a los 12 meses de edad (12M).

[Fig. 6]

La fig. 6 es una fotografía que muestra la morfología celular de fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivados de ratón TPO observados por un microscopio invertido (ampliación x400).

[Fig. 7]

La fig. 7 muestra diagramas que muestran los resultados de los análisis de citometría de flujo de vimentina y expresiones α -SMA en fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivados de ratón TPO. Los ejes verticales indican el número de células.

5 [Fig. 8]

La fig. 8 muestra imágenes de bandas western que muestran el efecto de diversas HSP47 ARNip sobre la expresión de HSP47 en NIH3T3 (A) y cultivos primarios de fibroblastos de médula ósea derivados de ratón TPO (fibroblastos primarios; B y C).

10 [Fig. 9]

La fig. 9 muestra diagramas que muestran el efecto de la vitamina A (VA) sobre la introducción de un ARNip de HSP47 incluido en liposoma (Lip-ARNip) en fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivados de ratón TPO. (A) y (B) muestran los resultados de análisis de citometría de flujo de e imágenes de microscopía de fluorescencia, respectivamente.

15 [Fig. 10]

20 La fig. 10 muestra diagramas que muestran el efecto de HSP47 ARNip sobre la secreción de colágeno por fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivados de ratón TPO.

[Fig. 11]

25 La fig. 11 muestra imágenes microscópicas de muestras de tinción de Gitter que muestran un efecto *in vivo* de HSP47 ARNip sobre la fibrilización de médula ósea en ratones TPO.

[Fig. 12]

30 La fig. 12 es un gráfico que muestra la cuantificación del nivel de mejora en hiperplasia de fibra reticular en ratones TPO por HSP47 ARNip por análisis de imagen. El eje vertical indica la proporción de los puntos para fibra reticular frente a los puntos enteros en cada campo.

35 [Fig. 13]

La fig. 13 muestra imágenes microscópicas de muestras de tinción con azán que muestran un efecto *in vivo* de HSP47 ARNip sobre la fibrilización de médula ósea en ratones TPO.

40 [Fig. 14]

La fig. 14 muestra imágenes microscópicas de muestras de tinción con HE que muestran un efecto *in vivo* de HSP47 ARNip sobre la fibrilización de médula ósea en ratones TPO.

[Descripción de los modos de realización]

45 La presente invención se refiere a un vehículo de suministro de sustancias para el suministro de la sustancia a una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, que comprende un retinoide como un agente dirigido. En la presente invención, la célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea no está particularmente limitada siempre que sea una célula que esté presente en la médula ósea y que tenga una capacidad de producir matriz extracelular, y típicamente incluye un fibroblasto de médula ósea. Un fibroblasto de médula ósea se caracteriza por la expresión de α -SMA (alfa-actina muscular lisa). El fibroblasto de médula ósea en la presente invención es uno de los identificados, por ejemplo, por inmunotinción usando anticuerpos anti- α -SMA marcados de forma detectable.

50 El retinoide que se va a usar en la presente invención no está particularmente limitado siempre que promueva el suministro de una sustancia a una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, y ejemplos del mismo incluyen derivados de retinoide tales como retinol (vitamina A), etretinato, tretinoína, isotretinoína, adapaleno, acitretina, tazaroteno y palmitato de retinol, así como análogos de vitamina A tales como fenretinida (4-HPR, 4-hidroxifenilretinamida) y bexaroteno.

60 El retinoide que se va a usar en la presente invención es uno de los que promueven un suministro específico de una sustancia a una célula productora de matriz extracelular en la médula ósea. El mecanismo de la promoción del suministro de sustancias por retinoide aún no se ha aclarado completamente; sin embargo, por ejemplo, se considera que un retinoide que se ha unido específicamente a una proteína de unión a retinol (RBP) se incluye en una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea a través de un determinado receptor presente en la superficie de esta célula.

65

Un retinoide es un miembro de una clase de compuestos que tienen un esqueleto en el que cuatro unidades isoprenoides están unidas de manera cabeza a cola (véase G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents", 2ª ed. Portland Press, pp. 247-251 (1992)). La vitamina A es un descriptor genérico para un retinoide que muestra cualitativamente la actividad biológica de retinol. El retinoide que se puede usar en la presente invención no está particularmente limitado, 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.

De estos, 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 (tal como retinoato de etilo) son preferentes desde el punto de vista de la eficiencia de suministro específico de una sustancia a células productoras de la matriz extracelular en la médula ósea.

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

El vehículo que se va a usar en la presente invención se puede constituir a partir del retinoide por sí solo o se puede constituir uniendo el retinoide a un componente constitutivo de vehículo distinto del retinoide, o encerrando el retinoide en un componente constitutivo de vehículo distinto del retinoide. Por lo tanto, el vehículo que se va a usar en la presente invención puede comprender un componente constitutivo de vehículo distinto del retinoide. Un componente de este tipo no está particularmente limitado, y se puede usar cualquier componente conocido en los campos medicinal y farmacéutico, pero son preferentes los que pueden encerrar el retinoide o se pueden unir al retinoide.

Los ejemplos de un componente de este tipo incluyen un lípido, por ejemplo, un fosfolípido tal como glicerofosfolípido, un esfingolípido tales 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 están limitados a estos. Entre ellos, son preferentes los que pueden formar un liposoma, por ejemplo, un fosfolípido natural tal como lecitina, un fosfolípido semisintético tal como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), y dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilauroilfosfatidilcolina (DLPC), y colesterol.

Un componente particularmente preferente es un componente que puede evitar la captura por el sistema reticuloendotelial, y los 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-propanaminio (DOSPA), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de dioctadecildimetilamonio (DODAC), bromuro de didodecilamonio (DDAB), 1,2-dioleiloxi-3-trimetilamoniopropano (DOTAP), 3p-[N-(N', N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol), 1,2-dimiristoiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), y cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dielanolamina (DC-6-14).

La unión del retinoide al vehículo para su uso en la presente invención o el encerramiento del mismo en el mismo también se hace posible mediante uniendo el retinoide o encerrándolo en un elemento constitutivo de vehículo distinto del retinoide por un procedimiento químico y/o físico. De forma alternativa, el retinoide se puede unir a o encerrar en el vehículo para su uso en la presente invención mezclando el retinoide y los elementos constitutivos de vehículo distintos del retinoide durante la preparación del vehículo. La cantidad de retinoide unido a o encerrado en el vehículo para su uso en la presente invención puede ser, como proporción en peso de los componentes del elemento constitutivo de vehículo, de un 0,01 % a un 100 %, preferentemente de un 0,2 % a un 20 %, y más preferentemente de un 1 % a un 5 %. El retinoide se puede unir a o encerrar en el vehículo antes de cargar un fármaco en el vehículo; o el vehículo, el retinoide y el fármaco se pueden mezclar simultáneamente; o el retinoide se puede mezclar con el vehículo que ya lleva el fármaco, etc. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para producir una formulación específica para una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, comprendiendo el procedimiento una etapa de unir un retinoide a cualquier vehículo de unión a fármaco o vehículo de encapsulación de fármaco existente, por ejemplo, una formulación liposomal como DaunoXome®, Doxil, Caelyx® o Myocet®.

El vehículo para su uso en la presente invención puede estar en cualquier forma, siempre que se pueda transportar una sustancia u objeto deseado a una célula productora de la matriz extracelular objetivo en la médula ósea, y aunque no está limitado a esto, los ejemplos de los mismos incluyen una micela macromolecular, un liposoma, una emulsión, microesferas y nanoesferas. En la presente invención, una forma liposomal es preferente entre éstas desde el punto de vista de una eficacia de suministro alta, una amplia selección de sustancias que se van a suministrar, y una facilidad de formulación, etc., y un liposoma catiónico que incluye un lípido catiónico es particularmente preferente. En el caso en el que el vehículo es en forma de un liposoma, la proporción molar del retinoide con respecto a otros componentes del liposoma es preferentemente de 8:1 a 1:4, más preferentemente de 4:1 a 1:2, aún más preferentemente de 3:1 a 1:1, y de forma particularmente preferente 2:1, considerando la eficacia en la unión del retinoide a o en el

encerramiento en el vehículo.

El vehículo para su uso en la presente invención puede contener una sustancia que se va a transportar en su interior, se puede unir al exterior de una sustancia que se va a transportar, o se puede mezclar con una sustancia que se va a transportar, en el que dicha sustancia que se va a transportar es el fármaco especificado en la reivindicación adjunta 1, siempre que comprenda retinoide en una forma tal que el retinoide pueda funcionar como un agente dirigido. "Funcionar como un agente dirigido" en el presente documento quiere decir que el vehículo comprende un retinoide que alcanza y/o se absorbe por la célula diana, es decir, una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, más rápidamente y/o en una cantidad mayor que con un vehículo que no comprende el retinoide, y esto se puede confirmar fácilmente, por ejemplo, añadiendo un vehículo marcado o un vehículo que contiene un marcador a un cultivo de células diana y analizando la distribución del marcador después de un período de tiempo predeterminado. Estructuralmente, se puede satisfacer este requisito, por ejemplo, si la vitamina A está expuesta al menos parcialmente al exterior de la formulación que contiene el vehículo, como muy tarde en el momento en que alcanza la célula diana. Se puede evaluar si el retinoide está o no expuesto en el exterior de una formulación poniendo en contacto la formulación con una sustancia que se une específicamente al retinoide, tal como una proteína de unión a retinol (RBP), y evaluando su unión a la formulación.

La sustancia u objeto que se suministra por el presente vehículo es el fármaco especificado en la reivindicación adjunta 1, y preferentemente tiene un tamaño tal que se puede mover físicamente dentro del cuerpo de un organismo desde el sitio de administración al sitio de la lesión en el que está presente la célula diana. Por lo tanto, el vehículo para su uso en la presente invención puede transportar la fármaco especificado en la reivindicación adjunta 1. El fármaco tiene la propiedad de controlar (por ejemplo, incrementar o suprimir) la actividad o crecimiento de la célula diana.

Por lo tanto, en la presente invención, lo que se suministra por el vehículo es "un fármaco que controla la actividad o crecimiento de una célula productora de matriz extracelular en la médula ósea" como se especifica en la reivindicación adjunta 1. La actividad de la célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea en el presente documento se refiere a diversas actividades tales como secreción, absorción o migración presentada por una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, y en la presente invención, en particular, entre estas, típicamente quiere decir una actividad implicada en la aparición, evolución y/o recidiva de mielofibrosis. Los ejemplos de dichas actividades incluyen, pero no se limitan a, la producción/secreción de una sustancia bioactiva tal como gelatinasa A y gelatinasa B (MMP2 y MMP9, respectivamente) y angiotensinógeno, y de un componente de la matriz extracelular tal como colágeno, proteoglicano, tenascina, fibronectina, trombospondina, osteopontina, osteonectina y elastina.

Por lo tanto, el fármaco que controla la actividad o crecimiento de una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea puede ser cualquier fármaco que suprime directa o indirectamente las acciones físicas, químicas y/o fisiológicas de dicha célula relacionadas con la aparición, evolución y/o recidiva de mielofibrosis, siempre que sea un fármaco que suprime la expresión del componente de la matriz extracelular y se selecciona de un ARNip, una ribozima y ácido nucleico antisentido (incluyendo ARN, ADN, ANP (ácido nucleico peptídico), o un compuesto de los mismos), o un vector que expresa estos o un ARNip, una ribozima, un ácido nucleico antisentido que se dirigen a moléculas implicadas en la producción o secreción de dicho componente de la matriz extracelular, y un vector que expresa dicho ARNip, ribozima, y ácido nucleico antisentido y de forma particularmente preferente, inhibidores contra la proteína de choque térmico 47 (HSP47), entre otros, ARNip contra HSP47.

La sustancia u objeto suministrado por el vehículo para su uso en la presente invención puede o no estar marcada. El marcado permite el seguimiento del éxito o fracaso del transporte, o incrementa y disminuye en células diana, etc., y es particularmente útil a nivel de prueba/investigación. Un marcador se puede seleccionar de cualquier marcador conocido para una persona experta en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier radioisótopo, material magnético, sustancia que se une a una sustancia marcada (por ejemplo, un anticuerpo), sustancia fluorescente, fluoróforo, sustancia quimioluminiscente y enzima, etc.

En la presente invención, "a una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea" o "para el suministro a una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea" quiere decir que es adecuado el uso para las células productoras de la matriz extracelular como una célula diana, y esto incluye, por ejemplo, que sea posible suministrar una sustancia a esta célula, de forma más rápida, eficazmente, y/o en una cantidad mayor que a otras células, por ejemplo, células normales. Por ejemplo, el vehículo para su uso en la presente invención puede suministrar una sustancia a una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea a una tasa y/o eficacia de 1,1 veces o más, 1,2 veces o más, 1,3 veces o más, 1,5 veces o más, 2 veces o más, o incluso 3 veces o más en comparación con otras células.

La presente invención se refiere por tanto a una composición para tratar la mielofibrosis, comprendiendo la composición el fármaco que controla la actividad o crecimiento de la célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea como se especifica en la reivindicación adjunta 1, y la presente invención también se refiere a un uso del fármaco que controla la actividad o crecimiento de la célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea como se especifica en la reivindicación adjunta 1 en la producción de dichas composiciones. El fármaco puede estar contenido en la composición solo o junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición de la presente invención se puede dirigir a una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, que será la diana, para

el suministro eficaz a dicha célula. El modo de dirección no está particularmente limitado siempre que incluya la adición de un retinoide. En consecuencia, la presente invención incluye un retinoide como agente dirigido, y más preferentemente, incluye un vehículo que comprende el retinoide mencionado anteriormente como agente dirigido.

En la presente invención, la mielofibrosis incluye mielofibrosis primaria, así como mielofibrosis secundaria. La mielofibrosis secundaria incluye, sin limitación, la que se produce secundaria a una enfermedad tal como la leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, policitemia vera, trombocitemia primaria, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, linfoma maligno, carcinoma, lupus eritematoso sistémico y esclerodermia generalizada, o a radiación. La mielofibrosis en la presente invención se puede diagnosticar por cualquier procedimiento conocido en la técnica. La patología más característica de la mielofibrosis es una fibrilización de la médula ósea, y esto se puede determinar en cierta medida por un fallo en la recogida de aspirado de médula ósea por aspirado medular ("punción blanca"). Un diagnóstico definitivo se realiza confirmando la fibrilización de médula ósea y/o un incremento en la trabécula por biopsia de médula ósea (véase la fig. 1). La mielofibrosis primaria puede manifestar además anemia, hepatoesplenomegalia, apariciones de leucoeritroblastosis, poiquilocitos tales como dacriocitos, blastocitos, macrotrombocitos y megacariocitos en la sangre periférica, un incremento de LDH en suero, un incremento en la absorción hepatoesplénica por mielogramagrafía, diátesis hemorrágica ocasional, meteorismo, fiebre, malestar general, pérdida de peso corporal, etc. En la mielofibrosis secundaria, los síntomas de la enfermedad subyacente a menudo pasan a un primer plano. Los síntomas específicos de una enfermedad subyacente son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En la composición de la presente invención, siempre que el retinoide contenido en el vehículo esté presente en un modo tal que funcione como agente dirigido, el vehículo puede contener una sustancia que se va a suministrar en su interior, se puede unir al exterior de una sustancia que se va a suministrar, o se puede mezclar con una sustancia que se va a suministrar, en la que la sustancia es la fármaco como se especifica en la reivindicación adjunta 1. Por lo tanto, dependiendo de la vía de administración y de la manera en la que se libera el fármaco, etc., la composición se puede cubrir con un material apropiado tal como, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material de disgregación sostenida, o se puede incorporar en un sistema de liberación de fármaco apropiado.

La composición de la presente invención se puede administrar por medio de diversas vías incluyendo las vías tanto oral como parenteral, y ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intrapulmonar, intrarrespiratoria, intratraqueal, intrabronquial, nasal, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, intramedular, intraganglionar, intralinfática, intracerebral, intratecal, intracerebroventricular, transmucosa, percutánea, intranasal, intraperitoneal e intrauterina, y se puede formular en una forma de dosificación adecuada para cada vía de administración. Dicha forma de dosificación y procedimiento de formulación se pueden seleccionar según sea apropiado de cualquier forma de dosificación y procedimiento conocidos (véase, por ejemplo Hyojun Yakuzaijaku (Standard Pharmaceuticals), Ed. por Yoshiteru Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003).

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

La composición de la presente invención puede comprender además uno o más de cualquier otro fármaco que pueda curar la mielofibrosis o aliviar la aparición, evolución y/o recidiva y/o síntomas de los mismos. Los ejemplos de dichos fármacos incluyen, sin limitación, por ejemplo, hormonas anabólicas tales como danazol y Primobolan, inhibidor de la angiogénesis tal como talidomida y lenalidomida, fármaco antitumoral tal como hidroxycarbamida, anagrelida, imatinib, 2-clordesoxiadenosina, melfalán, busulfano y etopósido, eritropoyetina, inhibidores de la tirosina cinasa JAK2V617F, inhibidores de TGF- β tales como receptor de TGF- β soluble, inhibidores de NFkB tales como bortezomib, inhibidores de la ADN metiltransferasa tales como decitabina, inhibidores de la histona desacetilasa tales como tricoestatina A, inhibidores de VEGF tales como PTK787/ZK222584 y bevacizumab, y anticuerpo anti-linfocito humano descrito en la literatura de patente 1 anterior. Cuando se usa en combinación, la composición de la presente invención se puede administrar simultáneamente con, antes o después del otro fármaco. La vía de administración puede ser la misma o diferente. Por ejemplo, la composición de la presente invención se puede administrar por vía parenteral, mientras que el otro fármaco se puede administrar por vía oral, etc.

El vehículo o la composición de la presente invención se puede proporcionar de cualquier forma, pero desde el punto de vista de la estabilidad en almacenamiento, se proporciona preferentemente en una forma que se pueda preparar inmediatamente antes de su uso, por ejemplo en una forma tal que se pueda preparar en un lugar de tratamiento médico o en la proximidad del mismo por un médico y/o farmacéutico, enfermera u otro paramédico. En este caso, el vehículo o la composición de la presente invención se proporciona como uno o más recipientes que contienen al menos un elemento constitutivo esencial para él, y se prepara antes de su uso, por ejemplo, dentro de 24 horas antes de su uso, preferentemente dentro de 3 horas antes de su uso, y más preferentemente, inmediatamente antes de su uso. Cuando se prepara, se pueden usar un reactivo, un disolvente, un equipo de preparación, etc. que normalmente estén disponibles en el lugar de preparación, según sea apropiado.

En consecuencia, la presente invención también se refiere a un kit para preparar una composición de la presente invención, comprendiendo el kit uno o más recipientes que contienen individualmente o en combinación un retinoide, y una sustancia que se va a suministrar, y/o una sustancia constitutiva de vehículo distinta del retinoide, así como a un elemento constitutivo que es necesario para el vehículo o composición, proporcionado en forma de dicho kit, en el que la sustancia que se va a suministrar es el fármaco como se especifica en la reivindicación adjunta 1. El kit de la presente invención puede comprender, además de lo anterior, instrucciones, un medio de registro electrónico tal como un CD o DVD con respecto a procedimientos para preparar o administrar el vehículo y composición de la presente invención, etc. Además, el kit de la presente invención puede comprender todos los elementos constitutivos para completar el vehículo o composición de la presente invención, pero no necesita necesariamente comprender todos los elementos constitutivos. En consecuencia, el kit de la presente invención no necesita comprender un reactivo o disolvente que esté normalmente disponible en un lugar de tratamiento médico o centro de experimentación, etc., tal como, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica o solución de glucosa.

La composición de la presente invención se puede usar en un procedimiento para controlar la actividad o crecimiento de una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, o un procedimiento para tratar la mielofibrosis, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de la composición anterior a un sujeto que lo necesita. La cantidad eficaz en el presente documento, en un procedimiento para tratar la mielofibrosis, por ejemplo, es una cantidad que suprime la aparición o recidiva de la mielofibrosis, alivia sus síntomas, o retrasa o detiene su evolución, y es preferentemente una cantidad que evita la aparición o recidiva de la mielofibrosis o la cura. También es preferentemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que excede el beneficio de la administración. Dicha cantidad se puede determinar apropiadamente por una prueba *in vitro* usando células cultivadas o por una prueba en un modelo animal tal como un ratón, rata, perro o cerdo, y dichos procedimientos de prueba son bien conocidos para una persona experta en la técnica. Por otra parte, la dosis del retinoide contenido en el vehículo y la dosis del fármaco usado en la presente invención son conocidas para una persona experta en la técnica, o se pueden determinar apropiadamente por la prueba mencionada anteriormente, etc.

La dosis específica de la composición de la presente invención se puede determinar en vista de varias condiciones con respecto al sujeto que necesita el tratamiento, tales como la gravedad de los síntomas, problemas de salud general del sujeto, edad, peso corporal, género del sujeto, alimentación, momento y frecuencia de administración, medicamento simultáneo, capacidad de respuesta al tratamiento, y el cumplimiento del tratamiento, etc.

La vía de administración incluye diversas vías que incluyen vías tanto oral como parenteral, por ejemplo, tales como vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intrapulmonar, intrarrespiratoria, intratraqueal, intrabronquial, nasal, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, intramedular, intraganglionar, intralinfática, intracerebral, intratecal, intracerebroventricular, transmucosa, percutánea, intranasal, intraperitoneal e intrauterina.

La frecuencia de administración varía dependiendo de las propiedades de la composición que se va a usar y las afecciones antes mencionadas del sujeto, y puede ser, por ejemplo, una pluralidad de veces por 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 o 7 días, etc.), un par de veces por semana (por ejemplo, 2, 3, 4 veces, etc. por semana), una vez a la semana, o cada pocas semanas (es decir, cada 2, 3, 4 semanas, etc.).

En el procedimiento de la presente invención, el término "sujeto" se refiere a cualquier individuo vivo, preferentemente un animal, más preferentemente un mamífero, y aún más preferentemente un individuo humano. En la presente invención, el sujeto puede estar sano o afectado por mielofibrosis, típicamente un sujeto afectado por mielofibrosis o en riesgo de estar por mielofibrosis. Cuando se pretende la prevención de la mielofibrosis primaria, por ejemplo, los ejemplos típicos incluyen, sin limitación, un sujeto que tiene una mutación génica en Jak2 y/o c-mpl. Cuando se pretende la prevención de la mielofibrosis secundaria, los ejemplos típicos incluyen, sin limitación, un sujeto que está afectado por una enfermedad tal como la leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, policitemia vera, trombocitemia primaria, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, linfoma maligno, carcinoma, lupus eritematoso sistémico o esclerodermia generalizada, o un sujeto que se ha sometido a radioterapia. Además, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervención profiláctica y/o terapéutica médicamente aceptable para el propósito de curación, remisión temporal o prevención de un trastorno. Por ejemplo, el término "tratamiento" incluye la intervención médicamente aceptable de diversos propósitos, incluyendo retrasar o detener la evolución de la mielofibrosis, regresión o desaparición de una lesión, prevención de la aparición y prevención de la recidiva de la mielofibrosis.

La composición de la presente invención también se puede usar en un procedimiento para suministrar el fármaco especificado en la reivindicación adjunta 1 a una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea. Este procedimiento incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una etapa de cargar dicho fármaco que se va a suministrar en el vehículo, y una etapa de administrar o añadir el vehículo que lleva la sustancia que se va a suministrar a un organismo o un medio, por ejemplo un medio de cultivo, que contiene una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea. Estas etapas se pueden lograr apropiadamente de acuerdo con cualquier procedimiento conocido o similar como un procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva. El procedimiento de suministro se puede combinar con otro procedimiento de suministro, por ejemplo, otro procedimiento de suministro para dirigirse a la

médula ósea. Por otra parte, el procedimiento incluye un modo de realización realizado *in vitro* y un modo de realización en el que se dirige una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea en el interior del cuerpo.

La presente solicitud también divulga un ARNip novedoso contra la HSP47 de ratón, preferentemente los dirigidos a la parte seleccionada de la posición 1130 a la posición 1145, de la posición 1485 a la posición 1500, de la posición 1501 a la posición 1516, de la posición 1654 a la posición 1678 y de la posición 1951 a la posición 1978 de SEQ. ID NO: 13. Aunque los procedimientos para diseñar y producir un ARNip contra una región específica de un gen para suprimir la expresión de dicho gen son conocidos en la técnica, en general es imposible predecir la parte del gen que a la que se debe dirigir, y esto sólo se puede determinar por medio de experimento. En la presente invención, por su fuerte efecto supresor sobre la expresión de HSP47, son preferentes un ARNip que se dirige a de la posición 1501 a la posición 1516, y un ARNip que se dirige a de la posición 1951 a la posición 1978 de SEQ ID NO: 13. Algunos ejemplos preferentes de los ARNip novedosos para su uso en la presente invención consisten en las siguientes combinaciones de hebra sentido y hebra antisentido.

Secuencias A: una combinación de:

5'-UGGAUGGGAAAGAUGCAGAAGAAGGAG-3' (sentido, SEQ ID NO:1) y
3'-UAACCUACCCUUUCUACGUCUUCUCC-5' (antisentido, SEQ ID NO:2).

Secuencias B: una combinación de:

5'-UGUCUGAGUGGGUAUUUUUAGACAGAG-3' (sentido, SEQ ID NO:3) y
3'-UACAGACUCACCCAUAAAAAUCUGUC-5' (antisentido, SEQ ID NO:4).

Secuencias C: una combinación de:

5'-GAUGCGAGAUGAGUUGUAGAGUCCAAG-3' (sentido, SEQ ID NO:5) y
3'-UACUACGCUCUACUCAACAUCUCAGGU-5' (antisentido, SEQ ID NO:6).

Secuencias D: una combinación de:

5'-CAGAACUGCCCAUCCUAAAAAUGAUAG-3' (sentido, SEQ ID NO:7) y
3'-UAGUCUUGACGGUAGGAAUUUUACUA-5' (antisentido, SEQ ID NO:8).

Secuencias E: una combinación de:

5'-GAGACAAGAUGCGAGAUGAGUUGUAAG-3' (sentido, SEQ ID NO:9) y
3'-UACUCUGUUCUACGCUCUACUCAACAU-5' (antisentido, SEQ ID NO: 10).

Entre éstas, las secuencias C y D son particularmente preferentes por su fuerte efecto supresor sobre la expresión de HSP47.

El ARNip para su uso en la presente invención puede tener una estructura de ARN natural, o también puede tener varias modificaciones destinadas a mejorar la estabilidad *in vivo* o la afinidad de unión a la secuencia diana. Dicha modificación incluye, sin limitación, una modificación por un grupo amino terminal, grupo tiol, colesterol, alquilo de cadena larga, cadena glucídica o péptido, etc., una formación de un sitio básico, una introducción de ácido nucleico modificado tal como un ácido nucleico bloqueado (ANB), un ácido nucleico peptídico (ANP), un nucleótido modificado en la posición 2' del glúcido, por ejemplo, nucleótido modificado con 2'-O-alquil, 2'-O-alquil-O-alquil o 2'-fluoro.

El ARNip para su uso en la presente invención es extremadamente útil para suprimir la expresión de HSP47 en un ratón y para suprimir la producción de colágeno asociada con la expresión de HSP47, y en particular puede ser adecuado para su uso en investigaciones, experimentos y pruebas usando un ratón.

[Ejemplos]

Ejemplo de preparación 1: Confirmación de la patología en ratones del modelo de mielofibrosis.

Se usó un ratón transgénico con trombopoyetina (TPO) desarrollado por el Dr. Kazuya Shimoda y el Dr. Mina Harada (a continuación en el presente documento se puede denominar ratón TPO; véase Leukemia Research 29: 761-769, 2005) como un ratón del modelo de mielofibrosis. En este ratón, la TPO se produce en exceso a partir de células con el gen de la TPO transferido, lo que da lugar a la expansión de megacariocitos en la médula ósea. Los megacariocitos

expandidos producen de forma excesiva el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que estimula los fibroblastos de la médula ósea, promoviendo la secreción de colágeno a partir de los fibroblastos y dando como resultado la fibrilización de la médula ósea (véase la fig. 2).

5 Se criaron ratones TPO (proporcionados desde Kyushu University Center Animal) en condiciones de cría normal, a continuación se sacrificaron a los 4, 7, 9 o 12 meses después de nacer, se extrajo su médula ósea para realizar muestras de tejido, que se tiñeron con tinción con hematoxilina-eosina (HE), tinción de Gitter o tinción con azán, respectivamente, se observaron las imágenes de la médula ósea con un microscopio óptico. Los resultados se muestran en las figs. 3 a 5.

10 No se observó fibrilización a los 4 meses de edad (4M). Sin embargo, a los 7 meses de edad (7M), aunque el engrosamiento trabecular no era evidente (HE), se observaron hiperplasia de fibra reticular (Gitter) y depósito de colágeno (Azán) (véase la fig. 3).

15 Tanto a los 9 meses de edad (9M) como a los 12 meses de edad (12M), el engrosamiento trabecular era prominente (HE), también se observaron hiperplasia de fibra reticular (Gitter) y depósito de colágeno (Azán). Por otra parte, la fibrilización de médula ósea y el engrosamiento trabecular habían evolucionado (empeorado) a los 12M en comparación con a los 9M (véase la fig. 4).

20 En la muestra con HE de médula ósea de ratón TPO, el engrosamiento trabecular comenzaba a los 9 meses de edad (9M), que había empeorado aún más a los 12 meses de edad (véase la fig. 5).

En consecuencia, se ha confirmado el desarrollo de los síntomas de mielofibrosis en ratones TPO.

25 **Ejemplo de preparación 2: Producción de ARNip.**

Se generaron ARNip dirigidos a HSP47 de ratón (ARNip HSP47) como fármacos que suprimen la actividad de las células productoras de la matriz extracelular en la médula ósea. Específicamente, se generaron cinco ARNip HSP47 (ARNip-A a E HSP47) que tienen las secuencias a continuación y un ARNip aleatorio, que se usaron en los experimentos a continuación en el presente documento. Los ARNip HSP47 se adquirieron de Igene Therapeutics, Inc. (Tokio), y las secuencias diana de los ARNip HSP47 se diseñaron a partir de la base de datos de Refseq (N° de acceso de GenBank NM009825) registrada en noviembre de 2006. El ARNip aleatorio también se adquirió de Igene Therapeutics, Inc. (nombre del producto: dsRNA scramble).

35 ARNip-A HSP47:

5'-UGGAUGGGAAAGAUGCAGAAGAAGGAG-3' (sentido, SEQ ID NO:1)
3'-UAACCUACCCUUCUACGUCUUCUCC-5' (antisentido, SEQ ID NO:2)

40 ARNip-B HSP47:

5'-UGUCUGAGUGGGUAUUUUUAGACAGAG-3' (sentido, SEQ ID NO:3)
3'-UACAGACUCACCCAUAAAAUCUGUC-5' (antisentido, SEQ ID NO:4)

45 ARNip-C HSP47:

5'-GAUGCGAGAUGAGUUGUAGAGUCCAAG-3' (sentido, SEQ ID NO:5)
3'-UACUACGCUCUACUCAACAUCUCAGGU-5' (antisentido, SEQ ID NO:6)

50 ARNip-D HSP47:

5'-CAGAACUGCCCAUCCUUAAAAUGAUAG-3' (sentido, SEQ ID NO:7)
3'-UAGUCUUGACGGUAGGAAUUUUACUA-5' (antisentido, SEQ ID NO:8)

55 ARNip-E HSP47:

5'-GAGACAAGAUGCGAGAUGAGUUGUAAG-3' (sentido, SEQ ID NO:9)
3'-UACUCUGUUCUACGCUCUACUCAACAU-5' (antisentido, SEQ ID NO: 10)

60 ARNip aleatorio:

5'-CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUGCAG-3' (sentido, SEQ ID NO: 11)

3'-UAGCUAAGCGAUCUGGCCGAAGUAACG-5' (antisentido, SEQ ID NO: 12)

También se produjeron ARNip que se han marcado con un tinte fluorescente 6'-carboxifluoresceína (6-FAM) en el extremo 5'.

Ejemplo de referencia 3: Propiedades de fibroblasto de médula ósea de ratón TPO de cultivo primario.

Se obtuvo un cultivo primario de fibroblastos de médula ósea cultivando las células de médula ósea de ratones TPO de 4 a 6 semanas de edad en MEM (medio esencial mínimo de Eagle, Sigma) complementado con suero fetal bovino al 15 % (FCS) durante 4 semanas. La fig. 6 muestra la morfología celular observada por un microscopio invertido. Las células tenían forma de huso, lo que es típico de un fibroblasto. La fig. 7 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo usando los respectivos anticuerpos para los marcadores de células mesenquimales vimentina y α -SMA (anticuerpo anti-vimentina (Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo anti- α -SMA (Santa Cruz Biotechnology)). Se observó la expresión de ambos marcadores, lo que indica que las células obtenidas del cultivo eran fibroblastos de médula ósea típicos. El citómetro de flujo usado en los análisis era FACS Calibur (Becton Dickinson), y se analizaron los datos medidos usando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson).

Ejemplo de referencia 4: Efecto de ARNip HSP47 sobre la célula NIH3T3 (línea celular de fibroblastos de ratón).

Se suspendieron 1×10^5 células NIH3T3 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Life Technologies) complementado con suero bovino al 10 % (CS), y se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos. Después de 24 horas, se transfectaron células NIH3T3 a una confluencia de un 50-60 % con ARNip HSP47, usando Lipotrust (Hokkaido System Science Co., Ltd.). Específicamente, se mezclaron Lipotrust 20 nM y ARNip aleatorio o ARNip HSP47 50 nM por un vórtex y se usaron para la transfección. Se cultivaron las células NIH3T3 transfectadas durante 4 horas en OPTI-MEM sin suero (GIBCO). A continuación, se lavaron las células NIH3T3 con DMEM y se cultivaron adicionalmente durante 24 horas en DMEM complementado con CS al 10 %, y se extrajo la proteína. A continuación, se analizó la expresión de HSP47 por bandas western. A saber, se fraccionó la proteína extraída de las células NIH3T3 usando electroforesis en gel SDS-poliacrilamida 4/20 (SDS-PAGE) y a continuación se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se sondeó en primer lugar con un anticuerpo primario contra HSP47 (Stressgen) o bien un anticuerpo primario contra β -actina (Cell Signaling Technology), a continuación se sondeó adicionalmente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Oncogene Research Product), y finalmente se desarrolló usando ECL (Amersham Life Science). El resultado mostró que, 24 horas después de la transferencia de ARNip HSP47 en células NIH3T3, ARNip-C y -D HSP47 tenían un efecto más fuerte en comparación con A, B y E (véase la fig. 8A). En consecuencia, se usaron ARNip-C y -D HSP47 como el ARNip HSP47 en los experimentos a continuación.

Ejemplo 5: Efecto de ARNip HSP47 sobre fibroblasto de médula ósea de cultivo primario derivado de ratón TPO.

Se suspendieron 5×10^5 de fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivado de ratón TPO en MEM complementado con FCS al 15 %, y se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos. Después de 24 horas, se transfectaron los fibroblastos de médula ósea a una confluencia de un 50-60 % con ARNip HSP47, usando Lipotrust. A saber, se mezclaron Lipotrust 20 nM y ARNip aleatorio 50 nM o ARNip-C o -D HSP47 5-50 nM por un vórtex y se usaron para transfección, o estos se mezclaron adicionalmente con vitamina A 40 nM (retinol, Sigma) por un vórtex, después de 5 minutos, y se usaron para transfección. Se cultivaron los fibroblastos de médula ósea transfectados con ARNip HSP47 en liposoma conjugado con vitamina A o bien no conjugado con vitamina A durante 4 horas en OPTI-MEM sin suero. A continuación, se lavaron estos fibroblastos de médula ósea con MEM, se cultivaron adicionalmente durante 48 horas en MEM complementado con FCS al 15 % y se extrajo la proteína. En un experimento diferente, se cultivaron los fibroblastos de médula ósea transfectados con ARNip-D HSP47 en liposoma conjugado con vitamina A 50 nM (ARNip-D VA-Lip-HSP47; a continuación en el presente documento "conjugado con vitamina A" y "liposoma" se puede abreviar como "VA" y "Lip", respectivamente) durante 4 horas OPTI-MEM sin suero y se lavó con MEM, a continuación se cultivó adicionalmente durante de 24 a 96 horas en MEM complementado con FCS al 15 % antes de extraer la proteína. A continuación, se analizó la proteína extraída para determinar la expresión de HSP47 por bandas western. A saber, se fraccionó la proteína extraída de los fibroblastos de médula ósea usando electroforesis en gel SDS-poliacrilamida 4/20 (SDS-PAGE) y a continuación se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, de forma similar al ejemplo 4, se sondeó con un anticuerpo primario contra HSP47 o β -actina, a continuación se sondeó adicionalmente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, y finalmente se visualizó usando ECL. Los resultados se muestran en las figs. 8B y 8C.

Cuando se usaron fibroblastos de médula ósea de cultivo primario, ni ARNip-C HSP47 (fig. 8, a) ni ARNip-D HSP47 (fig. 8, b) solos mostraron ningún efecto. Sin embargo, cuando se conjugó con vitamina A (VA), se confirmó que ARNip-C HSP47 (ARNip-C VA-Lip-HSP47) expresaba un efecto en una concentración de o por encima de 50 nM, mientras que ARNip-D VA-Lip-HSP47 lo hizo a o por encima de 25 nM. En consecuencia, quedó claro que es necesario el uso de ARNip VA-Lip-HSP47 para una transferencia eficaz de ARNip HSP47 en un fibroblasto de médula ósea de cultivo primario, y que ARNip-D VA-Lip-HSP47 tuvo un efecto supresor más potente sobre la HSP47 en comparación con ARNip-C VA-Lip-HSP47. Por tanto, se decidió el uso de ARNip-D VA-Lip-HSP47 en los

experimentos a continuación. Por otra parte, quedó claro que el efecto de ARNip-D VA-Lip-HSP47 (50 nM) se mantuvo durante 72 horas (véase la fig. 8C).

Ejemplo 6: Efecto de la vitamina A (VA) sobre la introducción de ARNip de HSP47 incluido en liposoma (ARNip Lip-HSP47) en fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivados de ratón TPO.

Se transfectaron los fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivados de ratón TPO con ARNip Lip-HSP47 o ARNip VA-Lip-HSP47 conjugado con carboxifluoresceína 50 nM (FAM) (ARNip-FAM Lip-HSP47 o ARNip-FAM VA-Lip-HSP47) en medio de cultivo OPTI-MEM complementado con CS al 10 %, en presencia o ausencia de 10 mg/ml de anticuerpo anti-proteína de unión a retinol (anti-RBP-Ab, BD Pharmingen), y después de 30 minutos se analizaron por citometría de flujo. Se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células transfectadas por FACS Calibur y se analizó usando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson). Se sembraron 5×10^5 fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivados de ratón TPO en una placa de cultivo de 6 pocillos. Después de 24 horas, se añadieron ARNip-FAM VA-Lip-HSP47 50 nM o ARNip-FAM Lip-HSP47. Se cultivaron estas células durante 30 minutos en OPTI-MEM complementado con FCS al 10 %, y se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % a continuación (25 grados C, 15 minutos). Después de la fijación, se sometió estas células a tinción nuclear con DAPI durante 1 minuto. La Se evaluó la ubicación intracelular de FAM por un microscopio de fluorescencia. Un patrón típico de citometría de flujo y un resultado típico de ubicación intracelular de ARNip marcado con FAM se muestran en la fig. 9A y 9B, respectivamente. La MFI es como se indica en la fig. 9A. Quedó claro que, en comparación con el ARNip Lip-HSP47, el ARNip VA-Lip-HSP47 presentó una eficacia de transfección mayor en un fibroblasto de médula ósea de cultivo primario derivado de ratón TPO (A y B). Además, puesto que la introducción de ARNip VA-Lip-HSP47 se suprimió parcialmente por anti-RBP-Ab (A), se sugirió que una parte de la absorción de ARNip VA-Lip-HSP47 se había podido realizar por medio de del receptor de RBP (Retinol Binding Protein) del fibroblasto de médula ósea.

Ejemplo 7: Efecto de HSP47 ARNip sobre la secreción de colágeno a partir de fibroblastos de médula ósea de cultivo primario derivados de ratón TPO.

Se suspendieron 5×10^5 de fibroblastos de médula ósea de cultivo primario en MEM complementado con FCS al 15 %, y se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos. Después de 24 horas, se introdujeron 50 nM de Lip-ARNip aleatorio (ARNip ran), ARNip-D Lip-HSP47 (ARNip D), VA-Lip-ARNip aleatorio (VA-ARNip ran) o ARNip-D VA-Lip-HSP47 (VA-ARNip D). Después de 4 horas, se reemplazó el medio de cultivo por MEM complementado con FCS al 15 %, antes de cultivar durante otras 48 horas. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por OPTI-MEM sin suero, antes de cultivar durante otras 4 horas. Después de eso, en primer lugar se midió el contenido de colágeno en el sobrenadante del cultivo usando el kit de ensayo de colágeno Sircol™ (Biocolor). A saber, se mezcló el sobrenadante del cultivo con solución de tinte durante 30 minutos, a continuación, se centrifugó la solución a $10.000 \times g$ durante 10 minutos. Después de retirar la solución de tinte no unido, se añadió 1 ml de reactivo alcalino al tinte unido y se agitó con vórtex durante 10 minutos, y se realizó la cuantificación en base a la absorbancia medida por el espectrómetro de absorción (540 nm). En segundo lugar, se cuantificó la cantidad de colágeno depositado en los fibroblastos que están unidos a la placa de cultivo añadiendo tinte rojo sirio y midiendo la absorbancia por el espectrómetro de absorción (540 nm).

El resultado se muestra en la fig. 10. Cabe destacar que "Sobrenadante del cultivo" en la figura indica el contenido de colágeno en el sobrenadante del cultivo de los fibroblastos, mientras que "Placa (sobrenadante del cultivo retirado)" indica la cantidad de colágeno depositado en los fibroblastos después de retirar el sobrenadante del cultivo, y "Total" indica la suma de "Sobrenadante del cultivo" y "Placa (sobrenadante del cultivo retirado)", respectivamente. Se expresaron los datos como una media de 3 cultivos $\pm$ DE (* $P < 0,05$).

Como resultado, quedó claro que la cantidad de colágeno secretado en el sobrenadante del cultivo de los fibroblastos de cultivo primario transfectados con ARNip-D VA-Lip-HSP47 era significativamente menor en comparación con los casos de otras células; que en las células transfectadas con ARNip-D VA-Lip-HSP47, la cantidad de depósito de colágeno en la placa de cultivo era menor pero no significativa en comparación con los casos de otras células; y que, en los fibroblastos transfectados con ARNip-D VA-Lip-HSP47, la suma de la cantidad de colágeno secretado en el sobrenadante del cultivo de los fibroblastos y la cantidad de depósito de colágeno en los fibroblastos después de retirar el sobrenadante del cultivo era significativamente menor en comparación con los casos de otras células.

Ejemplo 8: Efecto *in vivo* de ARNip HSP47 sobre la fibrilización de médula ósea de ratones TPO.

Se investigó el efecto de ARNip-D VA-Lip-HSP47 *in vivo* para mejorar la fibrilización de médula ósea usando ratones TPO de 7 meses de edad. Se inyectaron por vía intravenosa 12,5 mg de ARNip-D HSP47 por ratón desde el plexo retroorbital usando una jeringuilla con tuberculina, cada dos días para preparar 4 dosis de inyección en total. A saber, se llenaron adicionalmente 12,5 mg/ratón de ARNip (8 μ l) y 12,5 nM de Lipotrust (12,5 μ l), con o bien sin 25 nM de vitamina A (2,5 μ l), con PBS sin ARNasa para preparar un total de 100 μ l, que se administra a un ratón como una dosis. Se sacrificaron los ratones 8 días después del inicio de la administración de ARNip-D HSP47, y se extrajo la médula ósea para preparar muestras de tejido, cada una de ellas se tiñó con tinción con hematoxilina-eosina (HE), tinción de Gitter o tinción con azán, y se sometieron a observación por imágenes de médula ósea por microscopio óptico. Los resultados se muestran en las figs. 11-14.

De la muestra con tinción de Gitter después del tratamiento (fig. 11), quedó claro que la hiperplasia de fibra reticular en la médula ósea había mejorado significativamente en los dos ratones a los que se les habían administrado HSP47 VA-Lip-ARNip (HSP47 VA-Lip-ARNip (1) y (2)), en comparación con los ratones no tratados (sin tratamiento), ratones administrados con HSP47 Lip-ARNip (HSP47 Lip-ARNip) y ratones administrados con VA-Lip-ARNip aleatorio (VA-Lip-ARNip ran). Además, el nivel de esta mejora en la hiperplasia de fibra reticular por HSP47 ARNip se midió y se cuantificó por el programa informático KS-400 (Carl Zeiss). A saber, se seleccionaron 10 campos ópticos de una muestra con tinción de Gitter después del tratamiento, y se midió la proporción de los puntos para fibra reticular frente a los puntos enteros en cada campo (porcentaje del área de fibrosis de reticulina) como un índice de la hiperplasia de fibra reticular. Se confirmó que la hiperplasia de fibra reticular en la médula ósea había mejorado significativamente en los ratones a los que se les había administrado HSP47 VA-Lip-ARNip-D (VA-ARNip D) en comparación con los ratones no tratados (sin tratamiento), ratones administrados con HSP47 Lip-ARNip (ARNip D) y ratones administrados con VA-Lip-ARNip aleatorio (VA-ARNip ran) (véase la fig. 12).

Por otra parte, de las muestras con tinción con azán después del tratamiento como se muestra en la fig. 13, se demostró que la hiperplasia de colágeno en la médula ósea había mejorado significativamente en los dos ratones a los que se les había administrado HSP47 VA-Lip-ARNip (HSP47 VA-Lip-ARNip (1) y (2)) en comparación con los ratones no tratados (sin tratamiento), ratones administrados con HSP47 Lip-ARNip (HSP47 Lip-ARNip) y ratones tratados con VA-Lip-ARNip aleatorio (VA-Lip-ARNip ran).

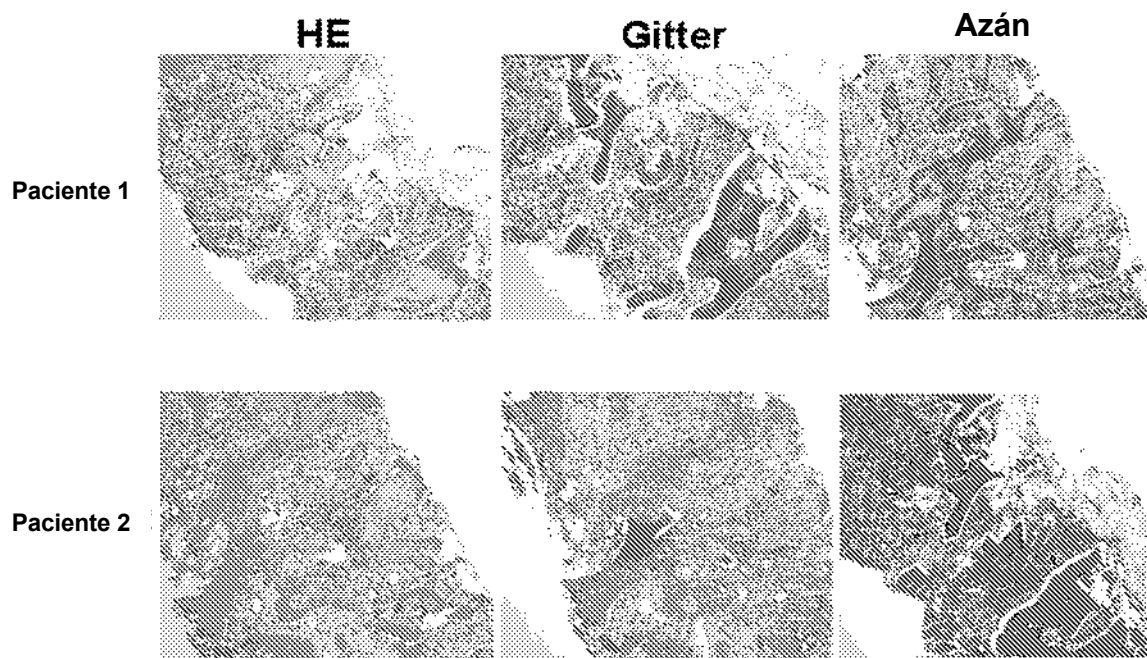
Además, de las muestras con tinción con HE después del tratamiento como se muestra en la fig. 14, se demostró que el engrosamiento trabecular había mejorado significativamente en los dos ratones a los que se les había administrado HSP47 VA-Lip-ARNip (HSP47 VA-Lip-ARNip (1) y (2)) en comparación con los ratones no tratados (sin tratamiento), ratones administrados con HSP47 Lip-ARNip (HSP47 Lip-ARNip) y ratones administrados con VA-Lip-ARNip aleatorio (VA-Lip-ARNip ran).

A partir de estos resultados, se ha sugerido que sería útil el tratamiento para la mielofibrosis usando un ARNip dirigido a HSP47. Además, en vista del hecho de que los ARNip actúan básicamente en el citoplasma, los resultados anteriores sugieren que un retinoide funcionó como agente dirigido a una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea y suministró eficazmente un fármaco a esta célula, mejorando significativamente de ese modo la patología de la mielofibrosis.

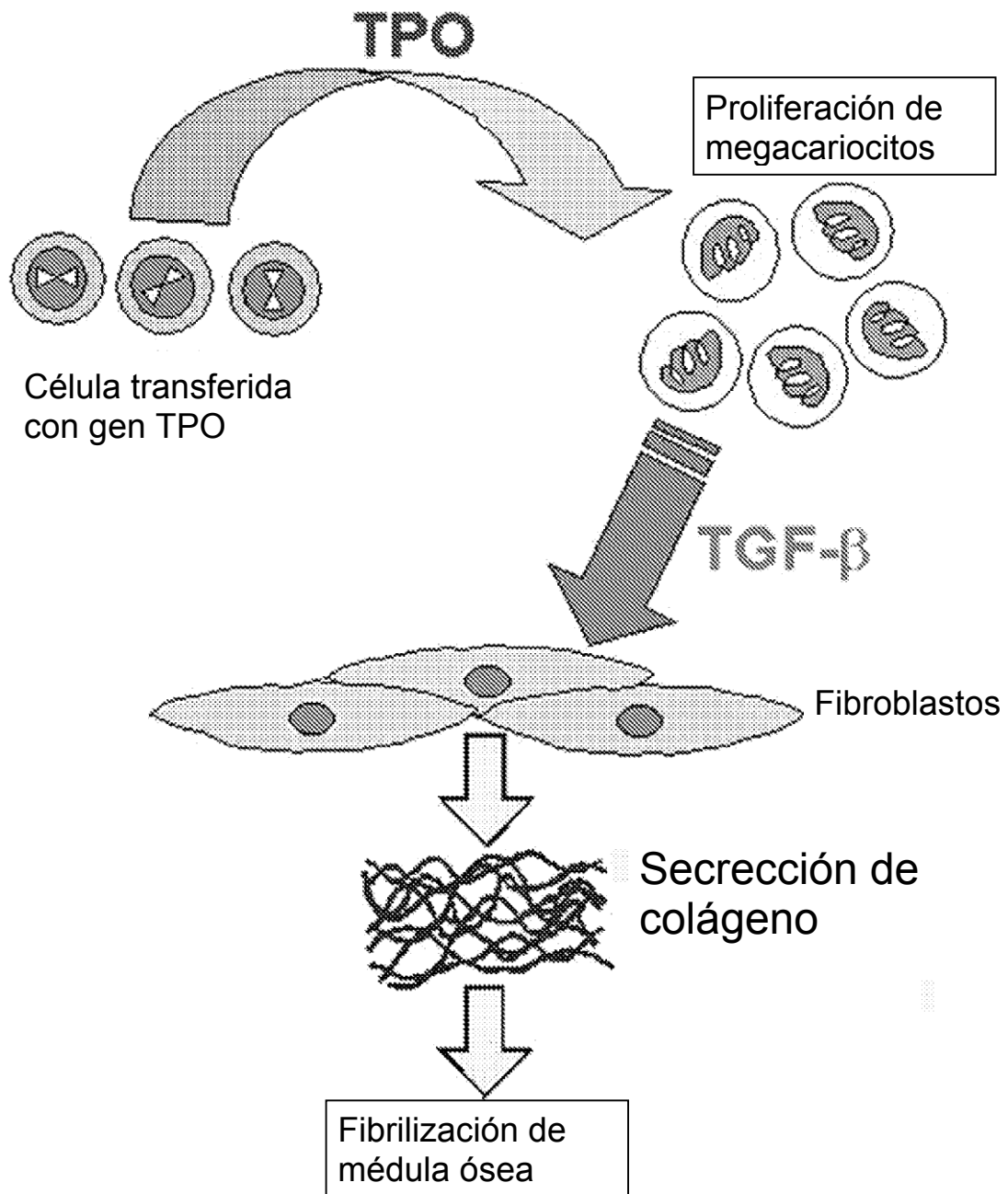
REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis, que comprende un fármaco que controla la actividad o crecimiento de una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, y un vehículo que comprende un retinoide como un agente dirigido, en la que el fármaco que controla la actividad o crecimiento de la célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea se selecciona del grupo que consiste en un fármaco que suprime la expresión del componente de la matriz extracelular y se selecciona de un ARNip, una ribozima y ácido nucleico antisentido o un vector que expresa estos o un ARNip, una ribozima, un ácido nucleico antisentido que se dirigen a moléculas implicadas en la producción o secreción de dicho componente de la matriz extracelular, y un vector que expresa dicho ARNip, ribozima y ácido nucleico antisentido.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula implicada en la producción o secreción del componente de la matriz extracelular es HSP47.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el retinoide comprende retinol.
4. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el contenido de retinoide es de un 0,2 - 20 % en peso de todo el vehículo.
5. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el vehículo tiene una forma, que se selecciona del grupo que consiste en una micela macromolecular, un liposoma, una emulsión, microesferas y nanoesferas.
6. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el vehículo tiene una forma de un liposoma, y la proporción molar del retinoide con respecto al lípido contenido en el liposoma es de 8:1 - 1:4.
7. La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se proporciona en una forma que se puede preparar inmediatamente antes de su uso.
8. Un kit para preparar una composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende uno o más recipientes que comprende individualmente o bien en combinación el fármaco que controla la actividad o crecimiento de una célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea, el retinoide, y si es necesario, una sustancia constitutiva de vehículo distinta del retinoide, que comprende además instrucciones para administrar la composición tal como se especifica en la reivindicación 1, en el que el fármaco que controla la actividad o crecimiento de la célula productora de la matriz extracelular en la médula ósea se selecciona del grupo que consiste en un fármaco que suprime la expresión del componente de la matriz extracelular y se selecciona de un ARNip, una ribozima y ácido nucleico antisentido o un vector que expresa estos o un ARNip, una ribozima, un ácido nucleico antisentido que se dirigen a moléculas implicadas en la producción o secreción de dicho componente de la matriz extracelular, y un vector que expresa dicho ARNip, ribozima y ácido nucleico antisentido.

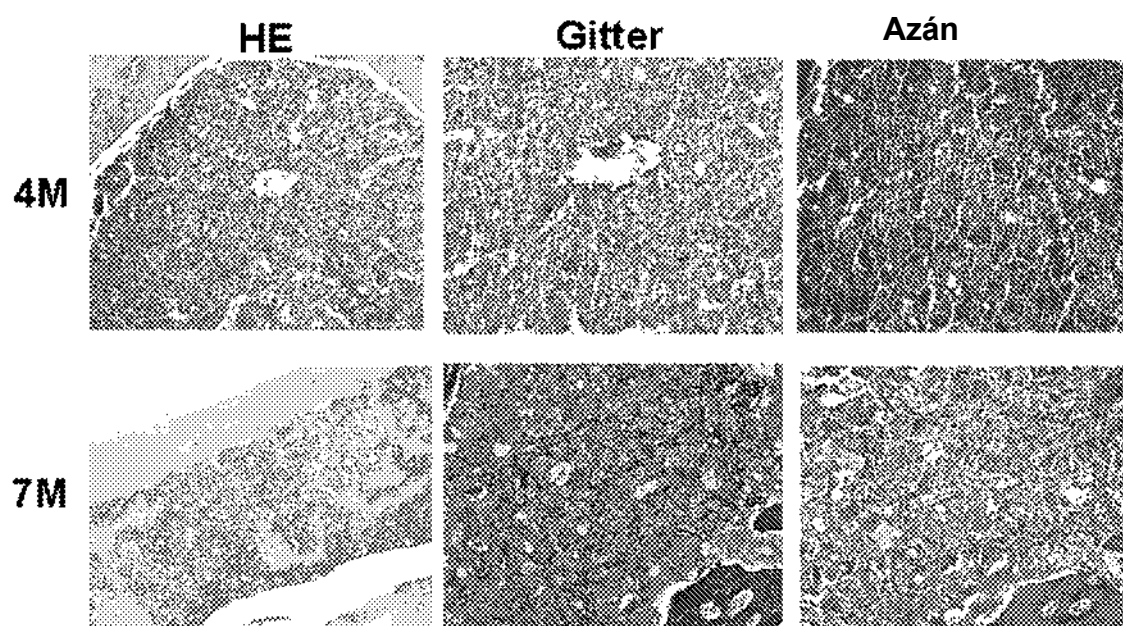
[Fig. 1]



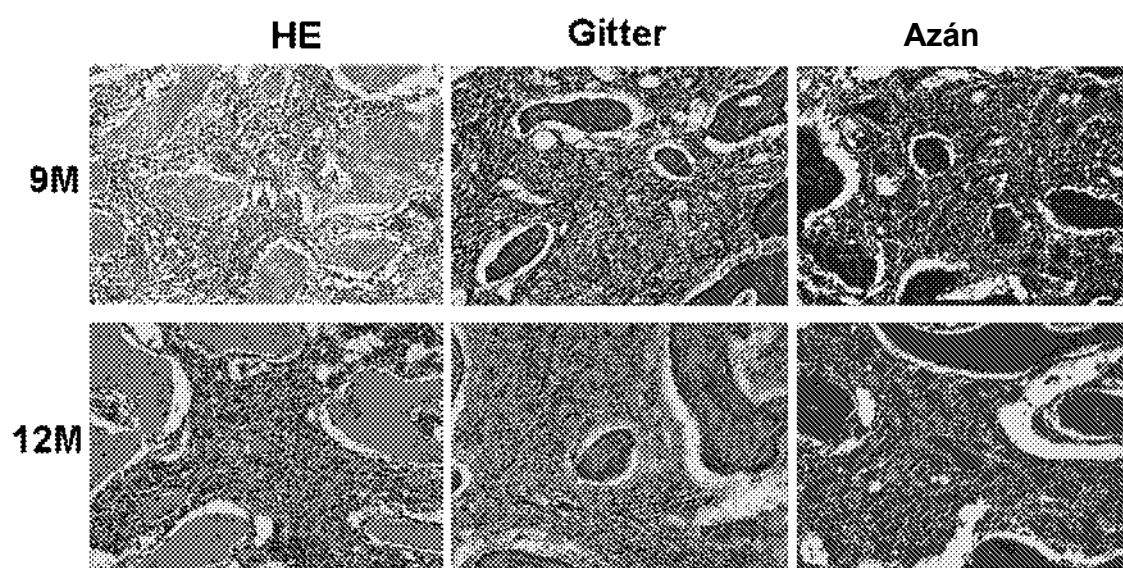
[Fig. 2]



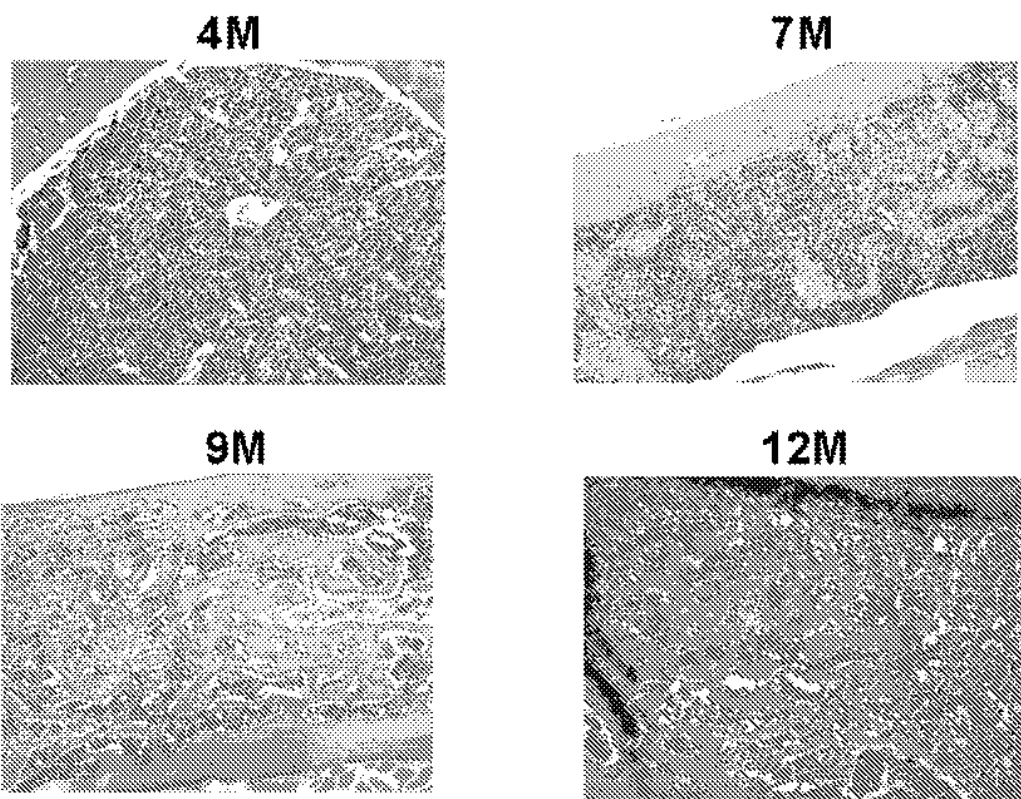
[Fig. 3]



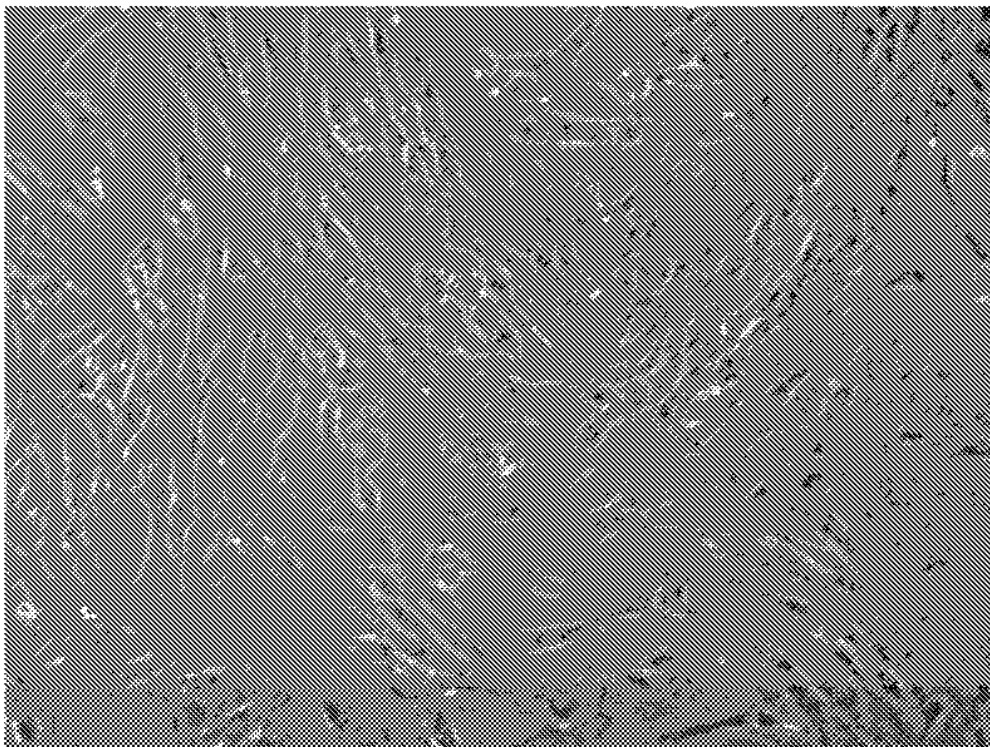
[Fig. 4]



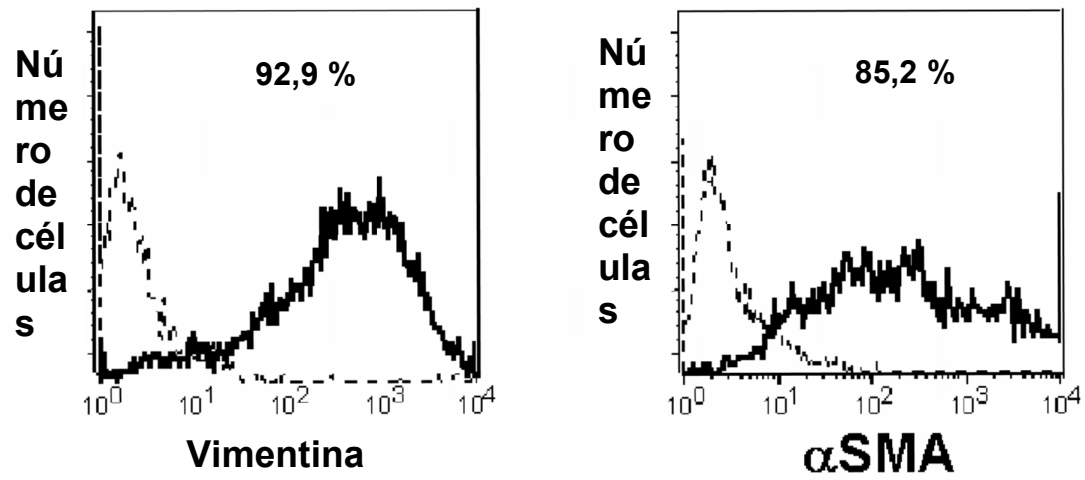
[Fig. 5]



[Fig. 6]

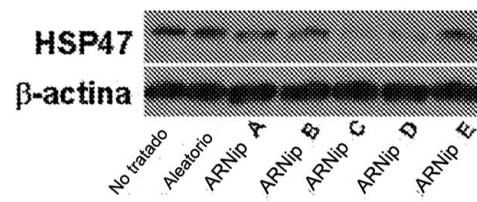


[Fig. 7]

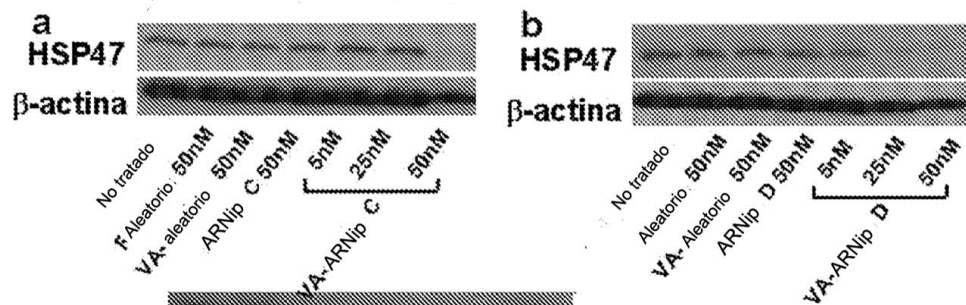


[Fig. 8]

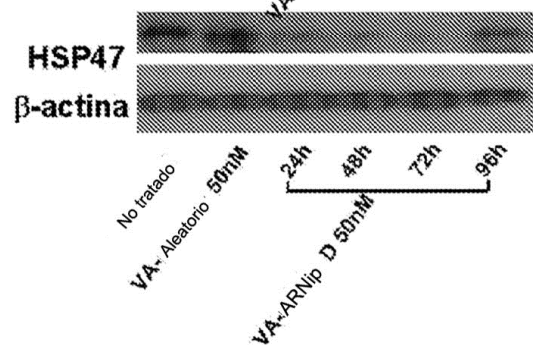
A. NIH3T3



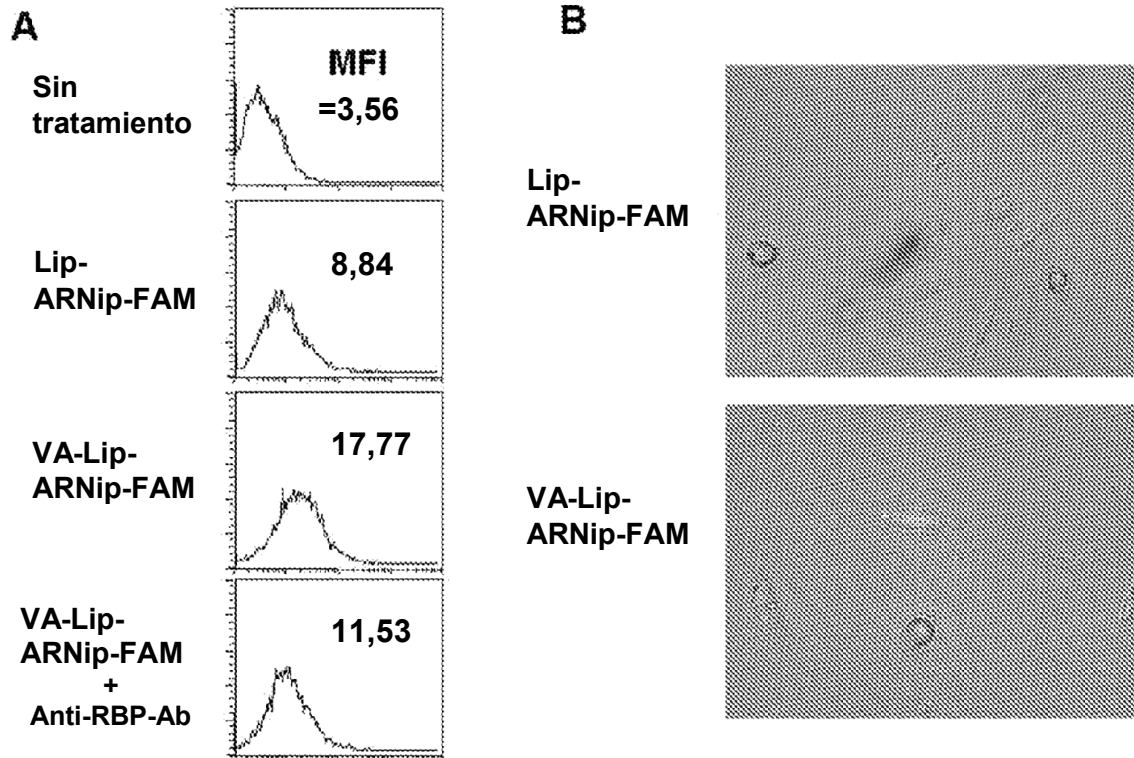
B. Fibroblastos primarios



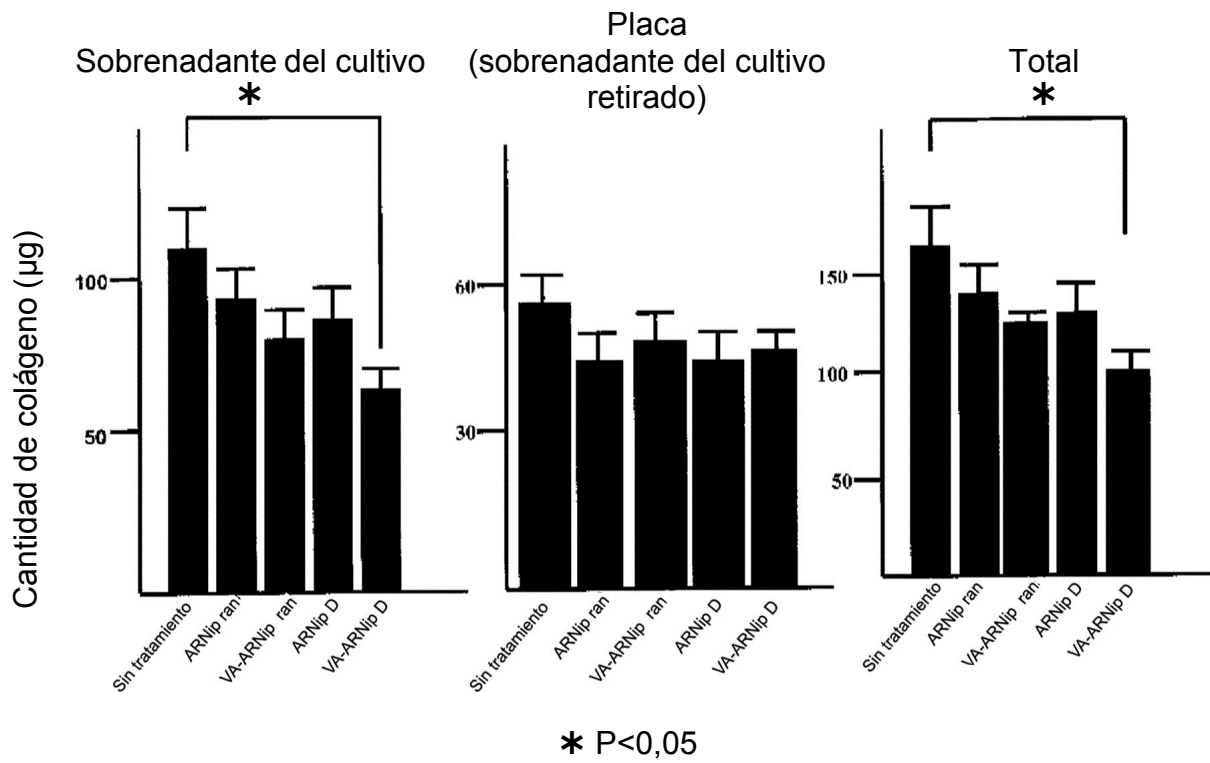
C. Fibroblastos primarios



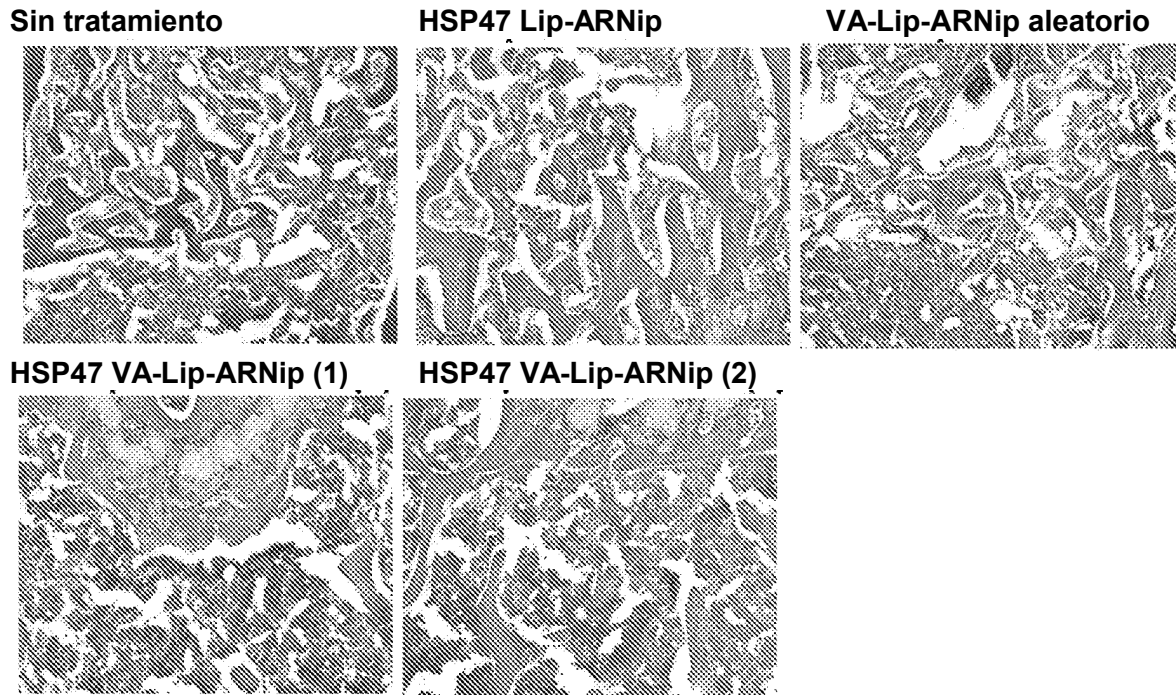
[Fig. 9]



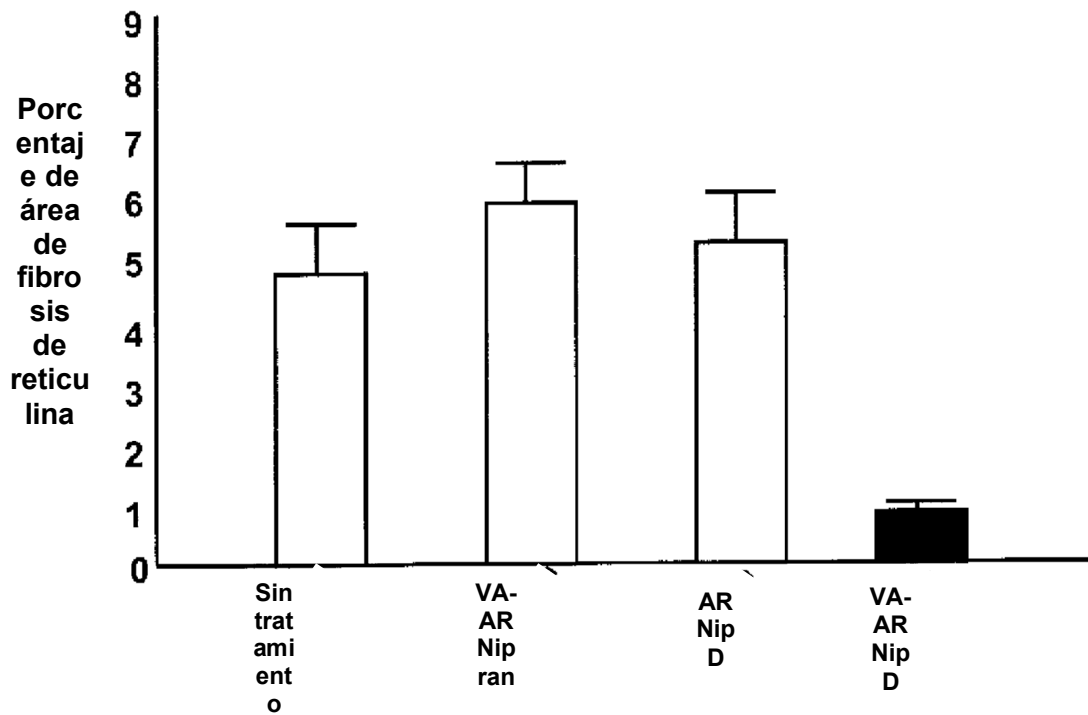
[Fig. 10]



[Fig. 11]

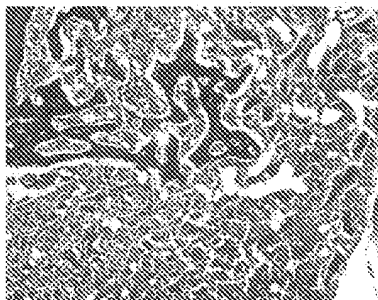


[Fig. 12]

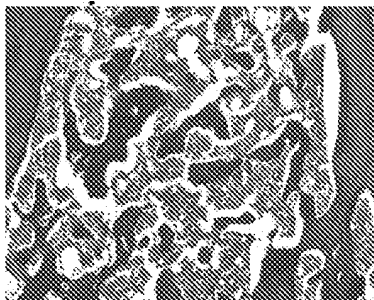


[Fig. 13]

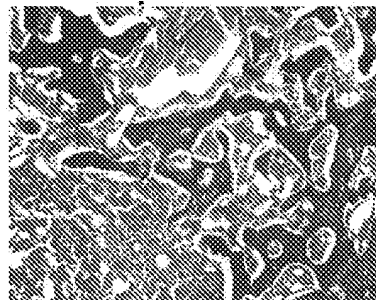
Sin tratamiento



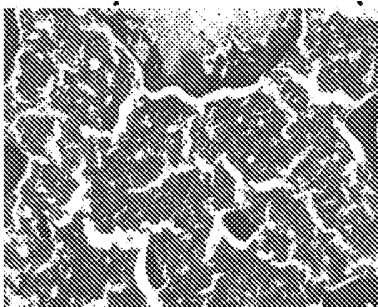
HSP47 Lip-ARNip



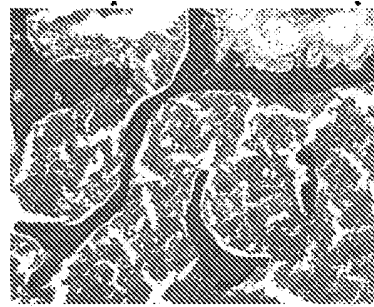
VA-Lip-ARNip aleatorio



HSP47 VA-Lip-ARNip (1)

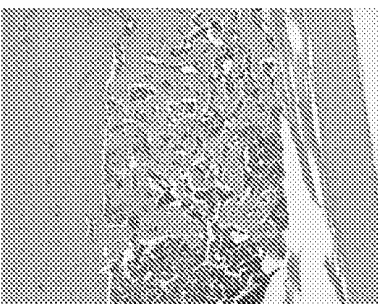


HSP47 VA-Lip-ARNip (2)

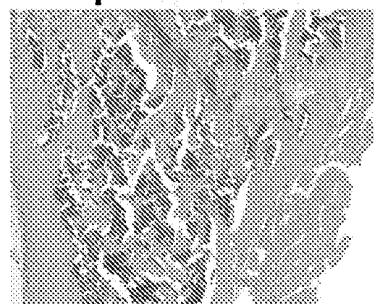


[Fig. 14]

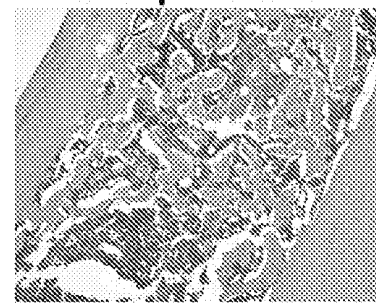
Sin tratamiento



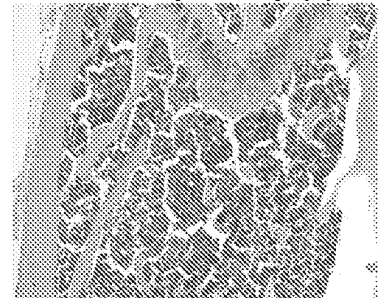
HSP47 Lip-ARNip



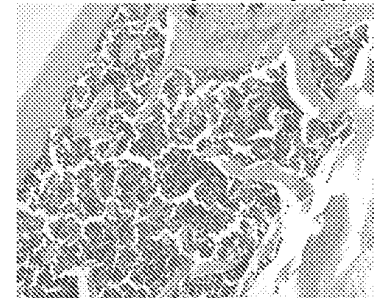
VA-Lip-ARNip aleatorio



HSP47 VA-Lip-ARNip (1)



HSP47 VA-Lip-ARNip (2)



LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	NITTO DENKO CORPORATION	
5	<120>	Agente para tratar la mielofibrosis	
	<130>	PCT2380ND	
10	<150>	JP 2008-228338	
	<151>	2008-09-05	
	<160>	13	
15	<170>	PatentIn versión 3.5	
	<210>	1	
	<211>	27	
	<212>	ARN	
20	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	ARNip-A hebra sentido	
	<400>	1	
25		uggaugggaa agaucgagaa gaaggag	27
	<210>	2	
	<211>	27	
	<212>	ARN	
30	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	ARNip-A hebra antisentido	
35	<400>	2	
		ccuucuucug caucuuccc auccaau	27
	<210>	3	
	<211>	27	
40	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	ARNip-B hebra sentido	
45	<400>	3	
		ugucugagug gguauuuua gacagag	27
	<210>	4	
50	<211>	27	
	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
55	<223>	ARNip-B hebra antisentido	
	<400>	4	
		cugucuaaaa auaccacuc agacaau	27
60	<210>	5	
	<211>	27	
	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	

	<220>		
	<223>	ARNip-C hebra sentido	
	<400>	5	
5		gaugcgagau gaguuguaga guccaag	27
	<210>	6	
	<211>	27	
	<212>	ARN	
10	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	ARNip-C hebra antisentido	
15	<400>	6	
		uggacucuaac aacucaucuc gcaucau	27
	<210>	7	
	<211>	27	
20	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	ARNip-D hebra sentido	
25	<400>	7	
		cagaacugcc cauccuuaaa augauag	27
	<210>	8	
30	<211>	27	
	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
35	<223>	ARNip-D hebra antisentido	
	<400>	8	
		aucauuuaaa ggaugggcag uucugau	27
40	<210>	9	
	<211>	27	
	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	ARNip-E hebra sentido	
	<400>	9	
		gagacaagau gcgagaugag uuguaag	27
50	<210>	10	
	<211>	27	
	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	
55	<220>		
	<223>	ARNip-E hebra antisentido	
	<400>	10	
60		uacaacucau cucgcaucuu gucucau	27
	<210>	11	
	<211>	27	

	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
5	<223>	Scramble ARNip hebra sentido	
	<400>	11	
		cgauucgcua gaccggcuuc auugcag	27
10	<210>	12	
	<211>	27	
	<212>	ARN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Scramble ARNip hebra antisentido	
	<400>	12	
		gcaaugaagc cggucuagcg aaucgau	27
20	<210>	13	
	<211>	2273	
	<212>	DNA	
	<213>	Mus musculus	
25	<400>	13	
		gagcgattgc cctgtcggtc ccggagcagc ccagcccggc ccaggtgagg ggogggacgg	60
		ccggggcgatt tgggggttgcg cattggccaa gggggaacgg atcgtccaaa gcttggggtc	120
		ctgacacagg tgggcagtga aagatcggac ttggaactgt cacttgcttg ggttccctgg	180
		agctgcggtc tagtacggcg actgcctggt aaaccctcac aggtcctctg tgggtgcacac	240
		agcccacctc ccagccatgc gctctctcct tctgggcacc ttatgcctct tggccgtggc	300
		cctggcagcc gaggtgaaga aaccctaga ggcggcagcc cctggtactg cggagaagct	360
		aagttccaag gcgaccacac tggcagagcg cagcacaggc ctggccttca gcctatatca	420
		ggcgatggcc aaagaccagg cgggtggagaa catcctcctg tcacccttgg tgggtggcctc	480
		atccctgggt cttgtgtcac tgggtggtaa agccaccaca gcgtcgcagg cgaaggcagt	540
		gctgagcgct gagaagctgc gcgatgagga ggtgcacacg gggctgggtg agctgctccg	600
		ctccctcagc aactccactg cgcgcaacgt gacctggaaa ctgggcagcc gcctgtacgg	660
		gcccagctcc gtgagcttcg ccgatgactt cgtgcgcagc agcaagcaac actacaactg	720

cgaacactcc aagatcaact tccgagacaa ggcagcgcc ctgcagtcca tcaacgagtg 780
 ggcctcgcag accacggacg gcaagctgcc tgaggtcacc aaggatgtgg agcgcacgga 840
 tggggcactg cttgtgaacg ccatgttctt taagccacac tgggatgaga ggtttcacca 900
 caggatggtg gacaaccgtg gottcatggt gaccogctoc tatactgtgg gtgttacgat 960
 gatgcaccgg acaggcctgt acaactacta tgacgaagag aaggagaagc tgcagatggt 1020
 ggagatgccc ctggctcaca agctctccag cctcatcctc ctcatgcccc accatgtgga 1080
 gccgctcgag cgcttgaga agctgctgac caaggagcag ctgaaggcct ggatgggaaa 1140
 gatgcagaag aaggctgtcg ccatctccct gcccaagggc gtggtggagg tgacccatga 1200
 cctgcagaaa catctggcag gactgggcct gaccgaagcc atcgacaaga acaaggcaga 1260
 cctatcgcg atgtctggca agaaggacct gtacctggcc agtgtgttcc acgccactgc 1320
 cttcgagtgg gacaccgagg gcaaccocct tgaccaagac atctacgggc gcgaggagct 1380
 ggcagcccc aagctgttct atgocgacca ccccttctc ttctgtgtgc gagataatca 1440
 gagcggtcc ttgtcttca ttggccgctt ggtccggccc aaggagagaca agatgcgaga 1500
 tgagttgtag agtccaagag tgggcgtggc acggcaggaa gtagccaaag gttcctgaga 1560
 cacatgggtg ctattgtggg gggaggggga ggcaccaacc ctggatattc cacgggtggg 1620
 ggggggttg cagtgc aaac cggaattccc atatgtctga gtgggtattt ttagacagaa 1680
 tccactccta agttaggaca tggagocag atactatgat accaaattca ggggtgtcac 1740
 agccattttg ttctgcctg caagttttag atccaatctg cctcaacagt caatcagtgt 1800
 tcatatttat ggccaggcat tttatctgtt agacaatcga gttgggggta gggcagccta 1860
 gctctttttg tcaccatgcc ccgagccctc ctcagtcttc ctgttcaccc ctcccccagc 1920
 tccctttaac cgcaaaacta ggtgctgtgg cccagaaact gccatcctt aaaatgatcc 1980
 ttgccagcg gtgggagctg gagacagcgc atggaggggg ctccctggca tacctgccct 2040
 agaactgtta tgttgggcat cacagtcatg aacttttgtt tttctccctt ttttagtttt 2100
 ttcaaagatg gggggagggg aaatatgagc ctttgttgtt ttcaaaacga gaacagtttg 2160
 tacaagtttt tttttgaata aaacttttcc aatgaaatgt tacaggtgtg tgaaagcaga 2220
 ttaaagaaag aggttcccat atcattcttt ctaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2273