

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 869**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 47/40** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 15/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08848047 .0**  
96 Fecha de presentación: **06.11.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2217208**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2010**

54 Título: **COMPLEJO DE ÁCIDO NUCLEICO Y COMPOSICIÓN DE SUMINISTRO DE ÁCIDO NUCLEICO.**

30 Prioridad:  
**08.11.2007 JP 2007291317**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.12.2011**

73 Titular/es:  
**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.**  
**9, KANDA-TSUKASA-MACHI 2-CHOME CHIYODA-**  
**KU**  
**TOKYO 101-8535, JP y**  
**TAKEUCHI, HIROFUMI**

72 Inventor/es:  
**TAKEUCHI, Hirofumi;**  
**TOZUKA, Yuichi;**  
**HIRA, Yasuyuki y**  
**TOYOBUKU, Hidekazu**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 369 869 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**

Complejo de ácido nucleico y composición de suministro de ácido nucleico.

**5 Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un complejo de ácido nucleico que puede alojarse de forma continuada en una célula y que presenta una toxicidad baja y una seguridad elevada, y una composición de suministro del ácido nucleico.

10

**Antecedentes de la técnica**

Con los recientes avances en biotecnología, se han descubierto una serie de ácidos nucleicos que presentan funciones fisiológicamente activas en las células. Por ejemplo, se sabe que el ARNsi (ARN de interferencia pequeño) provoca la degradación del ARNm de un gen diana en una célula, e interfiere en la expresión del gen diana (ARN de interferencia). La función inhibidora en la expresión del gen diana debido a este ARN de interferencia es útil para el alivio o el tratamiento de síntomas de enfermedades provocadas por la expresión anómala de unos genes específicos o un grupo de genes, y se espera que se desarrollen unos agentes terapéuticos que utilizan el ARNsi. Sin embargo, como los ácidos nucleicos son macromoléculas solubles en agua que presentan una carga negativa, presentan una eficacia para el suministro de genes extremadamente baja que tiene como resultado unos efectos terapéuticos ineficaces en las terapias génicas incluyendo las terapias con ARNsi.

15

20

Es sabido que la utilización de un vehículo (vector) suministra eficazmente los genes en las células. Los vectores incluyen vectores víricos y vectores no víricos. Los vectores víricos presentan una eficacia elevada para la introducción del ácido nucleico; sin embargo, existen varios aspectos de seguridad desconocidos incluyendo la patogenicidad, la inmunogenicidad y la citotoxicidad. Por consiguiente, es deseable la utilización de vectores no víricos para las aplicaciones clínicas.

25

Los ejemplos de vectores no víricos incluyen Lipofectamine™ 2000, que ya está disponible comercialmente. Además, se ha descrito un lípido catiónico con una estructura específica (ver, Documento de Patente 1) y una composición (ver, Documento de Patente 2) que contiene un compuesto anfifílico y un policatión. El suministro intracelular del ácido nucleico que utiliza un vector no vírico se realiza mezclando primero el ácido nucleico que se debe suministrar con un vector no vírico para formar un complejo, y después se deja que el complejo se ponga en contacto con la célula diana. Cuando un vector no vírico puede formar un liposoma, el vector se incorpora a la célula con un ácido nucleico envuelto en el liposoma, llevando a cabo de este modo el suministro intracelular del ácido nucleico.

30

35

Sin embargo, los ácidos nucleicos como el ARNsi presentan unas características específicas de una escasa estabilidad y una elevada carga eléctrica. Por consiguiente, el ácido nucleico presenta una estabilidad problemáticamente reducida cuando se mezcla con un vector no vírico, lo que inhibe la introducción continua del ácido nucleico en la célula. Aunque se conoce un ejemplo en el que el ácido nucleico está atrapado en un liposoma mediante la formación de un complejo entre el ARNsi y el polímero catiónico (ver, Documento no de patente 1), no se puede utilizar en la práctica debido a la citotoxicidad del polímero catiónico. Además, incluso cuando se puede formar un complejo estable que utiliza un vector no vírico conocido y un ácido nucleico, el complejo puede presentar una capacidad de suministro baja o se puede suministrar de forma rápida en la célula. Por consiguiente, estos vectores no víricos conocidos no pueden mantener de forma continuada el ácido nucleico en la célula; lo cual hace que fracase a la hora de mantener los efectos deseados obtenidos por el ácido nucleico.

40

45

Teniendo en cuenta la técnica anterior, es deseable el desarrollo de técnicas para el suministro eficaz de un ácido nucleico (por ejemplo, ARNsi) en una célula y para el mantenimiento continuado del ácido nucleico con una toxicidad baja y una seguridad elevada.

50

El Documento de Patente 3 describe las composiciones para el uso terapéutico de un ADN de interferencia. Entre estos, están los constructos del ARNi que se formulan como complejos supramoleculares a partir de polímeros como la β-ciclodextrina que contiene polímeros o polímeros ramificados de ciclodextrina. El documento también describe el suministro del plásmido de ADN que codifica para el ARNsi que es complejo con un polímero ramificado de PEI25k-hi-CD (polietilénimina que presenta un grado elevado de injertos de ciclodextrina) dentro de las células.

55

El Documento de Patente 4 describe una dextrina cíclica altamente ramificada y un procedimiento para su producción.

60

Documento de Patente 1: Publicación de Patente japonesa no Examinada nº 2002-529439

Documento de Patente 2: Publicación de Patente japonesa no Examinada nº 2005-508394

65

Documento de Patente 3: WO 2004/033620 A2

Documento de Patente 4: USA 6248566 B1

Documento que no es de patente 1: Kentaro Kogure *et. al.*, Development of a non-viral-multifunctional-envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method, J. Control. Release, 98 (2004) 317-323.

**Descripción de la invención**

**Problemas que debe resolver la invención**

Un objetivo de la presente invención es resolver los problemas de la técnica anterior. Específicamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un complejo de un ácido nucleico con una toxicidad baja y una elevada seguridad que puede mantener de forma continuada un ácido nucleico, como un ARNsi o similar, en una célula; y una composición para el suministro de ácido nucleico que puede suministrar eficazmente el complejo de ácido nucleico en la célula. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una composición de suministro de ácido nucleico, y un procedimiento para suministrar el ácido nucleico en la célula mediante el contacto de la composición de suministro de ácido nucleico con la célula.

**Medios para resolver los problemas**

Los inventores de la presente invención han realizado una exhaustiva investigación para resolver los problemas anteriores, y han descubierto que se puede obtener un complejo de un ácido nucleico con una toxicidad baja y una seguridad elevada que puede mantener de forma continuada un ácido nucleico en una célula mediante la formación de un complejo que utilizan el ácido nucleico que se ha de introducir en la célula y una dextrina cíclica altamente ramificada, en la que la dextrina cíclica altamente ramificada es un glucano con un grado de polimerización de 50 a 5000 que presenta una parte de estructura interna cíclica ramificada formada por unas uniones  $\alpha$ -1,4-glucósido y por lo menos una unión  $\alpha$ -1,6-glucósido, y una parte de estructura externa ramificada unida a la parte de estructura interna cíclica ramificada.

(1) Los inventores de la presente invención han descubierto que la seguridad, la eficacia del suministro intracelular y la continuidad intracelular de un ácido nucleico se puede mejorar más utilizando, como vehículo de suministro del ácido nucleico para introducir el complejo de ácido nucleico en la célula, un vehículo que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado suyo, y (C) una amina primaria alifática. La presente invención se consiguió realizando más investigaciones basadas en estos tres descubrimientos.

La presente invención proporciona los siguientes Puntos:

Punto 1. Un complejo que comprende un ácido nucleico y una dextrina altamente ramificada, en el que la dextrina altamente ramificada es un glucano con un grado de polimerización de 50 a 5000, una parte de estructura interna cíclica ramificada formada por uniones de  $\alpha$ -1,4-glucósido y por lo menos una unión  $\alpha$ -1,6-glucósido, y una parte de estructura externa ramificada unida a la parte de estructura interna cíclica ramificada.

Punto 2. El complejo de ácido nucleico según el Punto 1, en el que la cantidad de dextrina cíclica altamente ramificada es de 1 a 4000 partes en peso del ácido nucleico.

Punto 3. El complejo de ácido nucleico según el Punto 1 ó 2, en el que el ácido nucleico es un ARNsi.

Punto 4. El complejo de ácido nucleico según uno de los Puntos 1 a 3, que es un agregado que se obtiene mezclando un ácido nucleico con una dextrina altamente ramificada en una solución acuosa.

Punto 5. Una composición de suministro de ácido nucleico que comprende el complejo de ácido nucleico según uno de los Puntos 1 a 4 y un vehículo de suministro del ácido nucleico.

Punto 6. La composición de suministro de ácido nucleico según el Punto 5, en la que el vehículo de suministro del ácido nucleico es una composición que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un Punto seleccionado de entre colesterol y sus derivados, y (C) una amina primaria alifática.

Punto 7. La composición de suministro de ácido nucleico según el Punto 6, en la que el Componente (A) en el vehículo de suministro de ácido nucleico es una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo acilo presenta entre 4 a 23 átomos de carbono.

Punto 8. La composición de suministro de ácido nucleico según el Punto 6, en la que el Componente (B) en el vehículo de suministro de ácido nucleico es colesterol.

Punto 9. La composición de suministro de ácido nucleico según el Punto 6, en la que el Componente (C) en el vehículo de suministro de ácido nucleico es una alquilamina que presenta de 10 a 20 átomos de carbono.

Punto 10. La composición de suministro de ácido nucleico según el punto 6, en la que la proparte molar de los Componentes (A) : (B) : (C) es 5-9:1-5:1.

5 Punto 11. La composición de suministro de ácido nucleico según el punto 6, en la que el vehículo de suministro del ácido nucleico es una preparación de un liposoma en la que la membrana del liposoma está formada por los Componentes (A) a (C).

10 Punto 12. Una composición farmacéutica que comprende la composición para el suministro de ácido nucleico según uno de los puntos 5 a 11.

Punto 13. La composición farmacéutica según el punto 12, en la que el ácido nucleico es un ARNsi.

15 Punto 14. Utilización de la composición de suministro de ácido nucleico según uno de los puntos 5 a 11 para producir una composición farmacéutica para suministrar un ácido nucleico en una célula.

Punto 15. La utilización según el punto 14, en la que el ácido nucleico es un ARNsi.

20 Punto 16. La composición de suministro de ácido nucleico según uno de los puntos 5 a 11 para suministrar un ácido nucleico en una célula.

Punto 17. El procedimiento según el punto 16, en el que el ácido nucleico es un ARNsi.

### **Efectos de la invención**

25 El complejo de ácido nucleico de la presente invención se obtiene mediante la transformación de un ácido nucleico en un complejo que utiliza una dextrina cíclica altamente ramificada que es un glucano con un grado de polimerización de 50 a 5000 y que presenta una parte de estructura interna cíclica ramificada formada por uniones de  $\alpha$ -1,4-glucósido y por lo menos una unión  $\alpha$ -1,6-glucósido, y una parte de estructura externa ramificada unida a la parte de estructura interna cíclica ramificada, haciendo posible de este modo que el complejo de ácido nucleico sea altamente seguro y que sea capaz de mantener de forma estable el ácido nucleico en una célula durante un largo periodo de tiempo de forma que los efectos útiles basados en el ácido nucleico se puedan presentar de forma continuada. Además, el complejo de ácido nucleico de la presente invención se puede convertir fácilmente en un complejo con un vehículo de suministro de ácido nucleico, y se puede encapsular fácilmente incluso en un vehículo de suministro de ácido nucleico en forma de liposoma. El complejo de la presente invención también facilita, por consiguiente, la conversión de la formulación en una composición de suministro de ácido nucleico. Además, la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención puede introducir el complejo de ácido nucleico en la célula.

40 Para suministrar el complejo de ácido nucleico de la presente invención en una célula, la utilización de un vehículo que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado suyo, y (C) una amina alifática primaria, como un vehículo de suministro intracelular puede aumentar la eficacia del suministro intracelular del complejo de ácido nucleico, y puede mejorar aún más la persistencia y la seguridad de este suministro intracelular.

45 Tal como se ha descrito anteriormente, el complejo de ácido nucleico y la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención pueden presentar efectos útiles basados en la eficacia, persistencia y la elevada seguridad del ácido nucleico; por consiguiente, el complejo y la composición son especialmente útiles como composiciones farmacéuticas para la terapia génica. Por consiguiente, la composición farmacéutica o procedimiento de suministro de ácido nucleico en una célula según la presente invención puede suministrar un ácido nucleico en una célula más eficazmente.

### **Mejor modo de poner en práctica la invención**

55 La presente invención se describe con más detalle a continuación.

#### (1) Complejo de ácido nucleico

60 El complejo de ácido nucleico de la presente invención comprende un ácido nucleico y una dextrina cíclica altamente ramificada.

65 El ácido nucleico utilizado para el complejo de ácido nucleico de la presente invención no está limitado por el tipo de estructura, siempre que sea necesario que se suministre en la célula. Los ejemplos específicos de estos ácidos nucleicos incluyen ARNsi, ARNm, ARNt, ARNr, ADNc, ARNmi (microARN), ribosomas, oligos antisentido, oligonucleótidos que actúan como señuelo, plásmido de ADN, ácidos nucleicos péptidos, oligonucleótidos inductores de triple hélice (TFOs), aptámeros, genes, et., entre los que el ARNsi es el preferido. El ARNsi presenta el inconveniente de su baja estabilidad en presencia de vectores no víricos conocidos hasta ahora, pero cuando el

ARNsi se transforma en un complejo de ácido nucleico de la presente invención, tiene la capacidad de suministrarse de forma continuada en una célula así como de presentar una elevada estabilidad. El ácido nucleico utilizado en el complejo de ácido nucleico de la presente invención puede ser un derivado de humanos, animales, plantas, bacterias, virus o similares, o se puede sintetizar químicamente. Estos ácidos nucleicos pueden ser de una sola cadena, de doble cadena, o de triple cadena, y no están limitados por el peso molecular. Además, en la presente invención, se pueden utilizar los ácidos nucleicos modificados con productos químicos, enzimas, o péptidos. Es más, en la presente invención los ácidos nucleicos se pueden utilizar por separado o en combinaciones de dos o más.

La dextrina cíclica altamente ramificada utilizada en el complejo de ácido nucleico de la presente invención se produce permitiendo que una enzima ramificada actúe sobre un sacárido que presente uniones  $\alpha$ -1,4-glucósido y por lo menos una unión  $\alpha$ -1,6-glucósido, como una amilopectina, y es un glucano con un grado de polimerización de 50 a 5000 que presenta una parte de estructura interna ramificada unida y una parte de estructura externa ramificada. La parte de estructura interna ramificada es una parte de estructura cíclica formada por uniones  $\alpha$ -1,4-glucósido y por lo menos una unión  $\alpha$ -1,6-glucósido; y la parte de estructura exterior ramificada es una parte de estructura no cíclica unida a la parte de estructura interna cíclica ramificada. La parte de estructura externa ramificada está unida a la parte de estructura interna cíclica ramificada mediante por lo menos una unión  $\alpha$ -1,6-glucósido. Las formas de dextrina cíclica ramificada preferidas incluyen el glucano indicado anteriormente en el que la parte de estructura interna cíclica ramificada presenta un grado de polimerización de 10 a 100, el glucano indicado anteriormente en el que la parte de estructura externa ramificada presenta un grado de polimerización de 40 o superior, y el glucano indicado anteriormente en el que la unidad de cadenas de la parte de estructura externa ramificada presenta un grado medio de polimerización de 10 a 20. La dextrina cíclica altamente ramificada se puede ilustrar como, por ejemplo, en la Figura 1 en la que la parte de estructura interna cíclica ramificada está indicada mediante (i) y la parte de estructura externa ramificada está indicado por (ii).

El grado de polimerización se pueden determinar mediante filtración en gel utilizando un refractómetro diferencial, a partir de la posición de elución de un material cuyo grado de polimerización es conocido. En esta determinación, el resultado de un refractómetro diferencial es proporcional a la concentración de glucano, y el resultado de un fotómetro de dispersión de luz de láser de ángulo bajo es proporcional al producto del grado de polimerización y la concentración de glucano. Por consiguiente, el grado de polimerización del glucano se puede determinar midiendo la proparte de los resultados de los dos detectores, es decir, un refractómetro y un fotómetro de dispersión de luz de láser de ángulo bajo. Las condiciones específicas se describen en la patente US6248566B1 (Patente japonesa nº 3107358).

La dextrina cíclica altamente ramificada y su proceso de producción se describen en la patente US6248566B1 (Patente Japonesa No. 3107358), y la dextrina altamente ramificada se comercializa como marca comercial registrada "Cluster Dextrin" de Ezaki Clico Co., Ltd.

En el complejo de ácido nucleico de la invención, la proparte de dextrina cíclica altamente ramificada en relación al ácido nucleico no está limitada pero normalmente es de 1 a 4000 partes en peso, preferentemente de 10 a 1000 partes en peso, y más preferentemente de 100 a 400 partes en peso, de la dextrina cíclica altamente ramificada por partes en peso del ácido nucleico. En términos de proparte molar, la proparte anterior es, por ejemplo, de 0,1 a 1000 moles, preferentemente de 1 a 100 moles, y más preferentemente de 10 a 20 moles, de la dextrina cíclica altamente ramificada por moles del ácido nucleico. El cumplimiento de estas propartes hace posible que sea más notable la continuidad del suministro del ácido nucleico mediante un vehículo de suministro de ácido nucleico, y de su seguridad.

El diámetro medio de la partícula del complejo de ácido nucleico de la presente invención normalmente es de 6 a 60 nm, preferentemente de 8 a 30 nm, y más preferentemente de 10 a 20 nm. El diámetro medio de la partícula del complejo de ácido nucleico se determina como un volumen medio del diámetro de la partícula utilizando un procedimiento con dispersión de luz de láser.

El complejo de ácido nucleico de la presente invención es un complejo que se forma mediante la agregación del ácido nucleico y una dextrina cíclica altamente ramificada. El complejo de ácido nucleico de la presente invención se produce mediante la mezcla del ácido nucleico y una dextrina cíclica altamente ramificada en una solución que puede dispersar de forma estable los dos compuestos. Los ejemplos específicos de soluciones que pueden dispersar de forma estable el ácido nucleico y la dextrina cíclica altamente ramificada incluye tampones como Tris y similares. Los tampones pueden contener agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y similares. Las condiciones para la mezcla del ácido nucleico y la dextrina cíclica altamente ramificada deben ser tales que, en la solución indicada anteriormente, por ejemplo, se mezclan aproximadamente de 0,1  $\mu$ M a aproximadamente 100  $\mu$ M, preferentemente de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 10  $\mu$ M, del ácido nucleico con aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M, y preferentemente 10  $\mu$ M a aproximadamente 100  $\mu$ M, de la dextrina cíclica altamente ramificada, a temperatura ambiente durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 minutos, y preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 minutos. El complejo de ácido nucleico de la presente invención producido de esta forma está presente como una dispersión en la solución. La dispersión se puede mezclar tal como está, o después de la disolución o de la concentración con un vehículo de suministro de ácido nucleico si es necesario.

(2) Composición de suministro de ácido nucleico

El complejo de ácido nucleico se incorpora en un vehículo de suministro de ácido nucleico mezclándolo con el vehículo de suministro de ácido nucleico, y de esta forma el ácido nucleico se puede suministrar en la célula. Es decir, la presente invención proporciona también una composición de suministro de ácido nucleico que comprende el complejo de ácido nucleico y un vehículo de suministro de ácido nucleico.

El vehículo de suministro de ácido nucleico es un vector no vírico que se utiliza como un vehículo del ácido nucleico para suministrar (introducir) un ácido nucleico en una célula. La composición de suministro de ácido nucleico es una composición que se utiliza para poner en contacto el ácido nucleico con la célula en la que se debe suministrar el ácido nucleico, con el fin de introducir en la célula el ácido nucleico contenido en la composición.

Formulación del vehículo de suministro de ácido nucleico

El vehículo de suministro de ácido nucleico que se utiliza en la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención no está limitado siempre y cuando sea capaz de incorporar un ácido nucleico en una célula. Los ejemplos de vehículos de suministro de ácido nucleico que se pueden utilizar incluyen los vehículos conocidos como Lipofectamine™ 2000 y similares.

Desde el punto de vista de un mayor perfeccionamiento de la continuidad intracelular del ácido nucleico contenido en el complejo de ácido nucleico, y un mayor perfeccionamiento de la eficacia y seguridad del suministro intracelular, es preferible utilizar, por ejemplo, un vehículo que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o sus derivados, y (C) una amina alifática primaria (denominado de aquí en adelante "Vehículo 1").

La diacilfosfatidilcolina (denominada algunas veces de aquí en adelante "Componente (A)") que se utiliza en el Vehículo 1 no está limitada siempre y cuando sea farmacológicamente aceptable, y puede ser, por ejemplo, una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo acilo presenta entre 4 y 23 átomos de carbono. El número de carbonos de los dos grupos acilos que constituyen la diacilfosfatidilcolina pueden ser iguales o diferentes.

Los ejemplos específicos de diacilfosfatidilcolina incluyen dilauroilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina, palmitoilestearoilfosfatidilcolina, dibutiloilfosfatidilcolina, dihexanoilfosfatidilcolina, diheptanoilfosfatidilcolina, didecanoilfosfatidilcolina, diftanoilfosfatidilcolina, didodecilfosfatidilcolina, dieicosanoilfosfatidilcolina, dihencosanoilfosfatidilcolina, dierucoilfosfatidilcolina, diraquidonoilfosfatidilcolina, bis (tricosadinoil) fosfatidilcolina, etc. Entre estos, los ejemplos preferidos incluyen diacilfosfatidilcolinas en las que el grupo ácido presenta de 12 a 18 átomos de carbono; los ejemplos más preferidos incluyen dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina, palmitoilestearoilfosfatidilcolina y diacilfosfatidilcolinas en los que el grupo acilo presente de 13 a 17 átomos de carbono; los ejemplos especialmente preferidos incluyen dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y distearoilfosfatidilcolina; y los ejemplos más preferidos incluyen distearoilfosfatidilcolina. Estas diacilfosfatidilcolinas se pueden utilizar separadamente o en combinación de dos o más.

El colesterol y/o sus derivados (denominado a veces de aquí en adelante "Componente (B)") que se utiliza en el Vehículo 1 no está limitado siempre y cuando sea farmacológicamente aceptable. Los derivados del colesterol son lípidos catiónicos con un esqueleto de colesterol y los ejemplos específicos incluyen colesterol 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol (DC-Col), 3 $\beta$ -[N'-N',N'-trimetilaminoetano) colesterol yodado (TC-Col), bis (guanidinio)-tren-colesterol (BGTC), N- colesteriloxicarbamoil- 3,7- diazanonan-1,9- diamina,  $\beta$  -alanina-dietanolamina- colesterol, N<sup>4</sup>- espermina colesteril carbamato (GL- 67), N [N<sup>4</sup>- 3- aminopropilespermidina] cloesteril carbamato (GL- 78), N<sup>4</sup>- espermina colesteril carboxamida (GL- 90), N1-N8- bis (arginina carboxamida) -N<sup>4</sup>- espermina colesteril carbamato (GL- 95), y N- [N<sup>1</sup>, N<sup>4</sup>, N8- tris- (3-aminopropil) espermidina ] colesteril carbamato (GL- 96). Los ejemplos preferidos del componente (B) incluyen colesterol. En el vehículo 1, el colesterol y sus derivados se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más como componente (B).

Los ejemplos preferidos de Componente (B) incluyen colesterol. En el Vehículo 1, el colesterol y sus derivados se pueden utilizar separadamente o en combinación de dos o más como Componente (B).

La amina alifática primaria (denominada a veces de aquí en adelante "Componente (C)") que se utiliza en el Vehículo 1 no está limitado siempre y cuando sea farmacológicamente aceptable, y puede ser, por ejemplo, un alquilamino en el que el grupo alquilo presenta de 10 a 20 átomos de carbono.

Los ejemplos específicos de aminas alifáticas primarias incluyen laurilamina, miristolamina, estearilamina, oleilamina, decanoilamina, ftanoilamina, etc. Entre estos, las alquilaminas en las que el grupo alquilo presenta de 12 a 18 átomos de carbono son los preferidos; la estearilamina, oleilamina y palmitoilamina son las más preferidas; y la estearilamina es especialmente preferida. Estas aminas alifáticas primarias se pueden utilizar separadamente o en combinación de uno o más.

El Vehículo 1 comprende una combinación de los Componentes (A) a (C) descritos anteriormente. Para mejorar más la eficacia del suministro intracelular del ácido nucleico, y reducir más la toxicidad, las siguientes combinaciones son las preferidas:

- 5 (A) una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo acilo presenta de 4 a 23 átomos de carbono, (B) colesterol y/o sus derivados, y (C) una alquilamina  $C_{10-20}$ ; y más preferentemente, (A) dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y/o distearoilfosfatidilcolina, (B) colesterol, y (C) estearilamino.

10 En el Vehículo 1, la proparte de los Componentes (A) a (C) no está limitada, y puede ser, por ejemplo, una proparte molar de Componentes (A) : (B) : (C) de 5-9: 1-5: 1, preferentemente 6-9: 1-4: 1, y más preferentemente 7-8: 2-3: 1. El cumplimiento de estas propartes hace posible conseguir un suministro intracelular de ácido nucleico con una eficacia mejorada y una toxicidad baja.

15 La cantidad total de los Componentes (A) a (C) en la cantidad total del Vehículo 1 es, por ejemplo, 1 a 100 % del peso total, preferentemente 2 a 90 % del peso total, y más preferentemente 30 a 70% del peso total.

20 El Vehículo 1 puede contener, además de los Componentes (A) a (C), otros lípidos catiónicos. Los ejemplos específicos de lípidos catiónicos que se pueden utilizar incluyen escualamina, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -tris(3-aminopropoxi)-5 $\beta$ -colan-24-(N,N-bis(3-aminopropil)amina), 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -tris(3-aminopropoxi)-5 $\beta$ -colan-24-(N-(N-(3-aminopropil))-3-aminopropil)amina, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -tris(3-acidopropoxi)-5 $\beta$ -colano-24-(N,N-bis(2-cianoetil)amina)), 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -tris(3-acidopropoxi)-5 $\beta$ -colan-24-(N-(benciloxicarbonil)-N-(3-hidroxiopropil)amina), y como lípidos catiónicos a los que se unen los esteroides; conjugados umbrela-espermina y como lípidos catiónicos a los que se une el ácido cólico; lípidos catiónicos a los que se une el glicosido esteroil; lípidos catiónicos a los que se une la saponina esteroide; sal bromureo de dimetil dioctadecil amonio (DDBA), propano 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio, propano 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio (DOTAP), metilsulfato de propano 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio, propano 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio, propano 1,2-distearoil-3-trimetilamonio, clorhidrato de N-(1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), sal bromuro de dimiristoiloxipropil dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), bromuro de dioleoiloxipropil dimetilhidroxietilamonio (DORIE), bromuro dimetildidodecilamonio, clorhidrato de N-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil)didodecil-D-glutamina, clorhidrato N-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil)didodecil-O,O'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)-L-glutamina, clorhidrato de O,O'-didodecanoil-N-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil)diethylamino, bromuro metilalilididodecil amonio, bromuro N-{p-(w-trimetilamonio)butiloxi}benzoil}-didodecil-L-glutamina, bromuro de 9-(w-trimetilamonio)butil)-3,6-bis(dodecanoil)carbazol, clorhidrato de dimetildioctadecil amonio, bromuro N-w-trimetilamoniodecanoil-dihexadecil-D-glutamina, bromuro N-{p-(w-trimetilamonio)hexiloxi}-benzoil}-dietradecil-L-glutamina, sal bromuro de p-(w-trimetilamonio)deciloxi}-p'-octiloxiazobenceno (MC-1-0810), sal de bromuro p-(w-(b-hidroxi)etil)dimetil-amonio-deciloxi}-p'-octiloxiazobenceno (MC-3-0810), sal bromuro de O,O',O''-tritodecanoil-N-(w-trimetilamonio)decanoil)-tris(hidroxi)metil)aminoetano (TC-1-12), 1,2-dilauril-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dimiristoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dipalmitoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-distearoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dioleoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1-palmitoil-2-oreoil-glicero-3-etilfosfocolina, y tipos de sales de amonio cuaternario de lípidos catiónicos similares; etc.

40 Cuando el Vehículo 1 contiene un lípido catiónico distinto a los Componentes (A) a (C), la proparte del lípido catiónico no está limitada siempre y cuando no se dañen los efectos de la presente invención, y pueden ser, por ejemplo, de 1 a 10 partes en peso, preferentemente de 2 a 8 partes en peso, y más preferentemente de 4 a 6 partes en peso, por 100 partes en peso de los Componentes (A) a (C) en total.

45 El Vehículo 1 puede contener además una base oleosa, si es necesario. La adición de una base oleosa para utilizar sus propiedades permite controlar la eficacia de la introducción del ácido nucleico mediante el Vehículo 1. Por ejemplo, cuando se añade una base oleosa para ajustar la gravedad específica del Vehículo 1, se puede controlar el contacto de una célula con el Vehículo 1, mejorando de esta forma la eficacia de la introducción *in vitro*. Además, por ejemplo, cuando se añade una base oleosa con una función de sensibilidad a la temperatura, el núcleo del vehículo del ácido nucleico se puede desintegrar bajo unas condiciones de temperatura predeterminadas para inducir fluctuaciones en la superficie de la célula, mejorando así la eficacia de introducción del ácido nucleico. Además, por ejemplo, cuando se añade una base oleosa que presenta la capacidad de ser interrumpida mediante un estímulo externo, el núcleo del Vehículo 1 se puede desintegrar mediante un estímulo externo para inducir fluctuaciones en la superficie de la célula; mejorando así la eficacia de la introducción del ácido nucleico.

55 Los ejemplos de bases oleosas que se pueden añadir al Vehículo 1 incluyen perfluorocarbono, perfluoropentano, bromuro de perfluorooctilo, perfluorohexano, perfluorotributilamino, aceite de soja, aceite de soja refinado, aceite de soja hidrogenado, aceite de soja insaponificado, escualeno, aceite de ricino, aceite de clavo, trioleato de sorbitán, 60 aceite de trementina, aceite de cártamo, ácido graso de aceite de cártamo, ácido oleico, aceite de palma, aceite de colza, aceite de fusel, aceite de oliva, aceite de linaza, aceite de sésamo, aceite de clorofila, aceite de croton, aceite de bergamota, aceite de cedro, aceite de naranjo, aceite de hinojo, aceite de eucalipto, aceite de maíz, aceite de lavanda, aceite de mejorana, aceite de limón, aceite de algodón, aceite de de yema de huevo, aceite de rosa, aceite de pino, aceite de almendras, aceite de cacahuetes, aceite de camelia, aceite de alcanfor blanco, aceite de 65 camomila, aceite de canela, aceite de menta, aceite de maíz esterificado, aceite de jengibre, aceite de camomila romana, aceite de serpiente, aceite de menta verde, aceite de girasol, manteca de cacao, aceite de trigo germinado,

aceite de óxido de zinc, aceites endurecidos, aceites vegetales hidrogenados, parafina líquida ligera, parafina líquida, triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, aceite de visón, aceite de naranja amarga, polioxietileno de aceite de ricino polioxietileno, aceite de ricino polioxietileno hidrogenado, aceite de ricino polioxietileno 10 hidrogenado, aceite de ricino polioxietileno 100 hidrogenado, aceite de ricino polioxietileno 20 hidrogenado, aceite de ricino polioxietileno 40 hidrogenado, aceite de ricino polioxietileno 5 hidrogenado, aceite de ricino polioxietileno 50 hidrogenado, aceite de ricino polioxietileno 60 hidrogenado, aceite de ricino polioxil 35, aceites procesados, etc. Entre estas bases oleosas, el perfluoropentano es sensible a la temperatura y presenta la propiedad de entrar en ebullición a una temperatura de 29,5°C y, por consiguiente, transformarse en gas. Además, el perfluorohexano, el bromuro de perfluorooctilo y el perfluorotributilamino presentan la capacidad de romperse por cualquier estímulo externo, y presentan la propiedad de producir cavitación en el núcleo del Vehículo 1 y desintegrarlo cuando recibe un estímulo externo como una irradiación ultrasónica.

Cuando contiene una base oleosa, su proparte no está limitada siempre y cuando no se interrumpan los efectos de la presente invención, y puede ser, por ejemplo, de 0,1 a 50 partes en peso, preferentemente de 1 a 30 partes en peso, y más preferentemente de 5 a 20 partes en peso, por 100 partes en peso de los Componentes (A) a (C) en total.

El Vehículo 1 puede contener además un lípido fusogénico de membrana (lípido de ayuda) si es necesario. Cuando contiene un lípido fusogénico de membrana, el Vehículo 1 presenta una mejora superior de la eficacia del suministro intracelular del ácido nucleico. Los ejemplos de estos lípidos con membrana fusible incluyen dioleoilfosfatidiletanolamina, dioleoil-fosfatidilcolina, transfosfatidilfosfatidiletanolamina, 1,2-bis- (10,12-tricosadinoil)-fosfoetanolamina, 1,2-dilaidoilfosfoetanolamina, 1,2-dihexadecilfosfoetanolamina, 1,2-dihexanoilfosfoetanolamina, 1,2-dilauroilfosfoetanolamina, 1,2-dilinoilfosfoetanolamina, 1,2-dimiristoilfosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoleoil-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina, 1,2-difitanoilfosfoetanolamina, 1,2-distearoilfosfoetanolamina, 1-palmitoil-2-oleoilfosfoetanolamina, 1-palmitoil-2-(10,12-tricosadinoil)fosfoetanolamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-caproilamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-caproilamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N,N-dimetil, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N,N-dimetil, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-dodecanoil, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-dodecanoil, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-dodecanilamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-dodecanilamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-glutarilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-glutarilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-lactosa, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidemetil)ciclohexano-carboxilato] (dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidemetil)ciclohexano-carboxilato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidefenil)butilamida], 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimidefenil)butirato], 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-metilo, dipalmitoilfosfoetanolamina-N-metilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato], 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-(succinilo), etc. Entre estos lípidos, la dioleoilfosfatidiletanolamina se puede utilizar de forma ventajosa en el Vehículo 1.

Cuando contiene este lípido fusogénico de membrana, su proparte no está limitada siempre y cuando no se dañen los efectos de la presente invención, y puede ser, por ejemplo, de 1 a 500 partes en peso, preferentemente de 10 a 250 partes en peso, y más preferentemente de 25 a 100 partes en peso, por 100 partes en peso de los Componentes (A) a (C) en total.

El Vehículo 1 puede contener algunos aditivos como agentes isotónicos, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, tampones, conservantes, etc.; y/o vehículos acuosos como agua purificada, soluciones acuosas de azúcar, soluciones tampón, solución salina fisiológica, soluciones acuosas de polímeros, agua sin ARNasa, etc.; según la forma de utilización. Las cantidades de estos aditivos y vehículos acuosos que se pueden añadir se pueden seleccionar de forma adecuada según la forma de utilización del vehículo de suministro de ácido nucleico.

#### 50 Forma del vehículo de suministro de ácido nucleico

La forma del vehículo de suministro de ácido nucleico no está limitada siempre y cuando el ácido nucleico que se debe suministrar en la célula se pueda encapsular, pero es preferible en forma de un liposoma. Por ejemplo, cuando el Vehículo 1 está en forma de un liposoma, los Componentes (A) a (C), y otros lípidos utilizados opcionalmente, forman una membrana de liposoma.

Cuando el vehículo de suministro de ácido nucleico está en la forma de un liposoma, puede ser una vesícula unilamelar pequeña (SUV), una vesícula unilamelar grande (LUV), o una vesícula multilamelar (MLV). El diámetro de la partícula del vehículo de suministro de ácido nucleico se puede elegir adecuadamente según el tipo de célula en el que se suministra el ácido nucleico, y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 100 nm para SUV, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 nm para LUV, y de aproximadamente 400 a aproximadamente 3500 nm para MLV. El diámetro de la partícula del liposoma se mide utilizando un procedimiento de dispersión dinámica de luz de láser.

Los procedimientos conocidos en la técnica se pueden utilizar para producir el liposoma y ajustar el diámetro de la partícula al liposoma. Por ejemplo, en el caso del Vehículo 1, un liposoma se puede formar mediante un



procedimiento de película delgada, un procedimiento de evaporación en fase inversa, un procedimiento de inyección de éter, un procedimiento de surfactante, y un procedimiento de calentamiento, o similares, utilizando una fase oleosa que contiene los Componentes (A) a (C) y una fase acuosa (vehículo acuoso). El diámetro de la partícula se puede ajustar mediante un procedimiento de extrusión, un procedimiento de prensa francesa, un procedimiento de homogeneización, o similares.

#### Forma, formulación y procedimiento de la utilización de la composición de suministro de ácido nucleico

Cuando el vehículo de suministro de ácido nucleico está en forma de liposoma, el complejo de ácido nucleico en la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención puede estar presente en un estado de encapsulación en la fase acuosa interna del liposoma, o en un estado unido a la superficie interna o externa de la membrana del liposoma mediante una unión iónica o hidrofóbica. Cuando el vehículo de suministro de ácido nucleico está en otra forma distinta al liposoma, el complejo de ácido nucleico en la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención forma un complejo con los componentes del vehículo de suministro de ácido nucleico mediante una unión iónica o hidrofóbica.

La composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención se produce mediante la mezcla del complejo de ácido nucleico con el vehículo de suministro de ácido nucleico y la formulación de la mezcla en una forma deseada, o mediante la mezcla de los componentes del complejo de ácido nucleico y la composición del vehículo de suministro de ácido nucleico en un orden aleatorio y la formulación de la mezcla en una forma deseada.

En la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención, la proparte del complejo de ácido nucleico en relación al vehículo de suministro de ácido nucleico depende del tipo de complejo de ácido nucleico, del tipo de vehículo de suministro de ácido nucleico, y del tipo de célula en la que se suministra el ácido nucleico, etc. La proparte puede ser, por ejemplo, de 1 a 100 partes en peso, preferentemente de 10 a 100 partes en peso, y más preferentemente de 20 a 100 partes en peso, del complejo de ácido nucleico por 100 partes en peso de la cantidad total del vehículo de suministro de ácido nucleico. Más específicamente, cuando el Vehículo 1 se utiliza como vehículo de suministro de ácido nucleico, la proparte puede ser, por ejemplo, de 1 a 100 partes en peso, preferentemente de 10 a 100 partes en peso, y más preferentemente de 20 a 100 partes en peso, del complejo de ácido nucleico por 100 partes en peso de la cantidad total de los Componentes (A) a (C) contenidos en el Vehículo 1.

Además, cuando el Vehículo 1 se utiliza como vehículo de suministro de ácido nucleico, la cantidad total de los Componentes (A) a (C) contenidos en el Vehículo 1 puede ser, por ejemplo, de 10 a 90 % p, preferentemente de 30 a 80 % peso total, y más preferentemente de 40 a 60 % peso total, en relación con la cantidad total de la composición de suministro de ácido nucleico.

La composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención puede contener varios aditivos como agentes isotónicos, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, tampones, conservantes, etc.; y/o vehículos acuosos como agua purificada, soluciones acuosas de glucosa, soluciones de tampón, solución salina fisiológica, etc.; según la forma de utilización. Las cantidades de estos aditivos y vehículos acuosos se pueden seleccionar adecuadamente según la forma de utilización de la composición de suministro de ácido nucleico.

La composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención se puede utilizar ella misma como una composición farmacéutica para la terapia génica, es decir, como una composición farmacéutica. Cuando la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención se utiliza como una composición farmacéutica, se seleccionan un vehículo de suministro de ácido nucleico, una base, un vehículo, etc. que son farmacológicamente aceptables. La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en varias formas farmacéuticas. Los ejemplos de la forma de la composición farmacéutica de la presente invención incluyen preparaciones líquidas como soluciones (incluyendo jarabes y similares), gotas, inyecciones, etc.; y preparaciones sólidas como comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas), etc. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una preparación líquida, se puede conservar mediante congelación o liofilización o similares para extraer el agua. Las preparaciones liofilizadas, jarabes secos, etc. se pueden redisolver en el momento de su utilización, en agua destilada para inyección agua esterilizada, etc. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una preparación sólida, se puede volver a disolver en el momento de su utilización en agua destilada para inyección, agua esterilizada, etc.

En la presente invención, la célula en la que se debe suministrar el ácido nucleico, es decir, la célula en la que se aplica la composición farmacéutica de la presente invención, no está limitada, y puede ser una célula en cultivo, una célula aislada de un organismo (incluyendo líneas celulares establecidas), una célula *in vivo*, etc., y puede ser derivada de un humano o de un animal. La composición farmacéutica de la presente invención se puede aplicar tanto *in vivo* como *in vitro*.

En la presente invención, un ácido nucleico se puede suministrar en una célula a través de la etapa de poner en contacto la composición farmacéutica de la presente invención con la célula. El procedimiento para poner en contacto la composición farmacéutica con la célula no está limitado, siempre y cuando se ponga en contacto una

cantidad adecuada de la composición de suministro de ácido nucleico con la célula en la que se ha de introducir el ácido nucleico. Por ejemplo, el procedimiento puede ser el mismo que el procedimiento conocido hasta la fecha en terapia génica, y lo mismo en lo que se refiere a la cantidad que se ha de poner en contacto: el procedimiento y la cantidad se seleccionan adecuadamente. De esta forma, la aplicación de la composición farmacéutica de la presente invención en una célula permite un fácil suministro intracelular de un ácido nucleico y mantiene el ácido nucleico suministrado estable y de forma continuada en la célula.

Por ejemplo, para llevar a contacto la composición farmacéutica de la presente invención a contacto con una célula *in vitro*, la célula se puede cultivar en presencia de una cantidad adecuada de de la composición farmacéutica. Para llevar a contacto *in vitro* la composición farmacéutica de la presente invención con una célula en cultivo o una célula aislada de un organismo, el contacto se puede realizar en presencia de un suero sanguíneo. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se pone en contacto con una célula *in vivo*, la composición farmacéutica de la presente invención se puede poner en contacto con la célula mediante, por ejemplo, inyección directa en un tejido; inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, interperitoneal o intraocular, o inyección en el tracto digestivo, un diente, o similares; administración por inhalación en la cavidad nasal, cavidad bucal, pulmones, o similares; administración oral; administración transdérmica, administración transmucosa a través de la mucosa nasal, la mucosa vaginal, la mucosa ocular, la mucosa rectal o la mucosa uterina; o similares.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además, si es necesario, un vehículo o una base farmacológicamente aceptable. El vehículo y la base no están limitados siempre y cuando no se dañen los efectos de la presente invención y se seleccionan adecuadamente según la forma de utilización. Los ejemplos incluyen los mencionados anteriormente. En este caso, las propartes de composición farmacéutica, vehículo y base tampoco están limitadas siempre y cuando no dañen los efectos de la presente invención, y se seleccionan adecuadamente según la forma de utilización.

En la aplicación de la composición farmacéutica de la presente invención, se aplica una cantidad efectiva de composición farmacéutica. Por ejemplo, la composición farmacéutica se aplica en una cantidad tal que el complejo de ácido nucleico contenido en ella se aplica en una cantidad de 0,001 a 10 pM, preferentemente de 0,001 a 1 pM, y más preferentemente de 0,01 a 0,1 pM por célula.

La composición farmacéutica de la presente invención es capaz de suministrar un ácido nucleico específico en una célula. Es decir, la composición farmacéutica de la presente invención es eficaz para el suministro en una célula un ácido nucleico específico que está presente en la composición farmacéutica y que forma el complejo de ácido nucleico, por medio de llevar a contacto la composición farmacéutica con la célula.

La presente invención también proporciona un procedimiento para el suministro de un ácido nucleico en una célula. El procedimiento para suministrar un ácido nucleico en una célula según la presente invención comprende la etapa descrita anteriormente de poner en contacto el complejo de ácido nucleico o la composición de suministro de ácido nucleico con la célula. El contacto entre el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico no está limitado, siempre y cuando una cantidad adecuada de complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico se ponga en contacto con la célula en la que se introduce el ácido nucleico. Por ejemplo, el contacto se puede realizar de la misma forma que en el procedimiento conocido hasta la fecha en terapia génica, y lo mismo por lo que se refiere a la cantidad que se ha de poner en contacto: la forma y la cantidad de contacto se seleccionan adecuadamente.

Al poner en contacto el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico con la célula de la forma indicada anteriormente, el ácido nucleico se puede mantener de forma estable y continuada en la célula. Para el contacto con la célula, el complejo de ácido nucleico se puede utilizar en solitario o en combinación con un vehículo o una base tal como se ha descrito anteriormente. Para un suministro intracelular del ácido nucleico más eficaz, es preferible poner en contacto la composición de suministro de ácido nucleico con la célula.

En la presente invención, tal como se ha mencionado anteriormente, la célula en la que se suministra el ácido nucleico no está limitada, y puede ser una célula en cultivo, una célula aislada de un organismo (incluyendo líneas celulares establecidas), una célula *in vivo*, o similares y puede ser derivada de un humano o de un animal. El contacto mencionado anteriormente se puede realizar *in vitro* o *in vivo*.

Por ejemplo, para poner en contacto el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico con una célula *in vitro*, la célula se puede cultivar en presencia de una cantidad adecuada de complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico. Para poner en contacto *in vitro* el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico con una célula en cultivo o una célula aislada de un organismo, el contacto se puede realizar en presencia de suero sanguíneo. Cuando el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico se pone en contacto con una célula *in vivo*, el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico se puede llevar a contacto con la célula mediante, por ejemplo, inyección directa en un tejido; inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intraocular, o inyección en el tracto digestivo, un diente, o similar; administración por inhalación en la cavidad nasal, cavidad oral, pulmones, o similar; administración oral; administración transdérmica; administración transmucosa a

través de la mucosa oral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa rectal o mucosa uterina o similares.

En el procedimiento de suministro de ácido nucleico en una célula según la presente invención, una cantidad eficaz del complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico se pone a contacto con una célula para introducir el ácido nucleico en la célula. Por ejemplo, la cantidad de complejo de ácido nucleico o de composición de suministro de ácido nucleico que se ha de administrar se selecciona de forma que se administran de 0,001 a 10 pM, preferentemente de 0,001 a 1 pM, y más preferentemente de 0,01 a 0,1 pM del complejo de ácido nucleico por célula.

El procedimiento de suministro de ácido nucleico en la célula según la presente invención se puede realizar poniendo en contacto la composición farmacéutica con la célula. Cuando se utiliza la composición farmacéutica, el procedimiento de la presente invención se puede realizar de la misma forma que se ha descrito anteriormente.

**Ejemplos**

A continuación, se describirá la invención detalladamente sobre la base de los Ejemplos y similares, pero la invención no se limita a estos ejemplos. En los ejemplos siguientes y en los ejemplos de prueba, se utilizó como ARNSiGL3-ARNsi (ARNsi para luciferasa firefly (de luciérnaga); Dharmakon Research, Inc., (Boulder, CO), USA; sentido: 5' -CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT, antisentido: 5' -UCGAAGUACUCAGCGUAGdTdT). La dextrina en agregados (Ezaki Glico Co., Ltd.) se utilizó como dextrina cíclica altamente ramificada.

**Ejemplo 1**

Preparación del complejo que contiene ARNSi y dextrina cíclica altamente ramificada

Se preparó una solución que contenía ARNSi a una concentración de 2 µM (solución de ARNSi) utilizando una solución tamponada Tris-EDTA (TE) (fabricada por Fluka Co., Ltd. Además, se preparó una solución que contenía una dextrina cíclica altamente ramificada a una concentración de 25 µM (solución de dextrina cíclica altamente ramificada) utilizando una solución tamponada Tris-EDTA (TE) (fabricada por Fluka). Se mezcló una cantidad igual de estas soluciones durante un minuto para formar un complejo de ARNSi. La Tabla 1 muestra las propiedades obtenidas del complejo de ARNSi.

Tabla 1

	Diámetro de la partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
Complejo	31,1	-42,9

# El diámetro de la partícula que se muestra es un diámetro medio de la partícula (nm) medido utilizando un ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT) (el volumen medio del diámetro de la partícula se midió utilizando un procedimiento de difracción de láser). El potencial zeta se midió utilizando un ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT).

**Ejemplo 2**

Preparación de un complejo de ARNSi que contiene la composición de suministro de ácido nucleico

Se pesaron diestearoil-fosfatidilcolina (DSCP), colesterol y estearilamina en una proparte molar de 7: 3: 1, y se disolvieron en cloroformo utilizando un matraz (frasco de recuperación). La solución se secó bajo presión reducida utilizando un evaporador rotatorio para formar una capa de membrana lipídica delgada. Se añadió la solución que contenía 0,028 mg/ml de un complejo de ARNSi obtenido en el Ejemplo1 a la capa de membrana lipídica delgada resultante de forma que la solución presentaba una concentración de DSCP de 30 mg/mL, y después se mezclaron. Después, se ajustó el diámetro de la partícula de la solución pasándolo a través de membranas con un diámetro de poro de 800 nm y 200 nm utilizando un extrusor, para preparar una composición de suministro de ARNSi en forma de liposoma catiónico. La composición resultante de suministro de ARNSi presentaba un diámetro de partícula de aproximadamente 200 nm, y estaba en forma de liposoma en el que las partículas presentaban un tamaño de partícula uniforme. La composición presentaba un potencial zeta de aproximadamente 50 mV. El diámetro de la partícula que se muestra es un diámetro de partícula medio (nm) medido utilizando un ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT) (el volumen medio del diámetro de la partícula se midió utilizando un procedimiento de difracción de láser). El potencial zeta se midió utilizando un ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT).

**Ejemplo 3**

Preparación de un complejo de ARNSi que contiene una composición de suministro de ácido nucleico

Se preparó una composición de suministro de ácido nucleico en un liposoma catiónico de la misma forma que en el Ejemplo 2, con la excepción que la proparte de DSCP, colesterol y estearilamina fue de 7: 3: 2. Como en el Ejemplo

2, la composición resultante de suministro de ARNsi presentaba un diámetro de partícula de aproximadamente 200 nm, y estaba en forma de un liposoma en el que las partículas presentaban un tamaño de partícula uniforme. La composición presentaba un potencial zeta de aproximadamente 50 mV.

5 **Ejemplo de prueba 1**

Evaluación de la eficacia de la inclusión del ARNsi

10 Se preparó un complejo de ARNsi marcado con FITC de la misma forma que en el Ejemplo 1 anterior, utilizando ARNsi pre- marcado con FITC. Utilizando el complejo de ARNsi marcado con FITC, se preparó una composición de suministro de ácido nucleico en forma de liposoma catiónico bajo las mismas condiciones que en los Ejemplos 2 y 3. La composición de suministro de ARNsi se precipitó mediante centrifugación (a 75000 rpm durante 1 hora) inmediatamente después de la preparación, y se midió la intensidad de la fluorescencia del ARNsi marcado con FITC presente en su sobrenadante para calcular la eficacia de la inclusión del ARNsi (una tasa (%) de ARNsi  
15 envuelta en el liposoma del ARNsi total).

Como consecuencia, la eficacia de inclusión del ARNsi indicaba niveles elevados del 97,2% cuando se preparaba bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 2 y 99,8% cuando se preparaba bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 3. Esto revela que el complejo de ácido nucleico de la invención presenta la característica de introducirse eficazmente en un vehículo para un suministro de un ácido nucleico presuntamente a que la dextrina cíclica altamente ramificada forma un complejo compacto con el ARNsi.

**Ejemplo de la prueba 2**

25 Prueba de evaluación de la seguridad celular

Se realizó una evaluación utilizando un ensayo de MTS. Para el ensayo de MTS se utilizó un ensayo de proliferación celular en CellTiter 96 en una solución acuosa producido por Promega Corporation. Específicamente, se inocularon células A594 (ATTC, USA) a  $3,16 \times 10^4$  células/pocillo en 200 µl de Dubelcco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) que contenía 10 vol% de suero bovino fetal (FBS) en una placa de 96 pocillos, y se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Después enjuagarlo tres veces con una solución salina de Hank equilibrada (HBSS), el medio se cambió a DMEM sin FBS. Se añadieron cada una de las composiciones de suministro de ácido nucleico en una cantidad de 20 µl por pocillo y se incubaron a una temperatura de 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. Después, el sobrenadante del cultivo en los pocillos se cambió a DMEM con 10 vol% de FBS y se incubó a una temperatura de 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 horas otra vez. Después, se añadieron veinte µl de un reactivo de MTS (sal de tetrazolio) y se añadieron 100 µl de un medio de DMEM con 10 vol% de FBS a cada pocillo, y se incubaron durante dos horas. Se determinó la absorbencia a una longitud de onda de 492 nm, y se calculó la viabilidad celular. La viabilidad celular calculada por la determinación de la absorbencia a una longitud de onda sin añadir la composición de suministro de ácido nucleico que se incubó bajo las condiciones anteriores, fue del 100%.

La Figura 2 muestra los resultados. Tal como se muestra en la Figura 2, era evidente que todas las composiciones de suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 2 y 3 presentan una toxicidad baja y son altamente seguros. Especialmente, se confirmó que las composiciones de suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 2 y 3 mostraron un elevado nivel de seguridad.

**Ejemplo de la prueba 3**

Prueba de evaluación de la eficacia del suministro del ARNsi en las células

50 Se evaluó la eficacia de la introducción intracelular del ARNsi a través de la medición de la intensidad de la fluorescencia del ARNsi marcado con FITC utilizando citometría de flujo. En esta prueba, se utilizó una composición de suministro de ácido nucleico preparada con ARNsi marcado con FITC. Específicamente, se inocularon células A594 (ATTC, USA) a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/pocillo en 500 µl de DMEM que contenía 10 vol% de FBS en una placa de 24 pocillos, y se incubaron a una temperatura de 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Después de enjuagarlo tres veces con una solución HBSS, se añadieron 0,95 ml de DMEM sin FBS. Se añadieron además 0,05 ml de cada una de las composiciones de suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 1 y 2 a cada pocillo y se incubaron a una temperatura de 37°C a un 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. Después, el sobrenadante del cultivo en los pocillos se cambió a DMEM con 10 vol% de FBS y se incubó a una temperatura de 37°C a un 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 horas de nuevo. Cada pocillo se enjuagó con HBSS una vez, y se añadieron 0,2 ml de CellScrubBuffer (fabricado por Gene Therapy Systems, Inc.). La incubación se realizó a una temperatura de 37°C a un 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 minutos. Los pocillos se enjuagaron otra vez con HBSS dos veces, y se desprendieron las células pegadas al fondo de los pocillos utilizando tripsina y se recogieron mediante centrifugación. Las células resultantes se suspendieron en HBSS. La suspensión se filtró a través de una membrana con un diámetro de los poros de 41 µm. Se midió la intensidad de la fluorescencia de las células utilizando un citómetro de flujo a las 2 horas, a las 12 horas y a las 24 horas después de la adición de las composiciones de suministro de ácido nucleico.

Como control, se midió la intensidad de la fluorescencia de las células de la misma forma que la descrita anteriormente, utilizando una composición de suministro de ácido nucleico de control obtenida mediante la mezcla de una solución de Lipofectamina 2000™ (fabricada por Invitrogen Corporation), utilizada a menudo como un vector de genes comercialmente asequible, diluida con un medio de OptiMEM a una concentración de 0,1 mg/ml, y una solución de ARNsi en la que el ARNsi se diluyó con un tampón TE a una concentración de 2 µM en una proparte de volumen de 1:1.

La Figura 3 muestra los resultados. Se confirmó a través de los resultados que el ARNsi se mantuvo de forma continuada, manteniendo su concentración de forma constante en las células en todos los casos para las composiciones de suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 1 y 2. Por el contrario, las composiciones de suministro de ácido nucleico de control mostraron no sólo una eficacia inicial baja para el suministro intracelular del ARNsi, sino también una disminución intracelular del ARNsi con el paso del tiempo, dando como resultado cantidades insuficientes de ARNsi en las células a las 12 horas y a las 24 horas después de la adición.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra un ejemplo de la dextrina cíclica altamente ramificada.

La Figura 2 muestra los resultados del Ejemplo de la prueba 2, es decir, los resultados de la evaluación de seguridad celular de las composiciones de suministro de ácido nucleico.

La Figura 3 muestra los resultados de la evaluación de la introducción de ARNsi en las células mediadas por cada composición de suministro de ácido nucleico en el Ejemplo de prueba 3. Las ordenadas en la Figura 3 indican la intensidad media de fluorescencia de una célula.

**Listado de secuencias**

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD  
<110> TAKEUCHI, Hirofumi

<120> COMPLEJO DE ÁCIDO NUCLEICO Y COMPOSICIÓN DE SUMINISTRO DE ÁCIDO NUCLEICO

<130> P08-118

<150> JP2007-291317  
<151> 2007-11-08

<160> 2

<170> Versión de patente 3.1

<210> 1  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cepa sentido o luciferasa de luciérnaga

<220>  
<221> Miscelánea\_característica  
<222> (20)..(21)  
<223> n es dT

<400> 1  
cuuacgcuga guacuucgann

21

<210> 2  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cepa sentido o luciferasa de luciérnaga

<220>

<221> Miscelánea\_característica  
<222> (20)..(21)  
<223> n es dT

5 <400> 2  
ucgaaguacu cagcguaagnn

21

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Complejo de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico y una dextrina cíclica altamente ramificada, en el que la dextrina cíclica altamente ramificada es un glucano con un grado de polimerización de 50 a 5000 que presenta una parte de estructura interna cíclica ramificada formada por uniones de  $\alpha$ -1,4-glucósido y por lo menos una unión  $\alpha$ -1,6-glucósido, y una parte de estructura externa ramificada unida a la parte de estructura interna cíclica ramificada.
- 10 2. Complejo de ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que la cantidad de dextrina cíclica altamente está comprendida entre 1 y 4000 partes en peso por partes en peso del ácido nucleico.
3. Complejo de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ácido nucleico es ARNsi.
- 15 4. Complejo de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un agregado que se obtiene mediante la mezcla de un ácido nucleico con una dextrina cíclica altamente ramificada en una solución acuosa.
5. Composición de suministro de ácido nucleico que comprende el complejo de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo de suministro de ácido nucleico.
- 20 6. Composición de suministro de ácido nucleico según la reivindicación 5, en la que el vehículo de suministro de ácido nucleico es una composición que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un elemento seleccionado de entre colesterol y lípidos catiónicos con un esqueleto de colesterol, y (C) un amino alifático primario.
- 25 7. Composición de suministro de ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que el Componente (A) en el vehículo de suministro de ácido nucleico es una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo acilo presenta entre 4 a 23 átomos de carbono.
- 30 8. Composición de suministro de ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que el Componente (B) en el vehículo de suministro de ácido nucleico es colesterol.
9. Composición de suministro de ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que el Componente (C) en el vehículo de suministro de ácido nucleico es una alquilamina que presenta entre 10 y 20 átomos de carbono.
- 35 10. Composición de suministro de ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que la proparte molar de los Componentes (A): (B): (C) es 5-9: 1-5: 1.
- 40 11. Composición de suministro de ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que el vehículo de suministro de ácido nucleico es una preparación de liposoma en la que la membrana del liposoma está formada por los Componentes (A) a (C).
- 45 12. Composición de suministro de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 5 a 11 de suministro de un ácido nucleico en una célula.
13. Composición farmacéutica que comprende la composición de suministro de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.
14. Utilización de la composición de suministro de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 5 a 11 para producir una composición farmacéutica destinada a suministrar un ácido nucleico en una célula.

Fig. 1

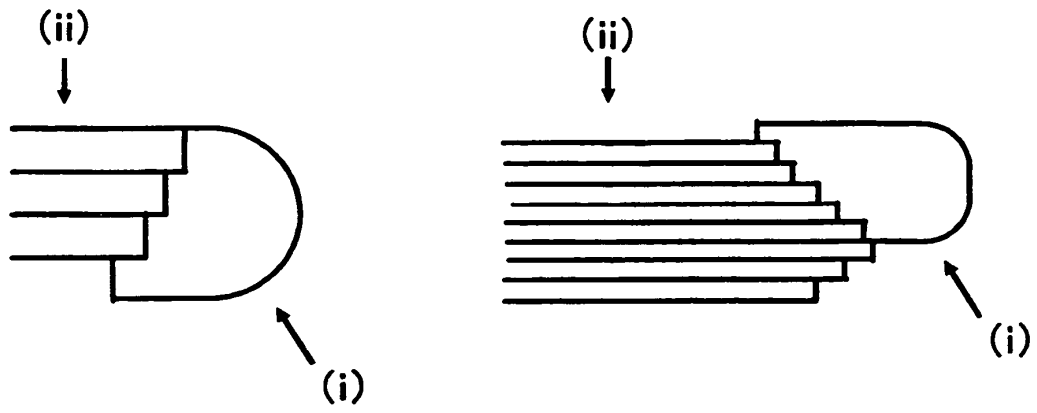


Fig. 2

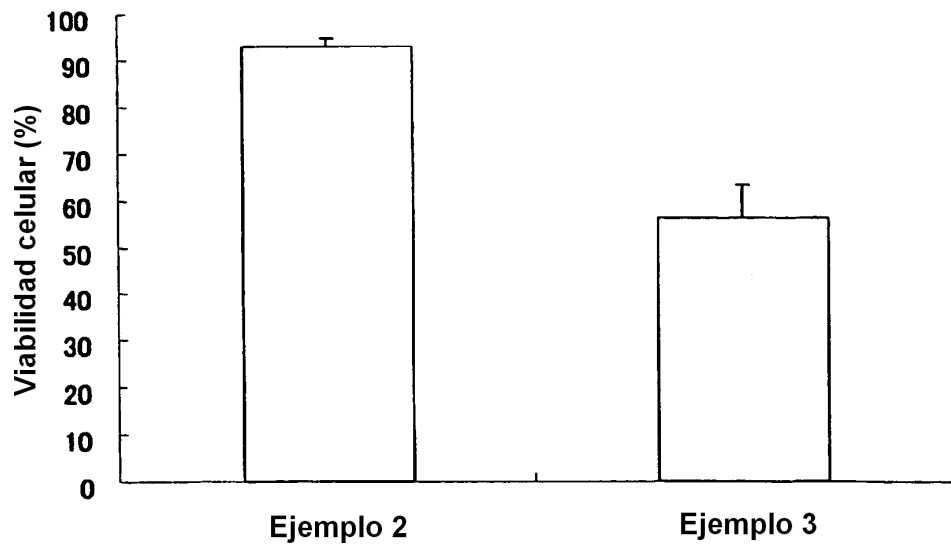




Fig. 3

