

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 549**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05805115 .2**
96 Fecha de presentación: **24.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1842558**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2007**

54 Título: **Composición para inhibir la expresión de un gen diana**

30 Prioridad:
28.01.2005 JP 2005022253

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2012

73 Titular/es:
**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.
1-6-1, OHTEMACHI, CHIYODA-KU
TOKYO 100-8185, JP**

72 Inventor/es:
**YAMAUCHI, Masahiro;
TOTTORI, Tsuneaki;
ISHIHARA, Atsushi;
YAGI, Nobuhiro y
KATO, Yasuki**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 386 549 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

Composición para inhibir la expresión de un gen diana

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a una composición para suprimir la expresión de un gen diana y similares.

5 Técnica anterior

Como procedimiento para suprimir la expresión de un gen diana se conocen, por ejemplo, un procedimiento que usa ARN de interferencia (en lo sucesivo en el presente documento ARNi) y similares, y, específicamente, se ha comunicado un fenómeno en el que cuando se introduce un ARN bicatenario que tiene una secuencia idéntica a la de un gen diana en Nematoda, la expresión del gen diana se suprime específicamente (véase "Nature", Vol. 391, No. 6669, pág. 806-811, 1998). Además, se ha descubierto que, incluso cuando se introduce en *Drosophila* un ARN bicatenario con una longitud de 21 a 23 nucleótidos en lugar de un ARN bicatenario largo, se suprime la expresión de un gen diana. Esto se denomina ARN corto de interferencia (ARNsi) (véase la publicación internacional nº WO 01/75164).

En el caso de las células de mamífero, cuando se introdujo un ARN bicatenario largo se produjo apoptosis como resultado de las funciones del mecanismo de defensa del virus y, por tanto, no se pudo suprimir la expresión de un gen específico. No obstante, se ha descubierto que cuando se usa ARNsi que tiene una longitud de 20 a 29 nucleótidos, dicha reacción no se produce y que se puede suprimir la expresión de un gen específico. Entre otros, el ARNsi que tiene de 21 a 25 nucleótidos tiene un gran efecto de supresión de la expresión ("Nature", Vol. 411, No. 6836, pág. 494-498, 2001; "Nature Reviews Genetics", Vol. 3, No. 10, pág. 737-747, 2002; "Molecular Cell", (USA) Vol. 10, No. 3, pág. 549-561, 2002; "Nature Biotechnology", (USA) Vol. 20, No. 5, pág. 497-500, 2002). Además, también se ha notificado que no solo un ARN bicatenario, sino también un ARN monocatenario que tiene una estructura en horquilla como resultado de hibridación intramolecular, exhibe ARNi, como con ARNsi (véase "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", Vol. 99, No. 9, pág. 6047-6052, 2002).

Con frecuencia el ARNi se ha verificado también en pruebas in vivo. Se ha notificado el efecto del ARNi usando ARNsi con una longitud de 50 pb o menos sobre fetos de animales (véase el documento de Patente 1) y el efecto de lo mismo sobre ratones adultos (véase el documento de Patente 2). Además, cuando el ARNsi se administra por vía intravenosa en un feto de ratón, se ha descubierto el efecto de suprimir la expresión de un gen específico en varios órganos, como el riñón, el bazo, el pulmón, el páncreas y el hígado (véase el documento no de patente 1). Adicionalmente se ha informado que cuando el ARNsi se administra directamente en células cerebrales, también se suprime la expresión de un gen específico (véase el documento no de patente 2).

En el documento patente 1 y en los documentos no de patente 1 y 2, la administración in vivo de ARNsi se lleva a cabo mediante administración local o administración sistémica usando un procedimiento de infusión de una gran cantidad de una solución de ARNsi de una vez, lo que se denomina procedimiento hidrodinámico. El ARNsi es inestable en la sangre y dicho procedimiento de administración se selecciona con el fin de evitar su degradación en la sangre. No obstante, mediante la administración local, el ARNsi se puede liberar solo en las cercanías del área administrada, por lo que la eficiencia de la supresión de la expresión es, por lo general, extremadamente baja. El documento no de patente 3 divulga sistemas con base de liposomas/lípidos catiónicos formulados en diferentes proporciones molares del lípido poliamina con base de colesterol catiónico N¹-colesteriloxicarbonil-3,7-diazanonano-1,9-diamina y el lípido colaborador neutro dioleoil-L- α -fosfatidiletanolamina. Los resultados del estudio muestran sistemas con base de liposomas/lípidos catiónicos disponibles investigados median en una regulación por disminución inespecífica significativa del contenido proteico celular total a dosis óptimas para un silenciamiento e inactivación máximos de genes específicos. Por otro lado, en el procedimiento hidrodinámico, el tejido diana está generalmente limitado al hígado.

Es decir, con e fin de suprimir la expresión de un gen diana, se ha exigido el desarrollo de un procedimiento de liberar de forma eficiente un ARN capaz de suprimir la expresión del gen diana a un tejido diana mediante la administración sistémica.

Por otro lado, como medio de liberar un ácido nucleico en una célula se conoce un procedimiento de uso de liposomas catiónicos o polímeros catiónicos. No obstante, mediante el procedimiento, antes de llevar a cabo la administración intravenosa de liposomas catiónicos o polímeros catiónicos que comprenden un ácido nucleico, el ácido nucleico se elimina rápidamente de la sangre y cuando un tejido diana no es el hígado o los pulmones, por ejemplo cuando es un lugar donde hay un tumor o similar, el ácido nucleico no se puede liberar en el tejido diana y, por tanto, todavía no se ha hecho posible la expresión de una acción suficiente. De acuerdo con esto, se ha comunicado un liposoma de encapsulación de ácido nucleico (liposoma que encapsula un ácido nucleico en su interior) con lo que se solucionó el problema de la eliminación rápida de un ácido nucleico de la sangre (véanse los documentos de patente 3 a 6 y el documento no de patente 4). En el documento de patente 3, como procedimiento de producir liposomas que comprende un ácido nucleico o similar, se ha comunicado, por ejemplo, un procedimiento de producir un liposoma de encapsulación de ODN mediante la disolución de un lípido catiónico en cloroformo con

antelación, de añadir al mismo una solución acuosa de oligodesoxinucleótido (ODN) y metanol y mezclar y centrifugar la mezcla transfiriendo de este modo un complejo del lípido catiónico y ODN a una capa de cloroformo y, después, extraer la capa de cloroformo, añadir un polietilfosfolípido glicolado, un lípido neutro y agua a la capa de cloroformo para formar una emulsión de agua en aceite (a/a) y tratar la emulsión mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa. En el documento de patente 4 y el documento no de patente 4, se ha comunicado un procedimiento de producir un liposoma de encapsulación de ODN mediante la disolución de ODN en una solución acuosa de ácido cítrico a pH 3,8, la adición a la solución de un lípido (en etanol), la reducción de la concentración de etanol al 20 % en v/v para preparar un liposoma de encapsulación de ODN, realizando filtración para dimensionado, eliminando el exceso de etanol mediante diálisis y, después, realizando también la diálisis de la muestra a pH 7,5 para extraer el ODN adherido a la superficie del liposoma. En cada procedimiento se produce un liposoma de encapsulación de un ingrediente activo, tal como un ácido nucleico. El documento de patente 5 divulga un complejo de liposoma catiónico con un ácido oligonucleico, en el que el liposoma comprende 2-O-(2-dietilaminoetil)carbamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y un fosfolípido como ingredientes principales. El liposoma divulgado en el mismo se prepara mezclando el derivado de glicerol con el fosfolípidos y, después, dispersando la mezcla en una solución acuosa usando, opcionalmente, una máquina de dispersión emulsionante.

Por otro lado, en el documento de patente 6 se ha comunicado que el liposoma que encapsula un ingrediente activo, como un ácido nucleico, se produce mediante un procedimiento de recubrimiento de partículas finas con una membrana lipídica en un líquido. En el procedimiento, las partículas finas se recubren con una membrana lipídica reduciendo la proporción de un disolvente orgánico polar en una solución acuosa que comprende el disolvente orgánico polar en el que las partículas finas se dispersan y se disuelve un lípido. El recubrimiento se lleva a cabo en el líquido y, por ejemplo, las partículas finas recubiertas con una membrana lipídica (partículas finas recubiertas) que tienen un tamaño adecuado para las partículas finas para inyección intravenosa y similares se producen de un modo muy eficiente. Además, como ejemplo de las partículas finas, por ejemplo un complejo que comprende un fármaco hidrosoluble y un lípido catiónico y formado mediante una interacción electrostática se indica en el documento de patente 6. Se ha comunicado que el diámetro de partícula de las partículas finas recubiertas obtenidas mediante recubrimiento de las partículas del complejo varía dependiendo de las partículas del complejo que se van a recubrir, no obstante, las partículas finas recubiertas obtenidas mediante recubrimiento del complejo ODN-lípido tienen un diámetro de partícula pequeño y se pueden usar como inyección, y las partículas del complejo recubiertas muestran una elevada retención en sangre y se acumulan en un tejido tumoral cuando se administran por vía intravenosa.

30 Documento de patente 1: Publicación internacional N° WO 02/132788

Documento de patente 2: Publicación internacional N° WO 03/10180

Documento de patente 3: Traducción japonesa publicada de una solicitud internacional de PCT N° 2002-508765

35 Documento de patente 4: Traducción japonesa publicada de una solicitud internacional de PCT N° 2002-501511

Documento de patente 5: Publicación internacional N° WO 2004/105774 A1

Documento de patente 6: Publicación internacional N° WO 02/28367

Documento 1 no de patente: "Nature Genetics", Vol. 32, N° 1, pág. 107-108, 2002

Documento 2 no de patente: "Nature Biotechnology", Vol. 20, N° 10, pág. 1006-1010, 2002

40 Documento 3 no de patente: "Biochemistry", Vol. 43, N° 42, pág. 13348-13356, 2004

Documento 4 no de patente: "Biochimica et Biophysica Acta", Vol. 1510, pág. 152-166, 2001

Divulgación de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

45 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para suprimir la expresión de un gen diana y similares.

La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere además a los siguientes (1) a (37).

50 (1) Una composición que comprende un liposoma con ARN encapsulado, en el que el ARN comprende una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de un ARNm del gen diana y una secuencia complementaria a la secuencia, y el liposoma es capaz de alcanzar un tejido o un órgano que incluye un sitio de expresión del gen diana.

(2) La composición de acuerdo con el punto (1) anterior, en la que el liposoma es un liposoma que tiene un tamaño que permite la administración intravenosa.

- (3) La composición de acuerdo con el punto (1) o (2) anterior, en la que el ARN es un ARN que tiene una acción de suprimir la expresión del gen diana usando ARN de interferencia (ARNi).
- (4) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, en la que el gen diana es un gen asociado con un tumor o una inflamación.
- 5 (5) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores, en la que el gen diana es un gen asociado con la angiogénesis.
- (6) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, en la que el ARNm es ARNm de KLF5.
- 10 (7) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, en la que el ARNm es ARNm de KLF5 de ser humano o de ratón.
- (8) La composición de acuerdo con los puntos (6) o (7) anteriores, en la que el ARN es un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de ARNm de KLF5 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que los 1 a 6 nucleótidos, que son iguales o diferentes, se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras del mismo modo o de un modo diferente.
- 15 (9) La composición de acuerdo con los puntos (6) o (7) anteriores, en la que el ARN es un ARN que tiene una estructura en horquilla y en la que un ARN que tiene una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de ARNm de KLF5 está unido a un ARN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia mediante un oligonucleótido espaciador, y de 1 a 6 nucleótidos, que son iguales o diferentes, se añaden al extremo 3' del mismo.
- 20 (10) La composición de acuerdo con los puntos (6) o (7) anteriores, en la que el ARN es un ARN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):
- (a) un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia mostrada en una cualquiera de los números de ID de SEC: 2 a 16 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que de 2 a 4 miembros, que son iguales o diferentes, seleccionada de ácidos uridílicos y ácidos desoxitimidílicos, se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras de un modo igual o diferente:
- 25 (b) un ARN que tiene una estructura en horquilla y en el que un ARN que tiene una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de ID de SEC: 2 a 16 está ligado a un ARN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia a través de un oligonucleótido espaciador que tiene 2 ácidos uridílicos o ácidos desoxitimidílicos en el extremo 5' de la misma y de 2 a 4 miembros, que son iguales o diferentes, seleccionados de ácidos uridílicos y ácidos desoxitimidílicos se añaden al extremo 3' de la misma; y
- 30 (c) un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de ID de SEC: 2 a 11 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que 2 ácidos uridílicos se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras.
- 35 (11) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, en la que el ARNm es ARNm de bcl2.
- (12) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (11) anteriores, en la que el liposoma con ARN encapsulado comprende partículas del complejo que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN, y una membrana lipídica para recubrir las partículas del complejo, en las que los componentes constituyentes de la membrana lipídica se pueden disolver en un disolvente orgánico polar y en las que el disolvente orgánico polar puede estar contenido en un líquido a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas del complejo son dispersables.
- 40 (13) La composición de acuerdo con el punto (12) anterior, en la que el disolvente orgánico polar es un alcohol.
- 45 (14) La composición de acuerdo con el punto (12) anterior, en la que el disolvente orgánico polar es etanol.
- (15) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (12) a (14) anteriores, en la que la partícula principal es una partícula principal que comprende un lípido catiónico y la membrana lipídica contiene, como componentes constituyentes, un lípido neutro y un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático, de una sustancia hidrosoluble.
- 50 (16) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (11) anteriores, en la que el liposoma con ARN encapsulado es un liposoma que comprende partículas del complejo que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal que comprende un lípido catiónico y el ARN, y una

membrana lipídica para recubrir las partículas del complejo y la membrana lipídica contiene, como componentes constituyentes, un lípido neutro y un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático, de una sustancia hidrosoluble.

5 (17) La composición de acuerdo con los puntos (15) o (17) anteriores, en la que el lípido catiónico es uno o más compuestos seleccionados de cloruro de N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N,N-trimetilamonio, N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N-dimetilamina, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio, bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-N,Ndimetil-N-hidroxiethylamonio y 3β -[N-(N'N'-dimetilaminoetil)carbamoil] colesterol.

10 (18) La composición de acuerdo con los puntos (15) a (16) anteriores, en la que el derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble es polietilenglicolfosfatidiletanolamina.

(19) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (15) a (18) anteriores, en la que el lípido neutro es fosfatidilcolina de yema de huevo.

15 (20) Un liposoma con ARN encapsulado que comprende partículas del complejo que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal y un ARN que comprende una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de un ARNm del gen diana y una secuencia complementaria a la secuencia, y una membrana lipídica para recubrir las partículas del complejo, en las que los componentes constituyentes de la membrana lipídica se pueden disolver en un disolvente orgánico polar y en las que el disolvente orgánico polar puede estar contenido en un líquido a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas del complejo son dispersables.

20 (21) El liposoma de acuerdo con el punto (20) anterior, en el que el disolvente orgánico polar es un alcohol.

(22) El liposoma de acuerdo con el punto (20) anterior, en el que el disolvente orgánico polar es etanol.

25 (23) El liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (22) anteriores, en el que la partícula principal es una partícula principal que comprende un lípido catiónico y la membrana lipídica contiene, como componentes constituyentes, un lípido neutro y un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático, de una sustancia hidrosoluble.

30 (24) Un liposoma con ARN encapsulado que comprende partículas del complejo que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal que comprende un lípido catiónico y un ARN que comprende una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos o un ARNm del gen diana y una secuencia complementaria a la secuencia, y una membrana lipídica para recubrir las partículas del complejo, en las que la membrana lipídica contiene, como componentes constituyentes, un lípido neutro y un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático, de una sustancia hidrosoluble.

35 (25) El liposoma de acuerdo con los puntos (23) o (24) anteriores, en el que el lípido catiónico es uno o más compuestos seleccionados de cloruro de N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N,N-trimetilamonio, N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N-dimetilamina, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio, bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-N,Ndimetil-N-hidroxiethylamonio y 3β -[N-(N'N'-dimetilaminoetil)carbamoil] colesterol.

(26) El liposoma de acuerdo con los puntos (20) a (25) anteriores, en el que el derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble es polietilenglicolfosfatidiletanolamina.

40 (27) El liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (26) anteriores, en el que el lípido neutro es fosfatidilcolina de yema de huevo.

(28) El liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (27) anteriores, en el que el ARN es un ARN que tiene una acción de suprimir la expresión del gen diana usando ARN de interferencia (ARNi).

(29) El liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (28) anteriores, en el que el gen diana es un gen asociado con un tumor o una inflamación.

45 (30) El liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (28) anteriores, en el que el gen diana es un gen asociado con la angiogénesis.

(31) El liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (28) anteriores, en el que el ARNm es ARNm de KLF5.

50 (32) El liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (28) anteriores, en el que el ARNm es ARNm de KLF5 de ser humano o de ratón.

(33) El liposoma de acuerdo con los puntos (31) o (32) anteriores, en el que el ARN es un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de ARNm de KLF5 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que los 1 a 6 nucleótidos, que son

iguales o diferentes, se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras del mismo modo o de un modo diferente.

5 (34) El liposoma de acuerdo con los puntos (31) o (32) anteriores, en el que el ARN es un ARN que tiene una estructura en horquilla y en la que un ARN que tiene una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de ARNm de KLF5 está unido a un ARN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia mediante un oligonucleótido espaciador, y de 1 a 6 nucleótidos, que son iguales o diferentes, se añaden al extremo 3' del mismo.

(35) El liposoma de acuerdo con los puntos (31) o (32) anteriores, en el que el ARN es un ARN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):

10 (a) un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia mostrada en una cualquiera de los números de ID de SEC: 2 a 16 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que de 2 a 4 miembros, que son iguales o diferentes, seleccionada de ácidos uridílicos y ácidos desoxitimidílicos, se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras de un modo igual o diferente:

15 (b) un ARN que tiene una estructura en horquilla y en el que un ARN que tiene una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de ID de SEC: 2 a 16 está ligado a un ARN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia a través de un oligonucleótido espaciador que tiene 2 ácidos uridílicos o ácidos desoxitimidílicos en el extremo 5' de la misma y de 2 a 4 miembros, que son iguales o diferentes, seleccionados de ácidos uridílicos y ácidos desoxitimidílicos se añaden al extremo 3' de la misma; y

20 (c) un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de ID de SEC: 2 a 11 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que 2 ácidos uridílicos se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras.

(36) El liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (28) anteriores, en el que el ARNm es ARNm de bcl2.

25 (37) Una composición que comprende el liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (20) a (36) anteriores.

Efecto de la invención

Administrando la composición de la presente invención que comprende un liposoma que encapsula un ARN que comprende una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de un ARNm del gen diana y una secuencia complementaria a la secuencia de un mamífero o similar, la expresión del gen diana se puede suprimir.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el crecimiento en el tiempo de un tumor transplantado en un ratón. El eje horizontal representa el tiempo (días) y el eje longitudinal representa el volumen del tumor (mm³). ● representa un grupo sin tratamiento y ○ representa un grupo administrado con una preparación obtenida en el ejemplo 1.

35 La Fig. 2 muestra la curva del crecimiento del tumor cuando una preparación que comprende 50 μg de ARNsi (Ejemplo 1: ○ en la figura, Ejemplo Comparativo 1: ● en la figura), una solución de ARNsi que comprende 50 μg de ARNsi (Ejemplo Comparativo 2: □ en la figura, Ejemplo Comparativo 3: ■ en la figura), o una solución salina fisiológica (Δ en la figura) se administró a un ratón portador del tumor a través de la vena de la cola.

40 La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos contando las estructuras positivas a CD31 observadas en una sección de tejido tumoral. Solución salina, Sc-solución salina, sc-WL, KLF5-solución salina y KLF5-WL muestran el número de estructuras positivas a CD31 en tumores de ratones a los que se administró una solución salina fisiológica, el Ejemplo Comparativo 3, el Ejemplo Comparativo 1, el Ejemplo Comparativo 2 y el Ejemplo 1, respectivamente.

La Fig. 4 muestra los resultados de un análisis de PCR cuantitativo del ARNm extraído de los tumores. Solución salina, Sc-solución salina, sc-WL, KLF5-solución salina y KLF5-WL representan una solución salina fisiológica, el Ejemplo Comparativo 3, el Ejemplo Comparativo 1, el Ejemplo Comparativo 2 y el Ejemplo 1, respectivamente.

45 La Fig. 5 muestra los resultados de la determinación cuantitativa de KLF5 extraído de los tumores. Solución salina, Sc-solución salina, sc-WL, KLF5-solución salina y KLF5-WL representan una solución salina fisiológica, el Ejemplo Comparativo 3, el Ejemplo Comparativo 1, el Ejemplo Comparativo 2 y el Ejemplo 1, respectivamente.

50 La Fig. 6 muestra la curva del crecimiento del tumor cuando se administró ARNsi en las proximidades del tumor. ● representa la administración de una solución fisiológica salina, Δ representa la administración de una solución fisiológica salina, □ representa la administración de ARNsi-revuelto y ○ representa la administración de KLF5-ARNsi.

La Fig. 7 muestra los cambios en el crecimiento en el tiempo del tumor DU145 transplantado en un ratón. El eje horizontal representa el tiempo (días) y el eje longitudinal representa el volumen del tumor (mm³). ● representa un

grupo sin tratamiento y ○ representa un grupo administrado con una preparación obtenida en el ejemplo 3.

La Fig. 8 muestra los cambios en el crecimiento en el tiempo del tumor PC-3 transplantado en un ratón. El eje horizontal representa el tiempo (días) y el eje longitudinal representa el volumen del tumor (mm³). ● representa un grupo sin tratamiento y ○, □ y ■ representan grupos administrados con preparaciones obtenidas en el Ejemplo 3, el Ejemplo Comparativo 4 y el Ejemplo Comparativo 5 (desnudo), respectivamente.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

El gen diana en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que sea un gen que produzca y exprese ARNm en mamíferos, y ejemplos de los mismos incluyen los genes del factor de tipo Kruppel (en lo sucesivo en el presente documento abreviado como KLF), y ejemplos preferidos de los mismos incluyen el gen KLF5. La familia KLF es una familia de factores transcripcionales, que se caracteriza porque tiene un motivo de dedo de cinc en el extremo C del mismo y ejemplos de los mismos que se conocen incluyen KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF6, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF 16 y similares. Se ha comunicado que, en mamíferos, la familia de KLF desempeña un papel importante en la diferenciación de varios tipos de tejidos o células, tales como eritrocitos, células endoteliales vasculares, músculo liso, piel y linfocitos, y también en la formación de afecciones patológicas de varios tipos de enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, cirrosis, enfermedades renales y enfermedades mediadas por el sistema inmunitario (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, N° 37, pág. 34355-34358, 2001; Genome Biology, Vol. 4, No. 2, pág. 206, 2003).

Entre los miembros de la familia KLF, el KLF5 también se denomina BTEB2 (proteína 2 de unión al elemento transcripcional básico) o IKLF (factor de tipo Kruppel enriquecido intestinal). La expresión de KLF5 en músculo liso vascular se controla en la etapa de desarrollo del mismo. KLF5 se expresa considerablemente en el músculo liso vascular de un feto; mientras que su expresión no se encuentra en el músculo liso vascular de un adulto sano. Además, en el caso del músculo liso de la íntima de un vaso sanguíneo regenerado tras la degradación mediante un catéter con globo, el KLF5 tiene un nivel de expresión muy elevado. Asimismo, en el músculo liso de las lesiones producidas por arteriosclerosis o restenosis, se expresa KLF5 (Circulation, Vol. 102, N° 20, pág. 2528-2534, 2000). Además, ejemplos del gen diana incluyen los genes de LLC/LINFOMA de células B (en lo sucesivo abreviado bcl) y ejemplos preferidos de los mismos incluyen el gen bcl2.

Ejemplos del ARN en la presente invención incluyen un ARN que comprende una secuencia que consiste en de 15 a 30, preferentemente de 17 a 25 y, más preferentemente, de 19 a 23 nucleótidos contiguos del ARNm del gen diana mencionado anteriormente, y una secuencia complementaria a la secuencia, y derivados en los que está incluido un átomo de oxígeno o similar contenido en un resto fosfato, un resto éster o similar en la estructura de ácido nucleico se ha sustituido con otro átomo tal como un átomo de azufre. Además, ejemplos del ARN en la presente invención incluyen un ARN que tiene una acción de supresión de la expresión del gen diana que usa ARN de interferencia (ARNi). En el presente documento, tomando un ARN capaz de suprimir la expresión del gen KLF5 como ejemplo, se explicará el ARN capaz de suprimir la expresión del gen diana usando ARN de interferencia (ARNi). Otros genes también tienen una estructura similar y se pueden obtener mediante un procedimiento similar.

El ARN capaz de suprimir la expresión del gen KLF5 contiene una secuencia que consiste en de 15 a 30, preferentemente de 17 a 25 y, más preferentemente, de 19 a 23 nucleótidos contiguos del ARNm de KLF5 (en lo sucesivo denominado secuencia X) y una secuencia complementaria a la secuencia (en lo sucesivo denominado secuencia complementaria X'). Ejemplos de tal ARN incluyen: (A) un ARN que es un ARN bicatenario que tiene una hebra de la secuencia X (hebra sentido) y una hebra de la secuencia complementaria X' (hebra antisentido), en la que de 1 a 6, y, preferentemente, de 2 a 4 nucleótidos se añaden en el extremo 3' de cada una de las hebras del mismo modo o de un modo diferente (en lo sucesivo en el presente documento, un ARN que tiene dicha estructura se denomina ARNs) y que es capaz de suprimir la expresión del gen KLF5; y (B) un ARN, que tiene una estructura en horquilla y en el que un ARN que tiene la secuencia X está ligado a un ARN que tiene la secuencia complementaria X' a través de un oligonucleótido espaciador, y de 1 a 6, y, preferentemente, de 2 a 4 nucleótidos se añaden en el extremo 3' del mismo (en lo sucesivo en el presente documento, dicho ARN se denomina ARNsh) y similares. Las bases de los nucleótidos que se van a añadir a dicho ARN pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de forma independiente de guanina, adenina, citosina, timina y uracilo, y se puede usar ARN o ADN como el nucleótido, no obstante se prefieren un miembro o dos miembros seleccionados de ácido uridílico (U) y ácido desoxitimidílico (dT). Como el oligonucleótido espaciador se prefiere un ARN que consiste en de 6 a 12 nucleótidos. Como secuencia en el extremo 5' se prefieren dos nucleótidos UU. Ejemplos del oligonucleótido espaciador incluyen un ARN que consiste en la secuencia UUCAAGAGA. Cualquiera de las dos porciones de ARN que están unidas a través del oligonucleótido espaciador puede ser adecuado como el ARN en el lateral del extremo 5'. La secuencia X puede ser cualquier secuencia, siempre que sea una secuencia que consista en de 15 a 30, preferentemente de 17 a 25 y, más preferentemente, de 19 a 23 nucleótidos contiguos del ARNm de KLF5, aunque la más preferida es una secuencia que consiste en 19 nucleótidos diseñados mediante el procedimiento descrito más adelante (I).

Con respecto al ARN que tiene las estructuras anteriores, la fuerza de la supresión de la expresión del gen KLF5 varía en función de la secuencia X y, a veces, la supresión es débil. Por tanto, una serie de secuencias se diseñan

como la secuencia X (I), los ARN se preparan en base a las respectivas secuencias X (II), los ARN se introducen en las células en las que se expresa el gen KLF5 y la expresión del gen KLF5 se mide (III) y se selecciona un ARN que suprime la expresión del gen KLF5 con mayor fuerza, de modo que se puede obtener el ARN de la presente divulgación.

5 (I) Diseño de la secuencia X

Una porción de la secuencia que consiste en 21 nucleótidos que comienzan con AA se extrae de la secuencia de nucleótidos de ADNc de KLF5 de un animal en el que se va a suprimir la expresión génica. Se calcula el contenido en GC de la secuencia extraída y se seleccionan varias secuencias que tienen un contenido en GC entre 20 % y 80 %, preferentemente entre 30 % y 70 %, y, más preferentemente, entre 40 % y 60 %.

- 10 Dicha secuencia es, preferentemente, una secuencia en una región de codificación que se localiza 75 nucleótidos o más cadena abajo de un codón de iniciación. La información sobre la secuencia de nucleótidos del ADNc de KLF5 se puede obtener de bases de datos de secuencias nucleotídicas tales como GenBank. Por ejemplo, con respecto a la información sobre la secuencia, la secuencia del ADNc de KLF5 se puede obtener en GenBank con el N° de Acceso NM_009769 (SEC ID) N° 41) y la secuencia, la secuencia del ADNc de KLF5 humano se puede obtener en GenBank con el N° de Acceso AF287272 (SEC ID) N° 42). AA en el extremo 5' se elimina de la secuencia seleccionada y, después, se sustituye la T por U en la secuencia, La secuencia obtenida de este modo consistente en 19 nucleótidos se define como secuencia X.

(II) Preparación de un ARN

- 20 El ARN (p. ej., ARNsi, ARNsh) se puede preparar del siguiente modo en base a la secuencia X seleccionada en (I) citado anteriormente. Más adelante se describirá un caso en el que 2 oligonucleótidos en total, uno o dos U o dT, se usan como los oligonucleótidos que se van a añadir. No obstante, también se puede preparar ARN en el caso en el que se usen otros nucleótidos.

(i) Caso de ARNsi

- 25 Se preparan un ARN que tiene una secuencia obtenida añadiendo 2 oligonucleótidos en total en uno o los dos U o dT en el extremo 3' de la secuencia X y un ARN que tiene una secuencia obtenida añadiendo 2 oligonucleótidos en total en uno o los dos U o dT en el extremo 3' de la secuencia complementaria X'. Dichas dos porciones de ARN se pueden preparar mediante síntesis química o transcripción in vitro. La síntesis química se puede realizar usando un sintetizador de ADN. Por el contrario, también es posible pedir a algunos fabricantes, tales como Ambion, Japan Bio services Co., Ltd. o QIAGEN, que lleven a cabo dicha síntesis química. Las dos porciones de ARN sintetizadas químicamente de este modo que comprenden secuencias complementarias entre sí se hibridan, de modo que se prepara un ARN bicatenario que consiste en una hebra de una secuencia X y una hebra de una secuencia complementaria X', en la que uno o dos miembros, que son iguales o diferentes, seleccionados de U y dT se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras. La hibridación se puede llevar a cabo calentando dos porciones de ARN en un tampón adecuado a una temperatura entre 90 °C y 95 °C durante de 1 a 5 minutos y, después, enfriarlas hasta la temperatura ambiente durante de 45 a 60 minutos.

- 40 El ARN se puede preparar mediante transcripción in vitro del siguiente modo. En primer lugar, se preparan las siguientes porciones de ADN: Un ADN que tiene la secuencia promotora de la ARN polimerasa de T7 (cebador de T7); un ADN que tiene una secuencia obtenida sustituyendo U por T en la secuencia complementaria X', añadiendo AA en el extremo 5' del mismo y añadiendo después en el extremo 3' del mismo una secuencia complementaria a 8 nucleótidos del extremo 3' del cebador de T7 (ADN1); y un ADN que tiene una secuencia obtenida sustituyendo U por T en la secuencia X, añadiendo AA en el extremo 5' del mismo y añadiendo después en el extremo 3' del mismo una secuencia complementaria a 8 nucleótidos del extremo 3' del cebador de T7 (ADN2).

- 45 El cebador de T7 y el ADN1 se hibridan y, después, se convierten en ADN bicatenario mediante una reacción de la ADN polimerasa. Usando el ADN bicatenario obtenido como molde se lleva a cabo una reacción de transcripción in Vitro usando la ARN polimerasa de T7, para sintetizar un ARN que tiene una secuencia obtenida añadiendo UU al extremo 3' de la secuencia X y añadiendo una secuencia líder al extremo 5' del mismo. Asimismo, se lleva a cabo la misma reacción que se ha mencionado anteriormente usando el cebador de T7 y el ADN2, para sintetizar un ARN que tiene una secuencia obtenida añadiendo UU al extremo 3' de la secuencia complementaria X' y añadiendo una secuencia líder al extremo 5' del mismo.

- 50 Las dos soluciones de reacción se mezclan y dicha reacción de transcripción in vitro se continúa adicionalmente de modo que las dos porciones de ARN que tienen secuencias complementarias entre sí hibridan. Después, el ADN bicatenario usado como molde y la secuencia líder en el extremo 5' de cada hebra de ARN se digieren con desoxirribonucleasa y ribonucleasa específica de ARN monocatenario y después se elimina. La porción UU en el extremo 3' de cada hebra de ARN permanece sin digerir.

- 55 La reacción mencionada anteriormente se puede llevar a cabo usando un kit tal como el kit Silencer · siRNA Construction Kit (fabricado por Ambion). El ADN que se va a hibridar con el cebador de T7 se puede sintetizar químicamente usando un sintetizador de ADN. Además, también es posible pedir a algunos fabricantes, tales como

Ambion, Japan Bio services Co., Ltd. Hokkaido System Science Co., Ltd., o QLAGEN, que lleven a cabo dicha síntesis química.

(ii) Caso de ARNsh

5 Un ARN que forma una estructura en horquilla obtenida ligando un ARN que tiene la secuencia X con un ARN que tiene la secuencia complementaria X' a través oligonucleótido espaciador y, después, añadiendo de 1 a 6, y preferentemente de 2 a 4 nucleótidos, al extremo 3' del mismo; se puede preparar mediante síntesis química usando un sintetizador de ADN.

(III) Supresión de la expresión del gen KLF5

10 El ARNsi o ARNsh preparado en (II) anterior se transfecta en una línea celular que expresa el gen KLF5. Como línea celular, se usan las células de la misma especie animal que el ADNc de KLF5 usado como base del diseño de la secuencia X descrita en (I) anterior. Ejemplos de una línea celular que expresa el gen KLF5 pueden incluir líneas celulares derivadas de músculo liso, fibroblastos o células endoteliales vasculares, tales como la línea celular de fibroblastos de feto de ratón C3H/10T1/2 (Nº ATCC CCL-226) o células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano. La transfección del ARN se puede llevar a cabo usando reactivos para transfección en células animales, 15 tales como el reactivo de transfección Polyfect (fabricado por QIAGEN), reactivo de transfección TransMessenger, reactivo Oligofectamina (fabricado por Invitrogen), o Lipofectamina 2000 (fabricado por Invitrogen). Estos reactivos se mezclan con el ARN para formar un complejo y, después, el complejo se añade a las células.

20 La expresión del gen KLF5 en las células, que se transfectaron con el ARN se puede analizar mediante PCR-RT. El ARN total se prepara a partir de las células transfectadas con el ARN y de células que no se transfectaron con el ARN. Después, se sintetiza el ADNc a partir del ARN. Usando el ADNc sintetizado como molde, se lleva a cabo una PCR con cebadores específicos del gen KLF5. La cantidad de un producto amplificado derivado del ADNc de KLF5 se cuantifica mediante electroforesis en gel de agarosa, midiendo de este modo el nivel de expresión del gen KLF5. Un ARN que se transfectó en células en las que el nivel de expresión del gen KLF5 es menor que el nivel de expresión del gen KLF5 en las células no transfectadas con el ARN, se selecciona como un ARN capaz 25 de suprimir la expresión del gen KLF5.

30 Un ejemplo del ARN seleccionado de este modo capaz de suprimir la expresión del gen KLF5 es un ARN bicatenario que consiste en una hebra de una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de SEC ID: 2 a 11 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, en la que dos ácidos uridílicos se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras. Esta hebra de ARN bicatenario que consiste en una hebra de una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de SEC ID: 2 a 11 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, en la que dos ácidos uridílicos se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras se diseña en base a la secuencia de ADNc de ratón y suprime la expresión del gen KLF5 de ratón. Entre estas secuencias, las secuencias mostradas en los números de SEC ID: 4, 8 y 10 son compartidas por el ARNm de KLF5 de ratón y el ARNm de KLF5 humano. Por tanto, un ARN bicatenario que consiste en una hebra de una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números 35 de SEC ID: 4, 8 y 10, y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, en la que dos ácidos uridílicos se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras es capaz de suprimir no solo el gen de KLF5 de ratón sino también el gen de KLF5 de ser humano.

40 El ADNc de KLF5 de una especie animal determinada "A" usada como base para el diseño de la secuencia X descrita en (I) anteriormente se alinea con el ADNc de KLF5 de una especie animal diferente "B" en base a la homología de secuencia para obtener la secuencia Y de la especie animal "B" que corresponde a la secuencia X seleccionada en la especie animal "A". Cuando un ARN capaz de suprimir la expresión del gen KLF5 de la especie animal "A" se obtiene mediante el procedimiento mencionado anteriormente, un ARN obtenido sustituyendo la región de la secuencia X y la región de la secuencia complementaria X' con la secuencia Y y la secuencia complementaria Y' en el ARN, respectivamente, se considera capaz de suprimir el gen KLF5 de la especie animal "B".

45 Por ejemplo, un ARN bicatenario que consiste en una hebra de una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de SEC ID: 2, 3, 7, 9 y 11, en base a la secuencia del ADNc de KLF5 de ratón y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia anterior, en la que dos ácidos uridílicos se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras es capaz de suprimir la expresión del gen KLF5 de ratón. De acuerdo con esto, un ARN bicatenario que consiste en una hebra de una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de SEC ID: 12 50 a 16, que son las secuencias correspondientes del ADNc de KLF5 de ser humano y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia anterior, en la que dos ácidos uridílicos se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras se considera capaz de suprimir la expresión del gen KLF5 de ser humano.

55 El liposoma en la composición de la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento denominado liposoma A) no está particularmente limitado siempre que sea un liposoma que encapsula un ARN que comprende una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de un ARNm del gen diana y una secuencia complementaria a la secuencia, y es capaz de alcanzar un tejido o un órgano que incluye un sitio de expresión del gen diana. Ejemplos de los mismos incluyen el liposoma que comprende partículas complejas que comprende como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN, y una membrana lipídica para encapsular las partículas complejas y similares, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen el liposoma que comprende

partículas complejas que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN, y una membrana lipídica para recubrir las partículas complejas, en las que los componentes constituyentes de la membrana lipídica se pueden disolver en un disolvente orgánico polar y en las que el disolvente orgánico polar puede estar contenido en un líquido a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas complejas son dispersables. Además, ejemplos del liposoma A también incluyen un liposoma que comprende partículas complejas que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal que comprende, preferentemente, un lípido catiónico y el ARN mencionado anteriormente, y una membrana lipídica para recubrir las partículas complejas, y en el que la membrana lipídica contiene, como componentes constituyentes, un lípido neutro y un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático, de una sustancia hidrosoluble, en el que el derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en un lípido de polietileno glicolado, un éster de ácido graso de polietilenglicolsorbitano, un éster de ácido graso de polietilenglicol, un lípido poliglicerolado y un éster de ácido graso de poliglicerol, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen un liposoma que comprende partículas complejas que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN y una membrana lipídica para recubrir las partículas complejas, y en el que la membrana lipídica contiene, como componentes constituyentes, un lípido neutro y un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático, de una sustancia hidrosoluble, en el que el derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble se selecciona del grupo consistente en un lípido de polietileno glicolado, un éster de ácido graso de polietilenglicolsorbitano, un éster de ácido graso de polietilenglicol, un lípido poliglicerolado y un éster de ácido graso de poliglicerol, en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica se pueden disolver en un disolvente orgánico polar y en el que el disolvente orgánico polar puede estar contenido en un líquido a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas complejas son dispersables.

La partícula principal de la presente invención es una partícula fina que comprende como componente constituyente, por ejemplo, un ensamblaje lipídico, un liposoma, una partícula en emulsión, un polímero, un coloide metálico, una preparación de partícula fina o similares. Ejemplos preferidos de los mismos incluyen una partícula fina que comprende un liposoma como componente constituyente. La partícula principal la presente invención puede contener, como componente constituyente, un complejo obtenido combinando dos o más miembros seleccionados de un ensamblaje lipídico, un liposoma, una partícula en emulsión, un polímero, un coloide metálico, una preparación de partícula fina y similares, o puede contener, como componente constituyente, un complejo obtenido combinando un ensamblaje lipídico, un liposoma, una partícula en emulsión, un polímero, un coloide metálico, una preparación de partícula fina o similares con otro compuesto (tal como un azúcar, un lípido o un compuesto inorgánico).

El ensamblaje lipídico o el liposoma (en lo sucesivo denominado liposoma B) como componente constituyente de la partícula principal comprende, por ejemplo, un lípido y/o tensioactivo o similares. El lípido puede ser cualquiera de un lípido simple, un lípido complejo o un lípido derivado, y ejemplos de los mismos incluyen un fosfolípido, un gliceroglicolípido, un esfingoglicolípido, un esfingoide, un esteroide y similares, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen un fosfolípido. Además, ejemplos del lípido también incluyen tensioactivos (la misma definición que el tensioactivo que se describe más adelante), un polímero (la misma definición que el polímero que se describe más adelante, específicamente dextrano etc.) y un derivado lipídico tal como un derivado de polioxietileno (específicamente, polietilenglicol etc.) y ejemplos preferidos incluyen un lípido de polietileno glicolado. Ejemplos del tensioactivo incluyen un tensioactivo no iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo zwitteriónico y similares.

Ejemplos del fosfolípidos incluyen fosfolípidos naturales y sintéticos, tales como fosfatidilcolina (específicamente fosfatidilcolina de soja, fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC), fosfatidilcolina de diestearoilo, fosfatidilcolina de dipalmitoilo, fosfatidilcolina de dimiristoilo, fosfatidilcolina de dioleoilo etc.), fosfatidiletanolamina (específicamente, fosfatidiletanolamina de diestearoilo (DSPE), fosfatidiletanolamina de dipalmitoilo, fosfatidiletanolamina de dioleoilo etc.), glicerofosfolípido (específicamente, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina etc.), esfingofosfolípido (específicamente, esfingomielina, fosfonoetanolamina ceramida, fosfoglicerol ceramida, fosfoglicerofosfato ceramida etc.), glicerofosfonolípido, esfingofosfonolípido, lecitina natural (específicamente, lecitina de yema de huevo, lecitina de soja etc.) y fosfolípidos hidrogenado (específicamente fosfatidilcolina hidrogenada etc.).

Ejemplos del gliceroglicolípido incluyen sulfoxiribosilglicérido, diglicosilglicérido, digalactosildiglicérido, galactosildiglicérido, glicosildiglicérido y similares. Ejemplos del esfingoglicolípido incluyen galactosilcerebrósido, lactosilcerebrósido, gangliósido y similares.

Ejemplos del esfingoide incluyen esfingano, icosaesfingano, esfingosina, un derivado de los mismos y similares. Ejemplos del derivado de los mismos incluyen aquéllos en los que el $-NH_2$ del esfingano, icosaesfingano, esfingosina o similar está sustituido con $-NHCO(CH_2)_xCH_3$ (en la fórmula, x representa un número entero de 0 a 18, en concreto, se prefieren 6, 12 o 18) y similares. Ejemplos del esteroide incluyen colesterol, dihidrocolesterol, lanosterol, β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, brasicasterol, ergocasterol, fucosterol, 3β -[N-(N'-dimetilaminoetil)carbamoil]colesterol (DC-Chol) y similares.

- 5 Ejemplos del lípido diferente de estos incluyen cloruro de N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-(esperminacarboxiamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio (DMRIE), bromuro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio (DORIE) y similares.
- 10 Ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen monooleato de polioxietilensorbitano (específicamente Polisorbato 80, etc.), polioxietileno-polioxipropilenglicol (específicamente, Pluronic F68, etc.), un ácido graso de sorbitano (específicamente monolaurato de sorbitano, monooleato de sorbitano etc.), un derivado de polioxietileno (específicamente, aceite de ricino 60 polioxietileno hidrogenado, alcohol polioxietileno laurílico etc.), un éster de ácido graso de glicerol y similares.
- 15 Ejemplos de los tensioactivos aniónicos incluyen acilsarcosina, alquilsulfato sódico, sulfonato de alquilbenceno, un ácido graso de sodio que tiene de 7 a 22 átomos de carbono y similares. Ejemplos específicos incluyen dodecilsulfato sódico, laurilsulfato sódico, colato sódico, desoxicolato sódico, taurodesoxicolato sódico y similares.
- 20 Ejemplos de los tensioactivos catiónicos incluyen una sal alquilamina, una sal acilamina, una sal de amonio cuaternario, un derivado de amina y similares. Ejemplos específicos incluyen cloruro de benzalconio, una sal de acilaminoetil dietilamina, una sal de N-alquilpolialquilpoliamina, una polietileno poliamida de ácido graso, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, alquilpolioxietilenoamina, N-alquilaminopropilamina, un éster de ácido graso de trietanolamina y similares.
- 25 Ejemplos de tensioactivos zwitteriónicos incluyen sulfonato de 3-[3-colamidopropil]dimetilamonio]-1-propano, sulfonato de N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano y similares.
- En el liposoma B, estos lípidos y tensioactivos se usan solos o en combinación y, preferentemente, se usan en combinación. Como combinación en el caso en el que se usen en combinación, pueden ser ejemplos, por ejemplo, una combinación de dos o más componentes seleccionados de una fosfatidilcolina de soja hidrogenada, un fosfolípido de polietileno glicolado y colesterol, una combinación de dos o más componentes seleccionados de fosfatidilcolina de diestearoil, un fosfolípido de polietileno glicolado y colesterol, una combinación de EPC y DOTAP, una combinación de EPC, DOTAP y un fosfolípido de polietileno glicolado, una combinación de EPC, DOTAP, colesterol y un fosfolípido de polietileno glicolado, y similares.
- Además, el liposoma B puede contener un estabilizador de membrana tal como un esteroide, incluido colesterol, un antioxidante tal como tocoferol o similares, según sea necesario.
- 30 Ejemplos del ensamblaje lipídico incluyen una micela esférica, una micela invertida esférica, una micela con forma de salchicha, una micela invertida con forma de salchicha, una micela con forma de plato, una micela invertida con forma de plato, hexágono I, hexágono II y un producto asociado que comprende dos o más moléculas de lípido.
- 35 Ejemplos de las partículas en emulsión incluyen partículas en emulsión de aceite en agua (a/a), tal como una emulsión grasa, una emulsión que comprende un tensioactivo no iónico y aceite de soja, una emulsión lipídica y nanoesfera lipídica, partículas en emulsión de aceite en agua en aceite (a/a/a) y similares. Ejemplos del polímero incluyen polímeros naturales, tales como albúmina, dextrano, quitosano, sulfato de dextrano y ADN, polímeros sintéticos tales como poli-L-Lisina, polietilenoimida, ácido poliáspártico, un copolímero de estireno con ácido maleico, un copolímero de isopropilacrilamida con acrilpirrolidona, dendrímero modificado con PEG, ácido poliláctico, ácido poliglicólico de ácido poliláctico y ácido poliláctico de polietileno glicolado, una sal de los mismos y similares.
- 40 En el presente documento, la sal del polímero incluye, por ejemplo, una sal de metal, una sal de amonio, una sal de adición de ácido, una sal de adición de amina orgánica, una sal de adición de aminoácido y similares. Ejemplos de la sal metálica incluyen sales de metales alcalinos, tales como sal de litio, una sal de sodio y una sal de potasio, sales de metales alcalino-térreos tales como una sal de magnesio y una sal de calcio, una sal de aluminio, una sal de cinc y similares. Ejemplos de la sal de amonio incluyen sales de amonio, tetrametilamonio y similares. Ejemplos de la sal de adición de ácido incluyen inorgánicas, tales como un clorhidrato, un sulfato, un nitrato y un fosfato, y orgánicas, tales como un acetato, un maleato, un fumarato y un citrato. Ejemplos de la sal de adición de amina orgánica incluyen sales de adición de morfolina, piperidina y similares, y ejemplos de la sal de adición de aminoácido incluyen sales de adición de glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y similares.
- 45 Ejemplos de la sal de adición de ácido incluyen inorgánicas, tales como un clorhidrato, un sulfato, un nitrato y un fosfato, y orgánicas, tales como un acetato, un maleato, un fumarato y un citrato. Ejemplos de la sal de adición de amina orgánica incluyen sales de adición de morfolina, piperidina y similares, y ejemplos de la sal de adición de aminoácido incluyen sales de adición de glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y similares.
- 50 Ejemplos del coloide metálico incluyen coloides metálicos incluidos de oro, plata, platino, cobre, rodio, sílice, calcio, aluminio, hierro, indio, cadmio, bario, plomo y similares.
- Ejemplos de la preparación de partículas finas incluyen una microesfera, una microcápsula, un nanocristal, nanopartículas lipídicas, una micela polimérica y similares.
- 55 La partícula principal en la presente divulgación contiene, preferentemente, un derivado lipídico, un derivado de ácido graso de una o más sustancias seleccionadas de, por ejemplo, azúcares y polímeros hidrosolubles o un tensioactivo o similares. El derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancias seleccionadas de azúcares y polímeros hidrosolubles o el tensioactivo se pueden usar como componente constituyente de la partícula principal o se pueden usar añadiéndolo a los componentes constituyentes de la partícula principal.

- En la presente divulgación, ejemplos preferidos del derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancias seleccionadas de azúcares y polímeros hidrosolubles o el tensioactivo incluyen un glicolípido o un derivado lipídico o el derivado de ácido graso de un polímero hidrosoluble y ejemplos más preferidos de los mismos incluyen un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero hidrosoluble. El derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancias seleccionadas de azúcares y polímeros hidrosolubles o el tensioactivo es, preferentemente, una sustancia que tiene un carácter doble que una parte de la molécula tiene una propiedad de unión a otro(s) componente(s) constituyente(s) de la partícula principal debido a, por ejemplo, afinidad hidrofóbica, interacción electrostática o similares, y otra parte tiene una propiedad de unión a un disolvente usado en la producción de la partícula principal debido a, por ejemplo, afinidad hidrofílica, interacción electrostática o similares.
- 5 Ejemplos del derivado lipídico o el derivado de ácido graso de un azúcar incluyen los que comprenden un azúcar tal como sacarosa, sorbitol o lactosa, y cualquiera de los lípidos ilustrados en la definición mencionada anteriormente de la partícula principal o un ácido graso tal como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido mirístico o ácido láurico unidos entre sí y similares.
- 10 Ejemplos del derivado lipídico o el derivado de ácido graso de un azúcar incluyen los gliceroglicolípidos y los esfingoglicolípidos ilustrados en la definición mencionada anteriormente de la partícula principal y similares. Ejemplos del derivado lipídico o el derivado de ácido graso de un polímero hidrosoluble incluyen los que comprenden polietilenglicol, poliglicerol o un derivado de los mismos y cualquiera de los lípidos ilustrados en la definición mencionada anteriormente de la partícula principal o un ácido graso tal como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido mirístico o ácido láurico unidos entre sí y similares. Más preferentemente, se pueden poner como ejemplos un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un derivado de polietilenglicol o un derivado de poliglicerol, y todavía más preferentemente, se puede poner como ejemplos un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un derivado de polietilenglicol.
- 15 Ejemplos del derivado lipídico o del derivado de ácido graso de un derivado de polietilenglicol incluyen un lípido de polietileno glicolado [específicamente, fosfatidiletanolamina de polietilenglicol (más específicamente, 1,2-distearoilglicero-3-fosfetanolamina-N-[metoxi-(polietilenglicol)-2000] (PEG-DSPE) y similares), aceite de ricino 60 de polioxietileno hidrogenado, Cremophor EL y similares], un éster de ácido graso de polietilenglicolsorbitano (específicamente, monooleato de polioxietilensorbitano y similares), un éster de ácido graso de polietilenglicol y similares, y ejemplos más preferidos incluyen un lípido de polietileno glicolado.
- 20 Ejemplos del derivado lipídico o del derivado de ácido graso de un derivado de poliglicerol incluyen un lípido poliglicerolado (específicamente, poliglicerolfosfatidiletanolamina y similares), un éster de ácido graso de poliglicerol y similares, y ejemplos más preferidos incluyen un lípido poliglicerolado.
- 25 Ejemplos del tensioactivo incluyen los tensioactivos ilustrados en la definición mencionada anteriormente de la partícula principal, un éster de polietilenglicolalquilo y similares, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen polioxietileno polioxipropileno, un éster de ácido graso de glicerol, un éter de polietilenglicolalquilo y similares.
- 30 Además, la partícula principal tiene, preferentemente, una carga eléctrica positiva. La "carga eléctrica positiva", como se usa en el presente documento, incluye una carga eléctrica, polarización de superficie y similares, que generan atracción electrostática a una carga eléctrica en el ARN mencionado anteriormente, polarización intramolecular y similares. Con el fin de que la partícula principal tenga una carga eléctrica positiva, la partícula principal contiene, preferentemente, una sustancia catiónica, más preferentemente contiene un lípido catiónico.
- 35 La sustancia catiónica que se va a contener en la partícula principal es una sustancia que exhibe una naturaleza catiónica, no obstante, aunque sea una sustancia anfotérica que tiene el grupo catiónico y el grupo aniónico, la electro negatividad relativa varía en función del pH, la unión a otra sustancia o similares, por tanto, la sustancia anfotérica se puede clasificar en una sustancia catiónica, como puede ser el caso. Estas sustancias catiónicas se pueden usar como componente constituyente de la partícula principal o se pueden usar añadiéndolas a los componentes constituyentes de la partícula principal.
- 40 Ejemplos de la sustancia catiónica incluyen las sustancias catiónicas entre las ilustradas en la definición mencionada anteriormente de las partículas principales (específicamente, un lípido catiónico, un tensioactivo catiónico (la misma definición que antes), un polímero catiónico y similares), una proteína o péptido con el que se puede formar un complejo a un pH igual o inferior al punto isoeléctrico, y similares.
- 45 Ejemplos del lípido catiónico incluyen DOTAP, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DORIE, DC-Chol y similares.
- Ejemplos del polímero catiónico incluyen poli-L-lisina, polietilenimina, polifect, chitosano y similares.
- La proteína o el péptido con el que se puede formar un complejo a un pH igual o inferior al punto isoeléctrico no está particularmente limitado siempre que sea una proteína o un péptido con el que se puede formar un complejo a un pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la sustancia. Ejemplos de los mismos incluyen albúmina, orosomucoide, globulina, fibrinógeno, pepsina ribonucleasa T1 y similares.
- 50 La partícula principal de la presente invención se puede producir de acuerdo con un procedimiento de producción conocido y se puede usar una partícula principal producida mediante cualquier procedimiento de producción. Por

ejemplo, en la producción de la partícula principal que comprende, como componente constituyente, el liposoma B, que es un tipo de partícula principal, se puede aplicar un procedimiento de preparación de liposomas. Como procedimiento de preparación de liposomas conocido se encuentran, por ejemplo, el procedimiento de preparación de liposomas de Bangham y col. [véase "Journal of Molecular Biology" (J. Mol. Biol.), Vol. 13, pág. 238-252 (1965)], un procedimiento de inyección de etanol [véase "Journal of Cell Biology" (J. Cell Biol.), Vol. 66, pág. 621-634 (1975)], un procedimiento de prensa francesa [véase "FEBS Letters" (FEBS Lett.), Vol. 99, pág. 210-214. (1979)], un procedimiento de congelación-descongelación [véase "Archives of Biochemistry and Biophysics" (Arch. Biochem. Biophys.), Vol. 212, pág. 186-194 (1981)], a un procedimiento de evaporación en fase inversa [véase "Proceedings of the National Academy of Science United States of America" (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), Vol. 75, pág. 4194-4198 (1978)], un procedimiento de gradiente de pH (véase, por ejemplo, la patente japonesa nº 2.572.554, la patente japonesa nº 2,659,136, etc.) y similares. Como solución para dispersar el liposoma B en la producción del liposoma B, se pueden usar, por ejemplo, agua, un ácido, un álcali, cualquiera de diversos tampones, una solución salina fisiológica, una infusión de aminoácidos o similares. Además, en la producción del liposoma B también es posible añadir un antioxidante tal como ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un agente isotónico tal como glicerol, glucosa, cloruro sódico o similares. Además, el liposoma también se puede producir disolviendo un lípido o similares en, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como etanol, eliminando el disolvente mediante destilación, añadiendo una solución fisiológica salina o similares y agitando la mezcla con agitación, de modo que se forma el liposoma B.

Además, la mejora de la superficie del liposoma se puede llevar a cabo, opcionalmente, usando, por ejemplo, tensioactivos no iónicos (la misma definición que antes), tensioactivos catiónicos (la misma definición que antes), tensioactivos aniónicos (la misma definición que antes), un polímero, un derivado de polioxietileno o similares, y dicho liposoma de mejora de superficie también se usa como componente constituyente de las partículas principales de la presente invención [véase "Stealth Liposome", editado por D. D. Lasic y F. Martin, CRC Press Inc., USA, pág. 93-102 (1995)]. Ejemplos del polímero incluyen dextrano, pululano, manano, amilopectina, hidroxietilalmidón y similares. Ejemplos del derivado de polioxietileno incluyen Polisorbato 80, Pluronic F68, aceite de ricino 60 de polioxietileno hidrogenado, alcohol laurílico de polioxietileno, PEG-DSPE y similares. La mejora de superficie del liposoma se puede usar como uno de los procedimientos de incorporar derivado lipídico o derivado de ácido graso de una más sustancias seleccionadas de azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros hidrosolubles o un tensioactivo en las partículas principales.

Un diámetro medio de partícula del liposoma B puede seleccionarse con libertad a demanda. Ejemplos de un procedimiento de ajustar el diámetro medio de partícula incluye un procedimiento de extrusión y un procedimiento en el que una vesícula de liposoma multilamelar (MLV) grande se pulveriza mecánicamente (usando, específicamente, Manton-gaulin, un microfluidificador o similar) (véase "Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs", editado por R. H. Muller, S. Benita y B. Bohm, Scientific Publishers, Stuttgart, Germain, pág. 267-294, 1998) y similares.

Además, el procedimiento de producir un complejo obtenido combinando dos o más sustancias seleccionadas de, por ejemplo, un ensamblaje lipídico, el liposoma B, una partícula en emulsión, un polímero, un coloide metálico, una preparación de partículas finas y similares, que constituyen la partícula principal puede ser, por ejemplo, un procedimiento de producción en el que, por ejemplo, un lípido, un polímero o similar solo se mezclan en agua. En este momento, según sea necesario también se puede añadir una etapa de granulación, una etapa de esterilización o similares. Además, también es posible realizar la formación del complejo en cualquiera de los diversos disolventes, tales como acetona y éter.

En cuanto al tamaño de la partícula principal de la presente invención, un diámetro medio de partícula es, preferentemente, varios nanómetros a varias decenas de micrómetros, más preferentemente de 10 nm a 1000 nm, Además, más preferentemente, de 50 nm a 300 nm. Ejemplos del componente constituyente de la membrana lipídica en la presente invención incluyen los lípidos y los tensioactivos ilustrados en la definición mencionada anteriormente de la partícula principal y similares, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen un lípido neutro entre los lípidos y los tensioactivos, ejemplos más preferidos de los mismos incluyen un fosfolípidos y ejemplos todavía más preferidos de los mismos incluyen EPC. Además, el componente constituyente de la membrana lipídica es, preferentemente, soluble en un disolvente orgánico polar y se prefiere que el disolvente orgánico polar se puede contener en un líquido a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas complejas son dispersables. El lípido neutro, como se usa en el presente documento, significa un lípido que excluye el lípido catiónico y el tensioactivo catiónico ilustrados en la sustancia catiónica en el caso en el que la partícula principal tiene una carga eléctrica positiva descrita anteriormente y el lípido aniónico y el tensioactivo aniónico ilustrados en el agente competitivo de adhesión descrito más adelante entre los lípidos y tensioactivos, y ejemplos preferidos del lípido neutro incluyen un fosfolípidos, un gliceroglicolípido, un esfingoglicolípido y similares.

Ejemplos del disolvente orgánico polar de la presente invención incluyen alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol, 2-propanol, n-butanol, 2-butanol, y terc-butanol, glicoles tales como glicerol, etilenglicol y propilenglicol, polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol y similares, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen etanol.

Además, ejemplos del lípido que se va a usar en la membrana lipídica incluyen un lípido sintético y similares.

5 Ejemplos del lípido sintético incluyen fosfatidilcolina fluorada, tensioactivos fluorados, bromuro de dialquilamonio y similares. Estos pueden usarse solos o en combinación con otro lípido o similares. Además, la membrana lipídica contiene un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble, preferentemente contiene el derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático mencionado anteriormente de un polímero hidrosoluble, más preferentemente contiene el fosfolípidos de polietileno glicolado mencionado anteriormente y, más preferentemente, contiene fosfatidiletanolamina de polietilenglicol.

10 Ejemplos del derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble en la presente invención incluyen el derivado lipídico, el derivado de ácido graso mencionado anteriormente de una o más sustancias seleccionadas de azúcares y polímeros hidrosolubles o el derivado de hidrocarburo alifático de una o más sustancias seleccionadas de azúcares y polímeros hidrosolubles, ejemplos preferidos de los mismos incluyen un glicolípido o un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero hidrosoluble, y ejemplos más preferidos de los mismos incluyen un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero hidrosoluble.

15 Ejemplos del derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble incluyen los que comprenden una sustancia hidrosoluble y, por ejemplo, un residuo de alcohol de un alcohol alifático de cadena larga, polioxipolipropilenoalquilo, un éster de ácido graso de glicerina o similares unidos entre sí.

Ejemplos del derivado de hidrocarburo alifático de un azúcar incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de un azúcar tal como sacarosa, sorbitol o lactosa.

20 Ejemplos del derivado de hidrocarburo alifático de un polímero hidrosoluble incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de un derivado de polietilenglicol o un derivado de poliglicerol, y ejemplos más preferidos de los mismos incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de un derivado de polietilenglicol.

25 En el caso en el que la partícula principal es una partícula fina que comprende el liposoma B como componente constituyente, una sustancia que comprende partículas complejas que comprenden el liposoma B y el ARN mencionado anteriormente como componentes constituyentes y una membrana lipídica para recubrir las partículas complejas se convierte en el liposoma A, que se clasifica en liposoma en un sentido estrecho en base a su estructura. Incluso si la partícula principal es diferente de una partícula fina que comprende el liposoma B como componente constituyente, la partícula principal está recubierta por una membrana lipídica, por tanto, la sustancia resultante se clasifica en liposoma en un amplio sentido. En la presente invención se prefiere más que el
30 componente constituyente de la partícula principal también es un liposoma.

Las partículas complejas que comprenden la partícula principal y el ARN como componentes constituyentes de la presente invención se pueden producir adhiriendo o encapsulando el ARN a o en la partícula principal después, o de forma concurrente, con la producción de la partícula principal. Además, el liposoma A se puede producir recubriendo las partículas complejas con la membrana lipídica después, o de forma concurrente, con la producción de las
35 partículas complejas. El liposoma A se puede producir mediante, o de acuerdo con, un procedimiento de producción conocido descrito en, por ejemplo, la traducción japonesa publicada de una solicitud internacional de PCT N° 2002-501511, "Biochimica et Biophysica Acta", Vol. 1510, pág. 152-166 (2001), y la publicación internacional n° WO 02/28367, o se puede producir mediante un procedimiento de producción que incluye una etapa de dispersión de las partículas complejas y recubrir los componentes de la capa en un líquido que contiene un disolvente orgánico polar en el que los componentes de la capa de recubrimiento son solubles a una concentración a la cual las partículas
40 complejas no se disuelven en los componentes de la capa de recubrimiento están presentes en un estado dispersado después de que se produzcan las partículas complejas adhiriendo o encapsulando el ARN a o dentro de la partícula principal, y una etapa de recubrir las partículas complejas con los componentes de la capa de recubrimiento.

45 Como procedimiento de producción preferido del liposoma en la composición de la presente invención, se puede poner como ejemplo el siguiente procedimiento de producción que incluye una etapa de producir partículas complejas que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN (etapa 1) y una etapa de recubrimiento de las partículas complejas con una membrana lipídica (etapa 2 o etapa 3).

50 Etapa 1) etapa de producir partículas complejas que comprenden como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN, Las partículas principales se dispersan en un disolvente tal como agua, el ARN se dispersa o disuelve mezclando de forma que esté contenido en el líquido en el que las partículas principales se dispersan y el ARN se adhiere a las partículas principales. En la etapa 1, con el fin de suprimir la agregación de las partículas principales, las partículas principales son, preferentemente, partículas principales que comprenden la sustancia de supresión de la agregación y, más preferentemente, las partículas principales contienen como sustancia de
55 supresión de la agregación, el derivado lipídico o derivado de ácido graso mencionado anteriormente de una o más sustancias seleccionadas de azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros hidrosolubles o el tensioactivo. Además, en el caso en el que las partículas principales tienen una carga eléctrica positiva, el ARN y un agente de competición de la adhesión pueden coexistir en el líquido en el que las partículas principales se dispersan y el agente de competición de la adhesión puede adherirse a las partículas principales, así como al ARN. Además,
60 también en el caso en el que las partículas principales son partículas principales que comprenden la sustancia de

supresión de la agregación, con el fin de suprimir además la agregación de las partículas principales, se puede usar el agente de competición de la adhesión. En la combinación de las partículas principales y el ARN, se prefiere seleccionar una combinación en la que las partículas complejas son dispersables en el líquido que contiene un disolvente orgánico polar y se prefiere más que la solubilidad de las partículas complejas en el disolvente orgánico polar sea menor que la de los componentes constituyentes de la membrana lipídica que se va a usar en la etapa 2 o 3. Es también más preferido seleccionar una combinación en la que el disolvente orgánico polar pueda estar contenido en un líquido a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica sean dispersables y las partículas complejas sean dispersables.

Ejemplos de agente de competición de la adhesión incluyen una sustancia aniónica y similares, y la sustancia aniónica incluye una sustancia adherida electrostáticamente a los componentes constituyentes de las partículas principales debido a la atracción electrostática por una carga eléctrica, polarización intramolecular o similares en la molécula. La sustancia aniónica como agente de competición de la adhesión es una sustancia que exhibe una naturaleza aniónica, no obstante, aunque sea una sustancia anfotérica que tiene el grupo catiónico y el grupo aniónico, la electronegatividad relativa varía en función del pH, la unión a otra sustancia o similares, por tanto, la sustancia anfotérica se puede clasificar en una sustancia aniónica, como puede ser el caso.

Ejemplos de la sustancia aniónica incluyen las sustancias aniónicas entre las ilustradas en la definición mencionada anteriormente de las partículas principales (específicamente, un lípido aniónico, un tensioactivo aniónico (la misma definición que antes), un polímero aniónico y similares), una proteína o péptido con el que se puede formar un complejo a un pH igual o superior a un punto isoeléctrico, un ácido nucleico y similares. Ejemplos preferidos de los mismos incluyen una o más sustancias seleccionadas de sulfato de dextrano, sulfato de dextrano sódico, condroitínsulfato, condroitínsulfato sódico, ácido hialurónico, condroitina, sulfato de dermatán, heparínsulfato, heparina, queratínsulfato, dextrano fluoresceína aniónico y similares.

Ejemplos del lípido aniónico incluyen fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y similares. Ejemplos del polímero aniónico incluyen ácido poliaspártico, un copolímero de estireno con ácido maleico, un copolímero de isopropilacrilamida con acrilopirrolidina, dendrímero modificado con PEG, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poliláctico polietileno glicolado, sulfato de dextrano, sulfato de dextrano sódico, condroitínsulfato, condroitínsulfato sódico, ácido hialurónico, condroitina, sulfato de dermatán, heparínsulfato, heparina, queratínsulfato, dextrano fluoresceína aniónico y similares.

La proteína o el péptido con el que se puede formar un complejo a un pH igual o superior al punto isoeléctrico no está particularmente limitado siempre que sea una proteína o un péptido con el que se puede formar un complejo a un pH igual o superior al punto isoeléctrico de la sustancia. Ejemplos de los mismos incluyen albúmina, orosomucoide, globulina, fibrinógeno, histona, protamina, ribonucleasa, lisozima y similares.

Ejemplos del ácido nucleico como sustancia aniónica incluyen ADN, ARN, plásmido, ARNsi, ODN y similares. Puede tener cualquier longitud y cualquier secuencia siempre que no exhiba una actividad fisiológica.

El agente de competición de la adhesión se adhiere electrostáticamente, preferentemente, a los componentes constituyentes de las partículas principales y es, preferentemente, una sustancia con un tamaño que no permite la formación de reticulación para agregar los componentes constituyentes de las partículas principales incluso si la sustancia se adhiere a los componentes constituyentes de las partículas principales, o una sustancia que tiene en su molécula un resto que se adhiere a los componentes constituyentes y a un resto que repele la adhesión y suprime la agregación de las partículas principales. Más específicamente, la etapa 1 se puede llevar a cabo en, por ejemplo, un procedimiento de producción que incluye una etapa de producir un líquido en el que las partículas principales que comprenden una sustancia de supresión de la agregación están dispersas y una etapa de dispersión o disolución del ARN de forma que esté contenido en el líquido en el que las partículas principales están dispersas (por ejemplo, una etapa de añadir el ARN al líquido en el que las partículas principales están dispersas y la dispersión o disolución del ARN en su interior, una etapa de adición de un líquido en el que el ARN se dispersa o disuelve en el líquido en el que las partículas principales están dispersas o similares). En el presente documento, ejemplos específicos de las partículas complejas obtenidas mediante la etapa de dispersión o disolución del ARN de modo que esté contenido en el líquido en el que las partículas principales están dispersas, incluyen partículas complejas formadas mediante la adhesión del ARN a las partículas finas que comprenden un componente constituyente, el liposoma B que comprende el lípido catiónico, partículas complejas formadas mediante la adhesión del ARN a las partículas finas que comprenden un componente constituyente, un ensamblaje lipídico que comprende el lípido catiónico y partículas complejas formadas mediante la adhesión del ARN a las partículas finas que comprenden un componente constituyente, un polímero que comprende un polímero catiónico tal como poli-L-lisina. Además, la etapa de dispersión o disolución del ARN de modo que esté contenido en el líquido en el que las partículas principales están dispersas es, preferentemente, una etapa de incorporar adicionalmente el agente de competición de la adhesión en el líquido en el que el ARN está dispersa o disuelta y de añadir el líquido resultante al líquido en el que las partículas principales están dispersas. En este caso, las partículas complejas se producen adhiriendo tanto el ARN como el agente de competición de la adhesión a las partículas principales, y la producción se puede llevar a cabo suprimiendo además la agregación de las partículas principales durante la producción de las partículas complejas y la agregación de las partículas complejas tras la producción.

La proporción de las partículas principales en el líquido en el que están dispersas las partículas principales no está particularmente limitada siempre que el ARN se puede adherir a las partículas principales, no obstante es, preferentemente, de 1 µg/ml a 1 g/ml, más preferentemente de 0,1 a 500 mg/ml.

Etapa 2) Etapa de recubrir partículas complejas con membrana lipídica (1)

5 El liposoma A se puede producir mediante, por ejemplo, un procedimiento de producción que incluye una etapa de preparar un líquido (líquido A) que contiene un disolvente orgánico polar en el que las partículas complejas obtenidas en la etapa 1 están dispersas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica se disuelven y una etapa de recubrimiento de las partículas complejas con la membrana lipídica reduciendo la proporción del disolvente orgánico polar en el líquido A. En este caso, el liposoma A se obtiene en forma de una dispersión (líquido B). El disolvente en el líquido A es un disolvente que contiene un disolvente orgánico polar a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son solubles y las partículas complejas son dispersables. En el líquido B en el que la proporción del disolvente orgánico polar en el líquido A se reduce, los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas complejas son también dispersables. En el caso en el que el disolvente en el líquido A es una mezcla de líquidos de un disolvente orgánico polar y un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar mediante, por ejemplo, la adición de un disolvente que comprende un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar que se puede mezclar con el disolvente orgánico polar (líquido C) y/o la eliminación selectiva del disolvente orgánico polar mediante destilación por evaporación, separación en membrana semipermeable, destilación fraccional o similar, la proporción del disolvente orgánico polar se puede reducir. En el presente documento, el líquido C es un disolvente que comprende un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar y también puede contener un disolvente orgánico polar siempre que la proporción del disolvente orgánico polar es menor que la del disolvente orgánico polar contenido en el líquido A.

25 Ejemplos del disolvente diferente de un disolvente orgánico polar de la etapa 2 incluye agua, dióxido de carbono líquido, un hidrocarburo líquido, un carbono halogenado, un hidrocarburo halogenado y similares, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen agua. Además, el líquido A y el líquido C pueden contener un ion, un componente tampón o similares.

30 La combinación de un disolvente orgánico polar con un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar es, preferentemente, una combinación de disolventes que se pueden mezclar entre sí y se pueden seleccionar considerando la solubilidad de las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica en los disolventes en el líquido A y el líquido B y el líquido C. Por otro lado, preferentemente, las partículas complejas tienen una solubilidad baja en cualquiera de los disolventes en el líquido A y el líquido B y el líquido C, y, también preferentemente, tienen una solubilidad baja en cualquiera del disolvente orgánico polar y un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar. Preferentemente, los componentes constituyentes de la membrana lipídica tienen una solubilidad baja en el disolvente en el líquido B y el líquido C, y, preferentemente, tienen una solubilidad alta en el disolvente en el líquido A y, preferentemente, tienen una solubilidad alta en el disolvente orgánico polar y, preferentemente, tienen una solubilidad baja en un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar. En el presente documento, las partículas complejas que tienen una solubilidad baja significa que la elución de cada componente contenido en las partículas complejas, tales como las partículas principales, el ARN y el agente de competición de la adhesión en el disolvente es baja e, incluso si las respectivas solubilidades de los componentes son altas, es suficiente que la elución de cada componente se convierte en baja debido a la unión o similar entre los respectivos componentes. Por ejemplo, incluso en el caso en el que la solubilidad de cualquiera de los componentes contenidos en las partículas principales en el disolvente en el líquido A es alta, si las partículas principales tienen una carga eléctrica positiva y se forma un enlace electrostático debido a una carga eléctrica, polimerización intramolecular o similares en el ARN, y la solubilidad de los componentes en el disolvente en el líquido A se convierte en baja, la elución de los componentes en las partículas complejas se suprime, de modo que la solubilidad de las partículas complejas en el disolvente en el líquido A se puede disminuir. Es decir, si las partículas principales tienen una carga eléctrica positiva, la elución de los componentes de las partículas complejas se suprime en la producción del liposoma A y se imparte un efecto de mejorar la productividad y el rendimiento.

50 La proporción del disolvente orgánico polar en el líquido A no está particularmente limitada siempre que sea una proporción a la cual los componentes constituyentes de la membrana lipídica sean solubles y las partículas complejas sean dispersables y varía en función del disolvente o de las partículas complejas que se van a usar, el tipo de constituyentes de la membrana lipídica o similares. No obstante, preferentemente es de 30 % v/v o más, más preferentemente de 60 a 90 % v/v. Además, la proporción del disolvente orgánico polar en líquido B no está particularmente limitada siempre que el líquido B contenga el disolvente orgánico polar a una concentración inferior a la del líquido A y es una proporción a la cual los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas complejas son también dispersables, no obstante es, preferentemente, 50 % v/v o inferior.

60 La etapa de preparar el líquido A puede ser una etapa de preparar el líquido A añadiendo el disolvente orgánico polar, las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica o el disolvente orgánico polar, las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica y el disolvente diferente del disolvente orgánico polar en cualquier orden siempre que las partículas complejas no estén disueltas.

Preferentemente, se puede poner como ejemplo una etapa de preparar el líquido A mediante preparación de un líquido (líquido D) que contiene un disolvente orgánico polar en el que las partículas complejas están dispersas, la preparación de un líquido (líquido E) en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica están disueltos en un disolvente que contiene un disolvente orgánico polar que es el mismo o diferente del disolvente orgánico polar en el líquido D1 y mezclando el líquido D y el líquido E. Cuando el líquido A se prepara mezclando el líquido D y el líquido E, se prefiere mezclarlos gradualmente.

Etapa 3) Etapa de recubrir partículas complejas con membrana lipídica (2)

El liposoma A se puede producir mediante un procedimiento de producción que incluye una etapa de dispersar las partículas complejas obtenidas en la etapa 1 y los componentes constituyentes de la membrana lipídica en un líquido (líquido F) que contiene un disolvente orgánico polar en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son solubles a una concentración a la que la partícula compleja no está disuelta y los componentes constituyentes de la membrana lipídica están presentes en estado disperso. En este caso, el liposoma A se puede obtener en un estado de dispersión. El disolvente en el líquido F es un disolvente que contiene un disolvente orgánico polar en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son solubles y en el que el disolvente que comprende el disolvente orgánico polar, en el que el disolvente orgánico polar puede estar contenido en un líquido a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas complejas son dispersables.

Como procedimiento de preparación del líquido F se puede usar cualquier realización. Por ejemplo, el líquido F se puede preparar preparando una dispersión de las partículas complejas y una solución o una dispersión de los componentes constituyentes de la membrana lipídica y mezclando ambos líquidos, o el líquido F se puede preparar preparando una de las dispersiones de las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica y añadiendo y dispersando las otras partículas complejas restantes o componentes constituyentes de la membrana lipídica en forma de un sólido en la dispersión resultante. En el caso en el que se mezclan una dispersión de las partículas complejas y una solución o una dispersión de los componentes constituyentes de la membrana lipídica, un medio de dispersión de las partículas complejas puede contener un disolvente orgánico polar con antelación, además, los componentes constituyentes de la membrana lipídica de recubrimiento se pueden disolver o dispersar en el mismo, y un disolvente o un medio de dispersión de los componentes constituyentes de la membrana lipídica puede ser un líquido que contiene un disolvente orgánico polar o un líquido compuesto únicamente por un disolvente orgánico polar. Por otro lado, en el caso en el que se preparan las dispersiones de las partículas complejas o de los componentes constituyentes de la membrana lipídica y las otras partículas complejas restantes o componentes constituyentes de la membrana lipídica en forma de un sólido se añaden a la dispersión resultante, la dispersión resultante es un líquido que contiene un disolvente orgánico polar. Incidentalmente, en el caso en el que las partículas complejas no se disuelven y los componentes constituyentes de la membrana lipídica están dispersos después de preparar el líquido F, se puede añadir un disolvente orgánico polar en un intervalo de concentración del disolvente orgánico polar en el que las partículas complejas no se disuelven y los componentes constituyentes de la membrana lipídica están dispersos, o el disolvente orgánico se puede eliminar o la concentración del mismo se puede reducir. Por otro lado, en el caso en el que las partículas complejas no se disuelven y los componentes constituyentes de la membrana lipídica están disueltos después de preparar el líquido F, el disolvente orgánico polar se puede eliminar o la concentración del mismo se puede reducir en un intervalo de concentración del disolvente orgánico polar en el que las partículas complejas no están disueltas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica están dispersos. Como alternativa, las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica se mezclan en un disolvente diferente del disolvente orgánico polar con antelación y se puede añadir un disolvente orgánico polar en un intervalo de concentración del disolvente orgánico polar en el que las partículas complejas no están disueltas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica están dispersos. En este caso, las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica se dispersan por separado en disolventes diferentes de un disolvente orgánico polar y ambas dispersiones se mezclan y, después, se puede añadir un disolvente orgánico polar, o uno de las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica se dispersan en un disolvente diferente del disolvente orgánico polar y las otras partículas complejas restantes o componentes constituyentes de la membrana lipídica en forma de un sólido se añaden a la dispersión resultante y, después, se puede añadir un disolvente orgánico polar. Además, se prefiere incluir una etapa de dejar que un líquido, en el que las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica están dispersos y un disolvente orgánico polar está contenido, repose o de mezclar el líquido durante un tiempo suficiente para recubrir las partículas complejas con la membrana lipídica. El tiempo para dejar que el líquido repose o mezclar el líquido después de dispersar las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica en el líquido que comprende el disolvente orgánico polar no está limitado, siempre que no se complete inmediatamente después de que las partículas complejas y los componentes constituyentes de la membrana lipídica se dispersen en el líquido que comprende el disolvente orgánico polar, no obstante, se puede fijar arbitrariamente en función de los componentes constituyentes de la membrana lipídica o el tipo del líquido que comprende el disolvente orgánico polar y, preferentemente, se fija en un tiempo que mantenga el rendimiento del liposoma A obtenido constante, por ejemplo de 3 segundos a 30 minutos.

Ejemplos del disolvente diferente de un disolvente orgánico polar en el líquido F incluyen los que se ilustran en el disolvente diferente de un disolvente orgánico polar en la etapa 2, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen agua.

La proporción del disolvente orgánico polar en el líquido F no está particularmente limitada siempre que se cumpla el único requisito de que tanto las partículas complejas como los componentes constituyentes de la membrana lipídica estén dispersas y varía en función del disolvente o de las partículas complejas que se van a usar, el tipo de constituyentes de la membrana lipídica o similares. No obstante, es, preferentemente, de 1 a 80 % vol, más preferentemente de 10 a 60 % vol, más preferentemente de 20 a 50 % vol y, más preferentemente de, 30 a 40 vol%.

En la presente invención, la descripción de los componentes constituyentes de la membrana lipídica que son solubles en un disolvente orgánico polar incluyen un caso en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica tiene una propiedad de disolverse en un disolvente orgánico polar, caso en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica tiene una propiedad de disolverse en un disolvente orgánico polar con la ayuda de un solubilizante o similares, un caso en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica tienen una propiedad capaz de ser emulsionados o formados en una emulsión formando agregados, micelas o similares, en un disolvente orgánico polar y similares. Además, la descripción de los componentes constituyentes de la membrana lipídica que son dispersables incluye un estado en el que la totalidad de los componentes constituyentes de la membrana lipídica forman agregados, micelas o similares, y se emulsionan o forman en una emulsión, un estado en el que una parte de los componentes constituyentes de la membrana lipídica forman agregados, micelas o similares, y se emulsionan o forman en una emulsión y el resto de los componentes se disuelven, un estado en el que una parte de los componentes constituyentes de la membrana lipídica forman agregados, micelas o similares, y se emulsionan o forman en una emulsión y el resto de los componentes se precipitan y similares. Incidentalmente, la descripción de los componentes constituyentes de la membrana lipídica que se disuelven no incluye un estado en el que la totalidad de los componentes constituyentes de la membrana lipídica forman agregados, micelas o similares, y se emulsionan o forman en una emulsión.

En la presente invención, la descripción de las partículas complejas dispersas significa un estado en el que las partículas complejas se suspenden o emulsionan o forman en una emulsión e incluye un estado en el que una parte de las partículas complejas se suspenden y se emulsionan o forman en una emulsión y el resto de las partículas se disuelven, un estado en el que una parte de las partículas complejas se emulsionan o forman en una emulsión y el resto de las partículas se precipitan y similares. La descripción de las partículas complejas que no están disueltas es la misma que la definición mencionada anteriormente de las partículas complejas dispersas.

La concentración de las partículas complejas en el líquido que contiene un disolvente orgánico polar a usar en el procedimiento de producción del liposoma A de acuerdo con la presente divulgación no está particularmente limitada, siempre que permita que las partículas complejas se recubran con la membrana lipídica, no obstante, preferentemente es de 1 µg/ml a 1 g/ml, más preferentemente de 0,1 a 500 mg/ml. Además, la concentración de los componentes de la membrana lipídica que se van a usar no está particularmente limitada siempre que permita que las partículas complejas se recubran, no obstante es, preferentemente, de 1 µg/ml a 1 g/ml, más preferentemente de 0,1 a 400 mg/ml.

La proporción de la membrana lipídica y el liposoma A de la presente divulgación es, preferentemente, de 1:0,1 a 1:1000, más preferentemente de 1:1 a 1:10 en proporción en peso.

Además, en cuanto al tamaño del liposoma A de la presente divulgación, un diámetro medio de las partículas es, preferentemente, 300 nm, más preferentemente 200 nm o menor. Específicamente se prefiere, por ejemplo, un tamaño inyectable.

Además, el liposoma A obtenido anteriormente se puede modificar con una sustancia, tal como una proteína que incluye un anticuerpo y similar, un sacárido, un glicolípido, un aminoácido, un ácido nucleico o cualquiera de diversos compuestos y polímeros de bajo peso molecular, y dichas partículas complejas recubiertas obtenidas mediante modificación se incluyen en el liposoma A. Por ejemplo, con el fin de aplicar a la diana, es posible que el liposoma A obtenido anteriormente se somete además a una modificación en la superficie de la membrana lipídica usando una proteína, tal como un anticuerpo, un péptido, un ácido graso o similares [véase "Stealth Liposome", editado por D. D. Lasic y F. Martin, CRC Press Inc., USA, pág. 93-102, (1995)]. Además, opcionalmente también se puede mejorar la superficie del liposoma A usando, por ejemplo, un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático, de una sustancia hidrosoluble. El derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble que se va a usar en la modificación de la superficie son la misma definición que el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble como los componentes constituyentes de la membrana lipídica.

Administrando la composición de la presente invención a un mamífero, el ARN se puede liberar en un tejido o un órgano que incluye un sitio de expresión de un gen diana y, por ejemplo, un ARN capaz de suprimir la expresión del gen KLF5 y un gen cuya transcripción se activa mediante KLF5 se puede introducir en una célula de mamífero in vivo y la expresión del gen KLF5, un gen cuya transcripción se activa mediante KLF5 y similares se puede suprimir. Mediante la composición de la presente invención, por ejemplo, la expresión del gen KLF5 y un gen cuya transcripción se activa mediante KLF5 se suprime y la proliferación de músculo liso y de la angiogénesis se puede suprimir, por tanto, la composición de la presente invención se puede usar como ingrediente activo de un agente terapéutico o preventivo para una enfermedad cardiovascular, tal como arterioesclerosis, restenosis tras intervención coronaria o hipertrofia cardíaca, cáncer o similares. Además, en el caso en el que el gen diana del ARN es un gen

asociado con un tumor o una inflamación o un gen asociado con la angiogénesis, por ejemplo, es posible tratar un tumor administrando la composición como agente terapéutico para el tumor o es posible tratar una inflamación administrando la composición como agente terapéutico para la inflamación. Además, la composición de la presente invención también se puede usar como herramienta para adquirir POC (prueba de concepto) en un sistema de detección selectiva in vivo.

La composición de la presente invención se puede usar como preparación destinada para estabilización del ARN en un componente del cuerpo vivo, tal como un componente sanguíneo (por ejemplo, sangre, tracto gastrointestinal o similares), reducción de los efectos secundarios, incremento de la propiedad de acumulación de un fármaco en un órgano diana tal como un tumor, mejora de la absorción de un fármaco por vía oral o mediante membrana mucosa o similares.

En el caso en el que la composición de la presente invención se usa como preparación de fármaco, se prefiere usar una vía de administración que es la más eficaz para el tratamiento. Ejemplos de la vía de administración incluyen las vías de administración parenteral, tal como las vías de administración intraoral, administración traqueobronquial, administración intrarrectal, administración subcutánea, administración intramuscular y administración intravenosa y administración oral. Ejemplos preferidos de las mismas incluyen administración intravenosa y administración intramuscular, y ejemplos más preferidos de las mismas incluyen la administración intravenosa.

Como preparación adecuada para administración intravenosa o administración intramuscular, por ejemplo, se puede poner de ejemplo una inyección y también es posible usar la dispersión del liposoma A preparado mediante el procedimiento mencionado anteriormente dado que está en forma de, por ejemplo, una inyección o similar. No obstante, también se puede usar después de eliminar el disolvente de la dispersión mediante, por ejemplo, filtración, centrifugación o similares, o, después de liofilizar la dispersión o la dispersión suplementada con un excipiente tal como manitol, lactosa, trehalosa, maltosa o glicina.

En el caso de una inyección, se prefiere que una inyección se prepare mezclando, por ejemplo, agua, un ácido, un álcali, cualquiera de diversos tampones, una solución salina fisiológica, una infusión de aminoácidos o similares con la dispersión del liposoma A o el liposoma A obtenido eliminando el disolvente o la liofilización. Además, es posible preparar una inyección añadiendo un antioxidante tal como ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína o EDTA, un agente isotónico tal como glicerol, glucosa o cloruro sódico o similares. Además, también se puede crioconservar añadiendo un agente de crioconservación tal como glicerol.

Además, el liposoma A se puede formular en una preparación oral, tal como una cápsula, un comprimido o un gránulo mediante granulación junto con un excipiente adecuado o similares, secado o similares.

Ejemplos del liposoma de la presente divulgación incluyen un liposoma que comprende partículas complejas que comprende como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN, y una membrana lipídica para recubrir las partículas completas, los componentes constituyentes de la membrana lipídica se pueden disolver en un disolvente orgánico polar, el disolvente orgánico polar puede estar contenido en un líquido a una concentración tal que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son dispersables y las partículas complejas son dispersables; y el liposoma que comprende partículas complejas que comprende como componentes constituyentes una partícula principal que comprende un lípido catiónico y el ARN mencionado anteriormente y una membrana lipídica para recubrir las partículas complejas, en el que la membrana lipídica contiene, como componentes constituyentes, un lípido neutro y un derivado lipídico, un derivado e ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble.

A continuación en el presente documento, se describirá la presente invención más específicamente con referencia a los Ejemplos y Ejemplos de referencia. No obstante, la presente invención no está limitada a estos Ejemplos y Ejemplos de referencia.

Ejemplo de referencia 1: Preparación de ARNsi 1

Como secuencia de ARNsi que es capaz de suprimir la expresión del gen KLF5, de la secuencia de ADNc de KLF5 de ratón (Nº de Acceso GenBank NM_009769; SEC ID Nº 41) se seleccionaron 11 secuencias parciales que satisfacen los siguientes 2 requisitos: (a) una secuencia que consiste en 21 nucleótidos que comienzan con AA; y (b) un contenido en GC entre 20 % y 80 %. Preferentemente, dichas secuencias se seleccionaron de secuencias localizadas en una región de codificación (la secuencia en los nucleótidos 167-1507 de la SEC ID Nº 41) y localizadas además 75 nucleótidos o más cadena abajo del codón de iniciación (la secuencia en los nucleótidos 167-169 de la SEC ID Nº 41) y que tienen un contenido en GC entre 40% y 60%. Las posiciones de las secuencias seleccionadas en la SEC ID Nº 41 y los contenidos en GC de los mismos se mostraron en la Tabla 1. Las secuencias obtenidas sustituyendo T por U en 19 nucleótidos que excluyen AA en el extremo 5' de las mismas en las secuencias seleccionadas se mostraron en las SEC ID Nº 1 a 11.

[Tabla 1]

Secuencia seleccionada	Posición de la secuencia	Contenido en GC	Secuencia de ARN producida	SEC ID N°	ARNsi N°
AACATGAACGTCTTCTCCCT	537-556	48% (10/21)	CAUGAACGUUUUCCUCCUUT	17	N° 1
AAATTCTGCCACTCTGCC	1156-1176	48% (10/21)	AGGGAGGAAGACGUUCAUGTT	18	N° 2
AAGGAGTAACCCGGATCTGGA	1216-1236	52% (11/21)	AUUUACCUGCCACUUGCCUU	19	N° 3
AAAAGCTCACCTGAGGACTCA	1303-1323	48% (10/21)	GGCAGAGUAGGACAGGUAUUU	20	N° 4
AATCCCAGACCGTCCA TGCC	151-171	62% (13/21)	GGAGUAAACCCGGAUUGGAAU	21	N° 5
AACGCTGC GCCCACCCGCCTG	1515-1535	76% (16/21)	UCCAGAUCCGGGUUACUCCUU	22	N° 6
AAATGGAGAAGTATCTGACCC	405-425	43% (9/21)	AAGCUCACCUAGGAGACUUAU	23	N° 7
AAAGTATAGACGAGACAGTGC	463-483	43% (9/21)	UGAGUCCUCAGGUGAGCUUU	24	N° 8
AAACCAGACGGCAGTAATGGA	874-894	48% (10/21)	UCCCCAGACCCGUCCAUCCUU	25	N° 9
AAGCTCAGAGCCCTGGAAGTCC	2048-2068	57% (12/21)	GGCAUAGGACGGUUCUGGGGUU	26	N° 10
AAGCCGTTCAGTGCATGGTG	1424-1444	57% (12/21)	CGCUUGGCCACCCGCCUUGUU	27	N° 11
			CAGCGGGUUGGGGCAGCGUU	28	
			AUGGAGAAGUAUCUGACCCUU	29	
			GGGUCAGAUACUUCUCCAUUU	30	
			AGUAUA GACGAGACAGUGUU	31	
			GCAUCUGUCUCGUCUAUACUUU	32	
			ACCA GACGGCAGUAUUGGAUU	33	
			UCCAUUACU GCCGUCUGGCCUU	34	
			GCUCAGAGCCUGGAAGUCCUU	35	
			GGACUUCAGGUCUCUGAGCUU	36	
			GCCGUUCCAGUUGCAUUGGUUU	37	
			CACCAUGCACUUGGAACGGCUU	38	

11 tipos de ARN bicatenarios (en lo sucesivo en el presente documento denominados ARNsi N° 1 a 11, respectivamente), que tienen una secuencia mostrada en uno cualquiera de los SEC ID N° 1 a 11 y una secuencia complementaria, en la que UUU o dTdT se han añadido al extremo 3' de cada una de las secuencias, se prepararon del siguiente modo. Las secuencias de la hebra sentido y la hebra antisentido de cada uno de los ARNsi N° 1 a 11 se muestran en la Tabla 1 (SEC ID N° 17 a 38). El ARNsi N° 1 se preparó del siguiente modo. A saber, la síntesis química de dos ARN mostrados en las SEC ID N° 17 y 18 fue llevada a cabo por Japan Bio Services, Co., Ltd. y los ARN obtenidos de este modo se hibridaron entre sí. Los ARNsi N° 2 a 11 se prepararon mediante transcripción in Vitro usando el kit Silencer™ siRNA Construction Kit (fabricado por Ambion). El ADN que se va a usar para la producción de un molde para la transcripción in Vitro fue preparado por Hokkaido System Science Co., Ltd.

Ejemplo de referencia 2: Preparación de ARNsi 2

Con respecto a los ARNsi N° 2 a 4 y 7 a 11 obtenidos en el ejemplo de Referencia 1, el ADNc de KLF5 de ratón y el ADNc de KLF5 de ser humano se alinearon en base a la homología de secuencia, según lo cual una secuencia humana que corresponde a una secuencia seleccionada en ratón. En la Tabla 2 se muestran las secuencias consistentes en 21 nucleótidos en el ADNc de KLF5 de ratón usadas como bases para el diseño y las posiciones de los mismos en la SEC ID N° 41, las secuencias consistentes en 21 nucleótidos en el ADNc humano correspondientes a las secuencias de ratón anteriores y las posiciones de los mismos en la SEC ID N° 42 y los SEC ID N° que indican secuencias de ARN obtenidas excluyendo AA del extremo 5' de las secuencias humanas anteriores. Dado que el ARNsi n° 5 y n° 6 se basaron en la secuencia de una región no codificadora, no se indicaron

las secuencias humanas correspondientes.

[Tabla 2]

ARNsi N°	ADNe de KLF5 de ratón		ADNe de KLF5 humano		
	Secuencia	Posición	Secuencia correspondiente	Posición	SEC ID N°
N° 2	AAATTTACCTGCCACTCTGCC	1156-1176	AAATTTACCCACCCCTGCC	1334-1354	12
N° 3	AAAGGAGTAACCCGGATCTGGA	1216-1236	AAGGAGTAACCCGATTTGGA	1394-1414	13
N° 4	AAAGCTCACCTGAGGACTCA	1303-1323	AAAGCTCACCTGAGGACTCA	1481-1501	4
N° 7	AAATGGAGAAATATCTGACCC	405-425	AAATGGAGAAATATCTGACAC	583-603	14
N° 8	AAAGTATAGACGAGACAGTGC	463-483	AAAGTATAGACGAGACAGTGC	641-661	8
N° 9	AAACCAAGACGGCAGTAATGGA	874-894	AAATCAGACAGCAATGGA	1040-1060	15
N° 10	AAAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	2048-2068	AAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	1226-1246	10
N° 11	AAGCCGTTCCAGTGCATGGTG	1424-1444	AAGCCCTTCCAGTGCAGGGTG	1602-1622	16

Ejemplo 1

- 5 DOTAP (fabricado por Avanti Polar Lipids Inc.), PEG-DSPE (fabricado por NOF Corporation, en lo sucesivo en el presente documento se aplicará lo mismo) y agua destilada se mezclaron de un modo tal que la proporción de DOTAP/PEG-DSPE/agua destinada fue de 30 mg/12 mg/ml, y la mezcla se agitó mediante agitación con un mezclador vorticial. La dispersión obtenida se pasó, a temperatura ambiente, a través de un filtro de membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 0,4 µm (fabricado por Whatman) 4 veces y a través de un filtro de membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 0,1 µm (fabricado por Whatman) 10 veces y, después, a través de un filtro de membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 0,05 µm (fabricado por Whatman) 24 veces, de modo que se prepararon las partículas principales. A 0,5 ml de la dispersión de partículas principales obtenida se añadieron 0,25 ml de una solución acuosa de 8 mg/ml de ARNsi N° 4 del Ejemplo de Referencia 1 o 2 y, después, se añadió 1 ml de etanol, de modo que se prepararon las partículas complejas. A la dispersión de partículas complejas obtenida se añadieron 0,25 ml de una solución en la que se disolvió EPC (fabricado por NOF Corporation) y PEG-DSPE, ambas eran los componentes constituyentes de la membrana lipídica) en etanol de modo que la proporción de EPC/PEG-DSPE/etanol fue 120 mg/25 mg/ml y, después, se añadieron gradualmente 23 ml de agua destilada para ajustar la concentración de etanol a 5 % vol o menos, de modo que se preparó el liposoma. La dispersión del

liposoma obtenida se sometió a ultracentrifugación (110.000 x g a 25 °C durante 1 hora) y se eliminó el sobrenadante. Se añadió una solución fisiológica salina para dispersar de nuevo el residuo, de modo que se obtuvo una dispersión de liposoma (una solución de PEG-DSPE etanol). 50 partes en peso de PEG-DSPE basado en 120 partes en peso de EPC se disolvieron en una cantidad pequeña (aproximadamente 1/25 del volumen de la dispersión de liposoma) de etanol. La dispersión de liposoma y la solución de PEG-DSPE etanol se calentaron por separado a 70 °C durante 2 minutos. Después, la dispersión de liposoma se añadió a la solución de PEG-DSPE etanol y se mezclaron. Después, la mezcla resultante se calentó a 70 °C durante 2 minutos y se enfrió con agua, de modo que se obtuvo una preparación. La preparación se preparó en 3 lotes.

Cuando se midieron los diámetros medios de partícula del liposoma mediante un procedimiento de dispersión de luz dinámico (modelo ELS-800, Otsuka Electronics Co., Ltd.), fueron de 102, 103 y 95 nm, respectivamente.

Ejemplo 2

A 0,5 ml de la dispersión de partículas principales obtenida del mismo modo que en el Ejemplo 1 se añadieron 0,25 ml de una solución acuosa de 8 mg/ml de cada ARNsi N° 1 a 3 y 5 a 16 del Ejemplo de Referencia 1 o 2 y, después, se añadió 1 ml de etanol, de modo que se obtuvieron partículas complejas de cada uno de ARNsi n° 1 a 3 y 5 a 16. La dispersión obtenida de las partículas complejas se sometió al mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, mediante el cual se obtuvo el liposoma que encapsula cada uno de los ARNsi n° 1 a 3 y 5 a 16. El liposoma obtenido se sometió al mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, mediante el cual se obtuvo una preparación de cada uno de los ARNsi n° 1 a 3 y 5 a 16.

Ejemplo comparativo 1

El ARNsi del Ejemplo 1 se alteró en ARNsi-KLF5 revuelto (hebra sentido: 5'-GGU ACA CAU GUG CAC ACA C - dTdT-3'; hebra antisentido: 5'-GUG UGU GCA CAU GUG UAC C-dTdT-3', Hokkaido System Science Co., Ltd.), y se obtuvo una preparación del mismo modo. La preparación se preparó en 3 o más lotes. Incidentalmente, el ARNsi-KLF5 revuelto es un ARN que no contiene una secuencia de ARNm-KLF5 y una secuencia complementaria a la secuencia.

Los diámetros medios de partícula del liposoma se midieron mediante un procedimiento de dispersión de luz dinámico (Zetasizer NanoZS, fabricado por Malvern Instruments). En un ejemplo fue de 88 nm.

Ejemplo comparativo 2

Disolviendo el ARNsi n° 4 (ARNsi-KLF5) del ejemplo de Referencia 1 o 2 en una solución fisiológica salina se preparó una solución acuosa de 0,5 mg/ml.

Ejemplo comparativo 3

Disolviendo el ARNsi de KLF 5 revuelto como en el ejemplo Comparativo 1 en una solución fisiológica salina se preparó una solución acuosa de 0,5 mg/ml.

Ejemplo de ensayo 1

En un ratón (ratón BL6J, macho de 5 semanas de edad) se administraron por vía subcutánea 1×10^6 células de carcinoma de pulmón de lewis LL/2 murinas (The Journal of Biological Chemistry", Vol. 278, pág.34598-34604, 2003) El LL/2 se vio afectado significativamente por la angiogénesis en términos de crecimiento, por tanto se usa en la detección selectiva de un inhibidor de la angiogénesis. Desde el momento en el que se inmovilizaron las células (de 1 a 2 días después de la administración subcutánea), la preparación obtenida en el Ejemplo 1 se administró a través de la cola de la vena en días consecutivos. La preparación administrada se diluyó antes con una solución salina tamponada con fosfato, para dar una concentración final del lípido total de 5 mg/ml y la dosis para el ratón se fijó en 150 µg/inyección/ratón/día en términos de ARNsi.

El volumen del tumor transplantado en el ratón se midió en el tiempo y se midió el crecimiento del tumor. Los resultados se muestran en la figura 1.

Además, se extirpó el tumor del ratón 10 días después de la administración y se observó angiogénesis alrededor de las células tumorales y, también se realizó inmunotinción con CD31 y tinción con hematoxilina-eosina mediante el procedimiento siguiente usando una sección de tejido alrededor del tumor y la observación se realizó con un microscopio.

Inmunotinción con CD31

Después de incluir en parafina el tumor fijado en metanol se preparó una sección con un espesor de 5 µm. Después de desparafinizar la sección se llevó a cabo el bloqueo a temperatura ambiente durante 10 minutos mediante la adición de 0,5 % de suero de cabra, Después de bloquear, se aspiró la solución, se añadió un anticuerpo anti-CD31 de ratón (dilución por 100) (fabricado por Pharmingen Co.) y la sección se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la sección con PBS, se añadió un anticuerpo Ig anti-rata conjugado con biotina

(dilución por 200) (fabricado por DAKO Inc.) y la sección se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar la sección con PBS, se añadió ABC-AP Kit AK-5000 (fabricado por Vector Laboratories Inc.) y la sección se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar la sección con PBS, se añadió Vector Red SK-5100 (fabricado por Vector Laboratories Inc.) y la sección se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, de modo que se permitió el desarrollo de un color. Después de lavar la sección con agua, se sometió a postinción con una solución de tinción con hematoxilina, seguido de deshidratación y, después, la observación se realizó con un microscopio.

Tinción con hematoxilina-eosina

Después de incluir en parafina el tumor fijado en metanol se preparó una sección con un espesor de 5 μm . Después de desparafinizar la sección, se lavó con agua corriente y, después, se pasó por agua destilada. Se añadió una solución de tinción con hematoxilina y la sección se dejó reposar durante 5 minutos. Después, la sección se lavó con agua y la separación se llevó a cabo mediante la adición de una solución al 0,5 % de ácido clorhídrico. La sección, se lavó con agua corriente durante 5 minutos para permitir el desarrollo de color y se pasó por agua destilada. Se añadió una solución de tinción con eosina y la sección se dejó reposar durante 3 minutos. La separación se llevó a cabo mediante la adición de etanol al 95 %, seguido de deshidratación y, después, la observación se realizó con un microscopio.

De acuerdo con la Fig. 1, en el grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 1, el crecimiento de las células cancerosas se suprimió en comparación con el grupo sin tratamiento. Además, en la observación de la periferia de las células tumorales 10 días después de la administración, en el grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 1, el tamaño del propio tumor fue menor que el del grupo sin tratamiento, y, además, se observó una extensa necrosis del área central del tumor. Además, en la observación microscópica de la sección de tejido tumoral sometida a tinción con hematoxilina-eosina e inmunotinción con CD31 en el grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 1, se observó una disminución de las células endoteliales vasculares observadas alrededor y en el interior del tumor, en comparación con el grupo sin tratamiento. Fue evidente que la angiogénesis se había suprimido en el grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 1.

Es decir, se ha puesto de manifiesto que suprimiendo el efecto antiangiogénesis y el crecimiento de las células tumorales, la composición de la presente invención se puede liberar con eficiencia en las proximidades de un tumor, por ejemplo en el caso en el que el ARNsi de KLF5 se administra por vía intravenosa a un mamífero y se puede suprimir la expresión del gen KLF.5

Ejemplo de ensayo 2

En un ratón (ratón C57BL/6jcl, macho de 6 semanas de edad, LEA JAPAN, INC.) se administraron por vía subcutánea 1×10^6 células de carcinoma de pulmón de lewis LL/2 murinas en el área axilar. Entre 2 y 8 días después de la inyección de las células tumorales se administró una preparación de 50 μg de ARNsi (Ejemplo 1 o Ejemplo Comparativo 1) de una solución de ARNsi que comprende 50 μg de ARNsi (Ejemplo Comparativo 2 o 3) o una solución fisiológica salina a través de la vena de la cola en días consecutivos.

El volumen del tumor transplantado en el ratón se midió en el tiempo. El volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: (eje mayor del tumor) X (eje menor)² X 1/2 y la diferencia significativa se analizó mediante el método de Tukey-kramer. Los resultados se muestran en la figura 2.

Además, se extirpó el tumor del ratón 10 días después de la administración y se observó angiogénesis alrededor de las células tumorales y, también se realizó inmunotinción con CD31 y tinción con hematoxilina-eosina mediante el procedimiento siguiente usando una sección de tejido alrededor del tumor se sometió a inmunotinción con CD31 mediante el procedimiento siguiente y se contaron las estructuras de CD31 observadas en la sección tisular. Se estudiaron dos campos visuales por un tumor y las estructuras se contaron para 5 tumores cada una y se mostró la media. La diferencia significativa se analizó mediante el método de Tukey-kramer. Los resultados se muestran en la figura 3.

Inmunotinción con CD31

El tumor se extirpó y se fijó en una solución al 95 % de metanol y después se incluyó en parafina. Después de cortar el tumor en láminas para obtener un espesor de 5 μm , se desparafinizó y, después, un anticuerpo policlonal anti-CD31 (fabricado por Pharmingen Co., USA) diluido a 100 se dejó actuar a temperatura ambiente durante 120 minutos. Después de lavar el anticuerpo anti-CD31, una IG anti-rata biotinilada (fabricado por DAKO Inc., USA) diluida a 200 se dejó actuar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de lavar, se dejó que el conjugado avidina-HRP (fabricado por Vector Laboratories Inc., USA) actuara a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar, se desarrolló un color con diaminobencina (fabricado por Sigma Co., USA).

De acuerdo con la Fig. 2, en el único grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 1 se observó un efecto significativo de supresión del crecimiento tumoral. Además, de acuerdo con la Figura 3, en el grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 1, el número de estructuras CD31 coloradas de marrón que

mostraban angiogénesis era pequeño y la angiogénesis del tumor se había inhibidor.

Ejemplo de ensayo 3

En un ratón (ratón C57BL/6jcl, macho de 6 semanas de edad, LEA JAPAN, INC.) se administraron por vía subcutánea 1×10^6 células de carcinoma de pulmón de lewis LL/2 murinas en el área axilar. Una preparación de 50 μg de ARNsi (Ejemplo 1 o Ejemplo Comparativo 1) de una solución de ARNsi que comprende 50 μg de ARNsi (Ejemplo Comparativo 2 o 3) o una solución fisiológica salina. 36 horas después de la administración se extirpó el tumor y el nivel de expresión de ARNm y el nivel de KLF5 se midieron mediante los procedimientos siguientes.

Medición del nivel de expresión de ARNm

Con el uso del kit RNeasy Fibrous tissue kit (fabricado por Qiagen Inc.), las células tumorales extirpadas se disolvieron usando bolas de circonio y un molino mezclador (MM300, Qiagen), se llevó a cabo la purificación, según lo cual se obtuvo ANR. Con el uso del kit SuperScript First-Strand Synthesis Kit (fabricado por Invitrogen Inc., USA), el ADNc se obtuvo mediante transcripción inversa usando un cebador aleatorio de 1 μg del ARN resultante. El ADNc resultante se amplificó usando Hot Star Taq™ (fabricado por Qiagen Inc.) y cebadores específicos. En este momento se usó un cebador de ARN 18S ribosómico como patrón interno. Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo del siguiente modo: 95 °C durante 15 minutos y 45 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes: 5' - GGTTGCACAAAAGTTTATAC-3', y 5'-GGCTTGGCGCCTGTGTGCTTCC-3'. El nivel de expresión del ARNm se determinó usando ABI PRISM™ 7900HT (fabricado por Applied Biosystems Inc., USA) y QuantiTect SYBR Green PCR kit (fabricado por Qiagen Inc.). La estandarización se llevó a cabo usando el cebador de ARN ribosómico 18S QuantumRNA™ Classic (fabricado por Ambion Inc., USA) como patrón interno. La diferencia significativa se analizó mediante el método de Tukey-kramer. Los resultados se muestran en la figura 4.

Medición del nivel de KLF5

Las células tumorales extirpadas se empaparon en una cantidad adecuada de una solución de disolución (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 7,5, 0,1% Nonidet P-40, 0 laurilsulfato sódico, desoxicolato sódico al 0,5%, DTT 0,1 mmol/l, un inhibidor de proteasa) y se disolvieron usando bolas de circonio y un molino mezclador (MM300, Qiagen), y se obtuvo un sobrenadante centrifugado. El nivel proteico se midió usando el reactivo de ensayo de proteína Dc (Bio-Rad, USA). 10 μg de la proteína se sometieron a tratamiento térmico a 95 °C durante 15 minutos y después a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. La proteína sometida a electroforesis se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (fabricada por Amersham Inc. USA), y se llevó a cabo un tratamiento de bloqueo (en leche sin grasa al 5 % en agitación). Después, la membrana se trató en una dilución por 1.000 de un anticuerpo monoclonal anti-KLF5 (fabricado por Kyowa Hakko Kogyo K.K.) durante 1 hora en agitación. Después de lavar la membrana, se trató con una solución por 2.000 de IgG anti-rata marcada con HRP (fabricado por Amersham Inc.). Después de lavar se dejó desarrollar un color usando un agente colorante de fluorescencia (ECLplus, fabricado por Amersham Inc.), y la banda de la transferencia Western se determinó usando un software de análisis de imágenes (Image Quant, fabricado por Amersham Inc.). Un grupo estaba compuesto por 3 ratones y solo el grupo al que se administró ARNsi de KLF5 estaba compuesto por 5 ratones y se llevó a cabo la determinación. La diferencia significativa se analizó mediante el método de Tukey-kramer. Los resultados se muestran en la figura 5.

De acuerdo con la Fig. 4, en el único grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 1 se observó un supresión de la producción de ARNm-KLF5. De acuerdo con la Fig. 5, en el único grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 1 se observó un supresión de la producción de KLF5.

Ejemplo de prueba de referencia 1

En un ratón (ratón C57BL/6jcl, macho de 5 a 6 semanas de edad) se administraron por vía subcutánea 1×10^6 células de carcinoma de pulmón de lewis LL/2 murinas en el área axilar. Entre 2 y 8 días después de la inyección de las células tumorales se administró una solución de ARNsi 1 μg de ARNsi (Ejemplo comparativo 2 y 3) o una solución fisiológica salina se administró directamente en el tumor en días consecutivos.

El volumen del tumor transplantado en el ratón se midió en el tiempo. El volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: (eje mayor del tumor) X (eje menor)² X 1/2 y la diferencia significativa se analizó mediante el método de Tukey-kramer. Los resultados se muestran en la figura 6.

De acuerdo con la Fig. 6, se observó una tendencia a suprimir el crecimiento del tumor en el grupo al que se administró la solución de ARNsi de KLF5 obtenida en el Ejemplo Comparativo 1, no obstante no se observó una diferencia significativa.

Además, se extirpó el tumor del ratón 10 días después de la administración y una sección de tejido alrededor del tumor se sometió a inmunotinción CD31 del mismo modo que en el ejemplo 2 de prueba y se llevó a cabo observación. En ningún grupo se observó una diferencia evidente en CD31 que muestran angiogénesis.

Ejemplo 3

El ARNsi del Ejemplo 1 se alteró en ARNsi- bcl2 (hebra sentido: 5'-GUGAAGUCAACAUGCCUGC-dTdT3'; hebras antisentido: 5'-GCAGGCAUGUUGACUUCAC-dTdT-3', Dharmacon Inc. o Hokkaido System Science Co., Ltd.), y se obtuvo una preparación del mismo modo. La preparación se preparó en 3 o más lotes.

5 Los diámetros medios de partícula del liposoma se midieron mediante un procedimiento de dispersión de luz dinámico (Zetasizer NanoZS, fabricado por Malvern Instruments). En un ejemplo fue de 110 nm.

Ejemplo comparativo 4

10 El ARNsi del Ejemplo 1 se alteró en ARNsi- GL3 (hebra sentido: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA-dTdT3'; hebra antisentido: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAG-dTdT-3', Dharmacon Inc. o Hokkaido System Science Co., Ltd.), y se obtuvo una preparación del mismo modo. La preparación se preparó en 3 o más lotes. Incidentalmente, el ARNsi-GL3 es un ARN que no contiene una secuencia de ARNm- bcl2 y una secuencia complementaria a la secuencia.

Los diámetros medios de partícula del liposoma se midieron mediante un procedimiento de dispersión de luz dinámico (Zetasizer NanoZS, fabricado por Malvern Instruments). En un ejemplo fue de 99 nm.

Ejemplo comparativo 5

15 Disolviendo el mismo ARNsi de bcl2 como en el Ejemplo 3 en una solución fisiológica salina se preparó una solución acuosa de 0,5 mg/ml.

Ejemplo de ensayo 4

20 En un ratón atímico (ratón BALB/cAJcl-nu, macho de 5 semanas de edad, CLEA Japan, Inc.) se administraron por vía subcutánea 1×10^7 células de carcinoma de próstata humano. El volumen del tumor se midió 17 días después de la administración subcutánea y un ratón atímico en el que el volumen del tumor había alcanzado de 150 a 350 mm³. Después, al ratón seleccionado se administró una preparación obtenida en el ejemplo 3, a través de la vena de la cola. La administración se llevó a cabo durante 5 días consecutivos, seguido de un periodo de recuperación de 2 días y, después, se llevó a cabo la administración durante 5 días consecutivos.

La preparación administrada se diluyó antes con una solución salina fisiológica salina, para dar una concentración final del ARNsi de 0,75 mg/ml y la dosis para el ratón se fijó en 150 µg/inyección/ratón/día en términos de ARNsi.

25 El volumen del tumor transplantado en el ratón se midió en el tiempo y se midió el crecimiento del tumor.

Los resultados se muestran en la figura 7.

De acuerdo con la Fig. 7, en el grupo en el que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 3, el crecimiento de las células tumorales se suprimió en comparación con el grupo sin tratamiento.

Ejemplo de ensayo 5

30 En un ratón atímico (ratón BALB/cAJcl-nu, macho de 6 semanas de edad, CLEA Japan, Inc.) se administraron por vía subcutánea 1×10^6 células de carcinoma de próstata humano PC-3 (Nº ATCC CRL-1435). El volumen del tumor se midió 6 días después de la administración subcutánea y se seleccionó un ratón atímico en el que se el volumen del tumor había alcanzado de 80 a 120 mm³. Después, al ratón seleccionado se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 3, Ejemplo Comparativo 4 o 5 a través de la vena de la cola. La administración se llevó a cabo durante 5 días consecutivos, seguido de un periodo de recuperación de 2 días y, después, se llevó a cabo la administración durante 5 días consecutivos. La preparación administrada se diluyó antes con una solución salina fisiológica salina, para dar una concentración final del ARNsi de 0,75 mg/ml y la dosis para el ratón se fijó en 150 µg/inyección/ratón/día en términos de ARNsi. El volumen del tumor transplantado en el ratón se midió en el tiempo y se midió el crecimiento del tumor. Los resultados se muestran en la figura 8.

40 De acuerdo con la Fig. 8, en el grupo al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo 3, el crecimiento de las células tumorales se suprimió en comparación con el grupo sin tratamiento al que se administró la preparación obtenida en el Ejemplo Comparativo 4 y la solución obtenida en el ejemplo Comparativo 5.

Aplicabilidad industrial

45 Administrando la composición de la presente invención que comprende un liposoma que encapsula un ARN que comprende una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de un ARNm del gen diana y una secuencia complementaria a la secuencia de un mamífero o similar, la expresión del gen diana se puede suprimir.

[LISTADO DE SECUENCIAS TEXTO LIBRE]

SEC ID Nº 1, Inventores: YAMAUCHI MASAHIRO; TOTTORI TSUNEAKI; ISHIHARA ATSUSHI; YAGI NOBUHIRO; KATO YASUKI

50 SEC ID Nº 17 ARNsi Nº 1 hebra sentido

- SEC ID Nº 18 ARNsi Nº 1 hebra antisentido
- SEC ID Nº 19 ARNsi Nº 2 hebra sentido
- SEC ID Nº 20 ARNsi Nº 2 hebra antisentido
- SEC ID Nº 21 ARNsi Nº 3 hebra sentido
- 5 SEC ID Nº 22 ARNsi Nº 3 hebra antisentido
- SEC ID Nº 23 ARNsi Nº 4 hebra sentido
- SEC ID Nº 24 ARNsi Nº 4 hebra antisentido
- SEC ID Nº 25 ARNsi Nº 5 hebra sentido
- SEC ID Nº 26 ARNsi Nº 5 hebra antisentido
- 10 SEC ID Nº 27 ARNsi Nº 6 hebra sentido
- SEC ID Nº 28 ARNsi Nº 6 hebra antisentido
- SEC ID Nº 29 ARNsi Nº 7 hebra sentido
- SEC ID Nº 30 ARNsi Nº 7 hebra antisentido
- SEC ID Nº 31 ARNsi Nº 8 hebra sentido
- 15 SEC ID Nº 32 ARNsi Nº 8 hebra antisentido
- SEC ID Nº 33 ARNsi Nº 9 hebra sentido
- SEC ID Nº 34 ARNsi Nº 9 hebra antisentido
- SEC ID Nº 35 ARNsi Nº 10 hebra sentido
- SEC ID Nº 36 ARNsi Nº 10 hebra antisentido
- 20 SEC ID Nº 37 ARNsi Nº 11 hebra sentido
- SEC ID Nº 38 ARNsi Nº 11 hebra antisentido
- SEC ID Nº 39 SEAP ARNsi hebra sentido
- SEC ID Nº 40 SEAP ARNsi hebra antisentido

[LISTADO DE SECUENCIAS]

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> Preparación que inhibe la expresión génica

5 <130> 1743

<160> 42

<170> PatentIn versión 3,1

10

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Mus musculus

15

<220>

<223> Inventor: Yamauchi, Masahiro; Tottori, Tsuneaki; Ishihara, Atsushi; Yagi, Nobuhiro; Kato, Yasuki

<400> 1

20

caugaacguc uuccucccu 19

<210> 2

<211> 19

<212> ARN

25

<213> Mus musculus

<400> 2

auuuaccugc cacucugcc 19

30

<210> 3

<211> 19

<212> ARN

<213> Mus musculus

35

<400> 3

ggaguaaccc ggaucugga 19

<210> 4

<211> 19

40

<212> ARN

<213> Mus musculus

<400> 4

ES 2 386 549 T3

	aagcucaccu gaggacuca	19
	<210> 5	
	<211> 19	
5	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 5	
	ucccagacc guccaugcc	19
10	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
15	<400> 6	
	cgcugcgccc acccgccug	19
	<210> 7	
	<211> 19	
20	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 7	
	auggagaagu aucugaccc	19
25	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
30	<400> 8 j	
	aguauagacg agacagugc	19
	<210> 9	
	<211> 19	
35	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 9	
	accagacggc aguaaugga	19
40	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> ARN	

<213> Mus musculus

 <400> 10
 gcucagagcc uggaagucc 19
 5
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Mus musculus
 10
 <400> 11
 gccguuccag ugcauggug 19

 <210> 12
 15 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 20 auuuaccac caccugcc 19

 <210> 13
 <211> 19
 <212> ARN
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 ggaguaaccc cgauuugga 19

 30 <210> 14
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 35 <400> 14
 auggagaagu aucugacac 19

 <210> 15
 <211> 19
 40 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 15

aucagacagc agcaaugga 19

 <210> 16
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 gcccuuccag ugcggggug 19
 10
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> ARNsi N° 1 hebra sentido

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (20) .. (21)
 <223> ADN

 <400> 17
 25 caugaacguc uuccuccut t 21

 <210> 18
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNsi N° 1 hebra antisentido

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20) .. (21)
 <223> ADN

 40 <400> 18
 agggaggaag acguucaugt t 21

 <210> 19

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

5 <220>
 <223> ARNsi N° 2 hebra sentido

<400> 19
 auuuaccugc cacucugccu u 21

10 <210> 20
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ARNsi N° 2 hebra antisentido

<400> 20
 20 ggcagagugg cagguaaaau u 21

<210> 21
 <211> 21
 <212> ARN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNsi N° 3 hebra sentido

30 <400> 21
 ggaguaaccc ggaucuggau u 21

<210> 22
 <211> 21
 35 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNsi N° 3 hebra antisentido

40 <400> 22
 uccagauccg gguuacuccu u 21

	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> ARNsi N° 4 hebra sentido	
	<400> 23	
10	aagcucaccu gaggacucau u	21
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Artificial <220>	
	<223> ARNsi N° 4 hebra antisentido	
	<400> 24	
20	ugaguccuca ggugagcuuu u	21
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> ARN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNsi N° 5 hebra sentido	
30	<400> 25	
	uccccagacc guccaugccu u	21
	<210> 26	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNsi N° 5 hebra antisentido	
40	<400> 26	
	ggcauggacg gucugggggu u	21

- <210> 31
 <211> 21
 <212> ARN
 5 <213> Artificial
- <220>
 <223> ARNsi Nº 8 hebra sentido
- 10 <400> 31
 aguauagacg agacagugcu u 21
- <210> 32
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Artificial
- <220>
 <223> ARNsi Nº 8 hebra antisentido
- 20 <400> 32
 gcacugucuc gucuauacuu u 21
- <210> 33
 25 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
- <220>
 30 <223> ARNsi Nº 9 hebra sentido
- <400> 33
 accagacggc aguaauggau u 21
- 35 <210> 34
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> ARNsi Nº 9 hebra antisentido
- <400> 34

	uccauuacug ccgucuggcu u	21
	<210> 35	
	<211> 21	
5	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNsi Nº 10 hebra sentido	
10		
	<400> 35	
	gcucagagcc uggaaguccu u	21
	<210> 36	
15	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> ARNsi Nº 10 hebra antisentido	
	<400> 36	
	ggacuuccag gcucugagcu u	21
25	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> ARNsi Nº 11 hebra sentido	
	<400> 37	
	gccguuccag ugcauggugu u	21
35		
	<210> 38	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
40		
	<220>	
	<223> ARNsi Nº 11 hebra antisentido	

	<400> 38		
	caccaugcac uggaacggcu u	21	
	<210> 39		
5	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> SEAP-ARNsi hebra sentido		
	<400> 39		
	agggcaacuu ccagaccuu u	21	
15	<210> 40		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> SEAP-ARNsi hebra antisentido		
	<400> 40		
	auggucugga aguugccuu u	21	
25	<210> 41		
	<211> 1591		
	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
30	<220>		
	<221> CDS		
	<222> (167)..(1507)		
	<223>		
35	<400> 41		

ES 2 386 549 T3

ccgagcccag gagccccgat ctccgtgccc gccttcgtga gcgtctggct gccggcccag	60
gggtcccccg ccgcggcccc ccgccgagtc cgcctccccg tgccagcccc agcgaggtgg	120
gatcgcgata gctccgtgtc ccgctcccgt aatccccaga ccgtcc atg ccc acg	175
	Met Pro Thr
	1
cgg gtg ctg acc atg agc gcc cgc ctg gga cca ctg ccc cag ccg ccg	223
Arg Val Leu Thr Met Ser Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro Gln Pro Pro	
5 10 15	
gcc gcg cag gcc gag ccc gtg ttc gcg cag ctc aag ccg gtg ctg ggc	271
Ala Ala Gln Ala Glu Pro Val Phe Ala Gln Leu Lys Pro Val Leu Gly	
20 25 30 35	
gct gcg aac ccg gcc cgc gac gcg gcg ctc ttc tcc gga gac gat ctg	319
Ala Ala Asn Pro Ala Arg Asp Ala Ala Leu Phe Ser Gly Asp Asp Leu	
40 45 50	

ES 2 386 549 T3

aaa cac gcg cac cac cac ccg cct gcg ccg ccg cca gcc gct ggc ccg	367
Lys His Ala His His His Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Gly Pro	
55 60 65	
cga ctg ccc tcg gag gag ctg gtc cag aca aga tgt gaa atg gag aag	415
Arg Leu Pro Ser Glu Glu Leu Val Gln Thr Arg Cys Glu Met Glu Lys	
70 75 80	
tat ctg acc cct cag ctc cct cca gtt ccg ata att tca gag cat aaa	463
Tyr Leu Thr Pro Gln Leu Pro Pro Val Pro Ile Ile Ser Glu His Lys	
85 90 95	
aag tat aga cga gac agt gcc tca gtg gta gac cag ttc ttc act gac	511
Lys Tyr Arg Arg Asp Ser Ala Ser Val Val Asp Gln Phe Phe Thr Asp	
100 105 110 115	
act gaa ggc ata cct tac agc atc aac atg aac gtc ttc ctc cct gac	559
Thr Glu Gly Ile Pro Tyr Ser Ile Asn Met Asn Val Phe Leu Pro Asp	
120 125 130	
atc act cac ctg aga act ggc ctc tac aaa tcc cag aga cca tgc gta	607
Ile Thr His Leu Arg Thr Gly Leu Tyr Lys Ser Gln Arg Pro Cys Val	
135 140 145	
aca cag atc aag aca gaa cct gtt acc att ttc agc cac cag agc gag	655
Thr Gln Ile Lys Thr Glu Pro Val Thr Ile Phe Ser His Gln Ser Glu	
150 155 160	
tcg acg gcc cct cct cct cct ccg gcc ccc acc cag gct ctc ccc gag	703
Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Thr Gln Ala Leu Pro Glu	
165 170 175	
ttc act agt atc ttc agc tcc cac cag acc aca gcg cca cca cag gag	751
Phe Thr Ser Ile Phe Ser Ser His Gln Thr Thr Ala Pro Pro Gln Glu	
180 185 190 195	
gtg aac aat atc ttc atc aaa caa gaa ctt cct ata cca gat ctt cat	799
Val Asn Asn Ile Phe Ile Lys Gln Glu Leu Pro Ile Pro Asp Leu His	
200 205 210	
ctc tct gtc cct tcc cag cag ggc cac ctg tac cag ctg ttg aat aca	847
Leu Ser Val Pro Ser Gln Gln Gly His Leu Tyr Gln Leu Leu Asn Thr	
215 220 225	
ccg gat cta gac atg ccc agt tcg aca aac cag acg gca gta atg gac	895
Pro Asp Leu Asp Met Pro Ser Ser Thr Asn Gln Thr Ala Val Met Asp	
230 235 240	
acc ctt aat gtt tct atg gca ggc ctt aac cca cac ccc tct gct gtt	943
Thr Leu Asn Val Ser Met Ala Gly Leu Asn Pro His Pro Ser Ala Val	
245 250 255	
cca cag acg tca atg aaa cag ttc cag ggc atg ccc cct tgc acg tac	991
Pro Gln Thr Ser Met Lys Gln Phe Gln Gly Met Pro Pro Cys Thr Tyr	
260 265 270 275	
acc atg cca agt cag ttt ctt cca cag cag gcc act tat ttt ccc ccg	1039
Thr Met Pro Ser Gln Phe Leu Pro Gln Gln Ala Thr Tyr Phe Pro Pro	
280 285 290	

ES 2 386 549 T3

tca cca cca agc tca gag cct gga agt ccc gat aga caa gct gag atg	1087
Ser Pro Pro Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Asp Arg Gln Ala Glu Met	
295 300 305	
ctg cag aat ctc acc cca cct ccg tcc tat gcc gct aca att gct tcc	1135
Leu Gln Asn Leu Thr Pro Pro Pro Ser Tyr Ala Ala Thr Ile Ala Ser	
310 315 320	
aaa ctg gcg att cac aac cca aat tta cct gcc act ctg cca gtt aat	1183
Lys Leu Ala Ile His Asn Pro Asn Leu Pro Ala Thr Leu Pro Val Asn	
325 330 335	
tcg cca act ctc cca cct gtc aga tac aac aga agg agt aac ccg gat	1231
Ser Pro Thr Leu Pro Pro Val Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Asn Pro Asp	
340 345 350 355	
ctg gag aag cga cgt atc cac ttc tgc gat tat aat ggt tgc aca aaa	1279
Leu Glu Lys Arg Arg Ile His Phe Cys Asp Tyr Asn Gly Cys Thr Lys	
360 365 370	
gtt tat aca aag tcg tct cac tta aaa gct cac ctg agg act cat acg	1327
Val Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr	
375 380 385	
ggc gag aag ccc tac aag tgc acc tgg gag ggc tgc gac tgg agg ttt	1375
Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Thr Trp Glu Gly Cys Asp Trp Arg Phe	
390 395 400	
gcc cgg tcg gat gag ctg acc cgc cac tac agg aag cac acg ggc gcc	1423
Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly Ala	
405 410 415	
aag ccg ttc cag tgc atg gtg tgc caa cgc agc ttc tcc cgc tcc gac	1471
Lys Pro Phe Gln Cys Met Val Cys Gln Arg Ser Phe Ser Arg Ser Asp	
420 425 430 435	
cac ctc gcg ctg cac atg aag cgc cac cag aac tga gcgagcgaac	1517
His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Gln Asn	
440 445	
gctgcgcccc cccgcctgac gccttgagc cgcctttgcc atcctttaa cgcagacct	1577
aacttcataa aaag	1591

ES 2 386 549 T3

<210> 42

<211> 3359

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> CDS

<222> (312)..(1685)

10 <400> 42

```
ggtagctgag ctccggttc tctcgggag gtcggcggg gcgggagcgg gctccggaga    60
gcctgagagc acggtggggc ggggaggag aaagtggccg cccggaggac gttggcgttt    120
acgtgtggaa gagcggaaga gttttgcttt tcgtgcgcgc cttcgaaaac tgctgcccgc    180
```

ES 2 386 549 T3

tgtctgagga gtccaccgga aacctcccct cctccgccgg cagccccgcg ctgagctcgc	240
cgaccaagc cagcgtgggc gaggtgggaa gtgcgcccga cccgcgcctg gagctgcgcc	300
cccgagtgcc c atg gct aca agg gtg ctg agc atg agc gcc cgc ctg gga	350
Met Ala Thr Arg Val Leu Ser Met Ser Ala Arg Leu Gly	
1 5 10	
ccc gtg ccc cag ccg ccg gcg ccg cag gac gag ccg gtg ttc gcg cag	398
Pro Val Pro Gln Pro Pro Ala Pro Gln Asp Glu Pro Val Phe Ala Gln	
15 20 25	
ctc aag ccg gtg ctg ggc gcc gcg aat ccg gcc cgc gac gcg gcg ctc	446
Leu Lys Pro Val Leu Gly Ala Ala Asn Pro Ala Arg Asp Ala Ala Leu	
30 35 40 45	
ttc ccc ggc gag gag ctg aag cac gcg cac cac cgc ccg cag gcg cag	494
Phe Pro Gly Glu Glu Leu Lys His Ala His His Arg Pro Gln Ala Gln	
50 55 60	
ccc gcg ccc gcg cag gcc ccg cag ccg gcc cag ccg ccc gcc acc ggc	542
Pro Ala Pro Ala Gln Ala Pro Gln Pro Ala Gln Pro Pro Ala Thr Gly	
65 70 75	
ccg ccg ctg cct cca gag gac ctg gtc cag aca aga tgt gaa atg gag	590
Pro Arg Leu Pro Pro Glu Asp Leu Val Gln Thr Arg Cys Glu Met Glu	
80 85 90	
aag tat ctg aca cct cag ctt cct cca gtt cct ata att cca gag cat	638
Lys Tyr Leu Thr Pro Gln Leu Pro Pro Val Pro Ile Ile Pro Glu His	
95 100 105	
aaa aag tat aga cga gac agt gcc tca gtc gta gac cag ttc ttc act	686
Lys Lys Tyr Arg Arg Asp Ser Ala Ser Val Val Asp Gln Phe Phe Thr	
110 115 120 125	
gac act gaa ggg tta cct tac agt atc aac atg aac gtc ttc ctc cct	734
Asp Thr Glu Gly Leu Pro Tyr Ser Ile Asn Met Asn Val Phe Leu Pro	
130 135 140	
gac atc act cac ctg aga act ggc ctc tac aaa tcc cag aga ccg tgc	782
Asp Ile Thr His Leu Arg Thr Gly Leu Tyr Lys Ser Gln Arg Pro Cys	
145 150 155	
gta aca cac atc aag aca gaa cct gtt gcc att ttc agc cac cag agt	830
Val Thr His Ile Lys Thr Glu Pro Val Ala Ile Phe Ser His Gln Ser	
160 165 170	
gaa acg act gcc cct cct ccg gcc ccg acc cag gcc ctc cct gag ttc	878
Glu Thr Thr Ala Pro Pro Pro Ala Pro Thr Gln Ala Leu Pro Glu Phe	
175 180 185	
acc agt ata ttc agc tca cac cag acc gca gct cca gag gtg aac aat	926
Thr Ser Ile Phe Ser Ser His Gln Thr Ala Ala Pro Glu Val Asn Asn	
190 195 200 205	
att ttc atc aaa caa gaa ctt cct aca cca gat ctt cat ctt tct gtc	974
Ile Phe Ile Lys Gln Glu Leu Pro Thr Pro Asp Leu His Leu Ser Val	
210 215 220	
cct acc cag cag ggc cac ctg tac cag cta ctg aat aca ccg gat cta	1022

ES 2 386 549 T3

Pro	Thr	Gln	Gln	Gly	His	Leu	Tyr	Gln	Leu	Leu	Asn	Thr	Pro	Asp	Leu	
			225					230					235			
gat	atg	ccc	agt	tct	aca	aat	cag	aca	gca	gca	atg	gac	act	ctt	aat	1070
Asp	Met	Pro	Ser	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ala	Ala	Met	Asp	Thr	Leu	Asn	
		240					245					250				
gtt	tct	atg	tca	gct	gcc	atg	gca	ggc	ctt	aac	aca	cac	acc	tct	gct	1118
Val	Ser	Met	Ser	Ala	Ala	Met	Ala	Gly	Leu	Asn	Thr	His	Thr	Ser	Ala	
	255					260					265					
gtt	ccg	cag	act	gca	gtg	aaa	caa	ttc	cag	ggc	atg	ccc	cct	tgc	aca	1166
Val	Pro	Gln	Thr	Ala	Val	Lys	Gln	Phe	Gln	Gly	Met	Pro	Pro	Cys	Thr	
270					275					280				285		
tac	aca	atg	cca	agt	cag	ttt	ctt	cca	caa	cag	gcc	act	tac	ttt	ccc	1214
Tyr	Thr	Met	Pro	Ser	Gln	Phe	Leu	Pro	Gln	Gln	Ala	Thr	Tyr	Phe	Pro	
				290					295					300		
ccg	tca	cca	cca	agc	tca	gag	cct	gga	agt	cca	gat	aga	caa	gca	gag	1262
Pro	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Pro	Gly	Ser	Pro	Asp	Arg	Gln	Ala	Glu	
			305					310					315			
atg	ctc	cag	aat	tta	acc	cca	cct	cca	tcc	tat	gct	gct	aca	att	gct	1310
Met	Leu	Gln	Asn	Leu	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ile	Ala	
		320					325					330				
tct	aaa	ctg	gca	att	cac	aat	cca	aat	tta	ccc	acc	acc	ctg	cca	gtt	1358
Ser	Lys	Leu	Ala	Ile	His	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Thr	Thr	Leu	Pro	Val	
	335					340					345					
aac	tca	caa	aac	atc	caa	cct	gtc	aga	tac	aat	aga	agg	agt	aac	ccc	1406
Asn	Ser	Gln	Asn	Ile	Gln	Pro	Val	Arg	Tyr	Asn	Arg	Arg	Ser	Asn	Pro	
350					355					360				365		
gat	ttg	gag	aaa	cga	cgc	atc	cac	tac	tgc	gat	tac	cct	ggt	tgc	aca	1454
Asp	Leu	Glu	Lys	Arg	Arg	Ile	His	Tyr	Cys	Asp	Tyr	Pro	Gly	Cys	Thr	
				370					375					380		
aaa	gtt	tat	acc	aag	tct	tct	cat	tta	aaa	gct	cac	ctg	agg	act	cac	1502
Lys	Val	Tyr	Thr	Lys	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Ala	His	Leu	Arg	Thr	His	
			385					390					395			
act	ggt	gaa	aag	cca	tac	aag	tgt	acc	tgg	gaa	ggc	tgc	gac	tgg	agg	1550
Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Lys	Cys	Thr	Trp	Glu	Gly	Cys	Asp	Trp	Arg	
		400					405					410				
ttc	gcg	cga	tcg	gat	gag	ctg	acc	cgc	cac	tac	cgg	aag	cac	aca	ggc	1598
Phe	Ala	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Thr	Arg	His	Tyr	Arg	Lys	His	Thr	Gly	
	415					420					425					
gcc	aag	ccc	ttc	cag	tgc	ggg	gtg	tgc	aac	cgc	agc	ttc	tcg	cgc	tct	1646
Ala	Lys	Pro	Phe	Gln	Cys	Gly	Val	Cys	Asn	Arg	Ser	Phe	Ser	Arg	Ser	
430					435					440				445		
gac	cac	ctg	gcc	ctg	cat	atg	aag	agg	cac	cag	aac	tga	gca	ctg	ccccg	1695
Asp	His	Leu	Ala	Leu	His	Met	Lys	Arg	His	Gln	Asn					
				450					455							
tgtgacc	cggt	tcaggt	cccc	ctggg	ctccc	tcaaat	gaca	gaccta	acta	ttcct	gtgta					1755

ES 2 386 549 T3

aaaacaacaa aaacaaaaaa aaaacaagaa aaccacaact aaaactggaa atgtatattt 1815
 tgtatatttg agaaaacagg gaatacattg tattaatacc aaagtgtttg gtcattttaa 1875
 gaatctggaa tgcttgctgt aatgtatatg gctttactca agcagatctc atctcatctc 1935
 atgacaggca gccagtctca acatgggtaa ggggtggggg tgaaggggag tgtgtgcagc 1995
 gtttttacct aggcaccatc atttaatgtg acagtgttca gtaaacaat cagttggcag 2055
 gcaccagaag aagaatggat tgtatgtcaa gattttactt ggcattgagt agtttttttc 2115
 aatagtaggt aattccttag agatacagta tacctggcaa ttcacaaata gccattgaac 2175
 aaatgtgtgg gtttttaaaa attatataca tatatgagtt gcctatattt gctattcaaa 2235
 attttgtaaa tatgcaaatc agctttatag gtttattaca agtttttttag gattcctttg 2295
 gggagagtc ataattcttt tgaaaataac catgaataca cttacagtta ggatttgtgg 2355
 taaggtacct ctcaacatta ccaaaatcat ttctttagag ggaaggaata atcattcaaa 2415
 tgaactttaa aaaagcaaat ttcatgcact gattaaata ggattatttt aaatacaaaa 2475
 ggcattttat atgaattata aactgaagag cttaaagata gttacaaaat acaaaagttc 2535
 aacctcttac aataagctaa acgcaatgtc atttttaaaa agaaggactt aggggtcgtt 2595
 ttcacatatg acaatgttgc atttatgatg cagttttcaa gtacccaaac gttgaattga 2655
 tgatgcagtt ttcatatatc gagatgttcg ctctgtcagc actggttggtt aatgacaat 2715
 ttatgtggat tttgcatgta atacacagtg agacacagta attttatcta aattacagtg 2775
 cagtttagtt aatctattaa tactgactca gtgtctgcct ttaaataata atgatatgtt 2835
 gaaaacttaa ggaagcaaat gctacatata tgcaatataa aatagtaatg tgatgctgat 2895
 gctgttaacc aaagggcaga ataaataagc aaaatgcaa aaggggtcct aattgaaatg 2955
 aaaatttaat tttgttttta aaatattggt tatctttatt tattttgtgg taatatagta 3015
 agttttttta gaagacaatt ttcataactt gataaattat agttttggtt gttagaaaag 3075
 ttgctcttaa aagatgtaaa tagatgacaa acgatgtaaa taattttgta agaggcttca 3135
 aaatgtttat acgtggaac acacctacat gaaaagcaga aatcggttgc tgttttgctt 3195
 ctttttccct cttatttttg tattgtggtc atttcctatg caaataatgg agcaaacagc 3255
 tgtatagttg tagaattttt tgagagaatg agatgtttat atattaacga caattttttt 3315
 tttggaaaat aaaaagtgcc taaaagaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3359

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un liposoma con ARN encapsulado, en el que el ARN comprende una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de un ARNm del gen diana y una secuencia complementaria a la secuencia, y el ARN tiene una acción de supresión de la expresión del gen diana que usa el ARN de interferencia (ANRi), y el liposoma comprende:
 - partículas complejas que comprenden como componentes constituyentes:
 - (i) una partícula principal que comprende un lípido catiónico y
 - (ii) el ARN, y
 - una membrana lipídica para recubrimiento de las partículas complejas y la membrana lipídica contiene, como componentes constituyentes, un lípido neutro y un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático, de una sustancia hidrosoluble,

en la que el derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en un lípido de polietileno glicolado, un éster de ácido graso de polietilenglicolsorbitano, un éster de ácido graso de polietilenglicol, un lípido poliglicerolado y un éster de ácido graso de poliglicerol, en el que el liposoma es capaz de alcanzar un tejido o un órgano que incluye un sitio de expresión del gen diana y tiene un tamaño que permite la administración intravenosa.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gen diana es un gen asociado con un tumor o una inflamación.
3. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el gen diana es un gen asociado con la angiogénesis.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ARNm es ARNm de KLF5.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ARNm es ARNm de KLF5 de ser humano o de ratón.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en la que el ARN es un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de ARNm de KLF5 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que los 1 a 6 nucleótidos, que son iguales o diferentes, se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras del mismo modo o de un modo diferente.
7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en la que el ARN es un ARN que tiene una estructura en horquilla y en la que un ARN que tiene una secuencia que consiste en de 15 a 30 nucleótidos contiguos de ARNm de KLF5 está unido a un ARN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia mediante un oligonucleótido espaciador, y de 1 a 6 nucleótidos, que son iguales o diferentes, se añaden al extremo 3' del mismo.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en la que el ARN es un ARN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):
 - (a) un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia mostrada en una cualquiera de los números de ID de SEC: 2 a 16 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que de 2 a 4 miembros, que son iguales o diferentes, seleccionada de ácidos uridílicos y ácidos desoxitimidílicos, se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras de un modo igual o diferente;
 - (b) un ARN que tiene una estructura en horquilla y en el que un ARN que tiene una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de SEC ID: 2 a 16 está ligado a un ARN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia a través de un oligonucleótido espaciador que tiene 2 ácidos uridílicos o ácidos desoxitimidílicos en el extremo 5' de la misma y de 2 a 4 miembros, que son iguales o diferentes, seleccionados de ácidos uridílicos y ácidos desoxitimidílicos se añaden al extremo 3' de la misma; y
 - (c) un ARN bicatenario, que tiene una hebra de una secuencia mostrada en uno cualquiera de los números de ID de SEC: 2 a 11 y una hebra de una secuencia complementaria a la secuencia, excepto que 2 ácidos uridílicos se añaden al extremo 3' de cada una de las hebras.

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ARNm es ARNm de bcl2.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que los componentes constituyentes de la membrana lipídica son solubles en un disolvente orgánico polar y en la que los componentes constituyentes de la membrana lipídica y las partículas complejas son dispersables en el disolvente orgánico polar.
11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el liposoma que encapsula el ARN se puede obtener mediante un procedimiento de producción que incluye las etapas de:
- preparar un líquido A que contiene un disolvente orgánico polar y agua, en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica están disueltos y las partículas complejas están dispersas y la adición de agua al líquido A o la eliminación selectiva del disolvente orgánico polar mediante destilación, evaporación, separación en membrana semipermeable o destilación fraccional del líquido A, según los cual las partículas complejas se recubren con la membrana lipídica.
12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el liposoma que encapsula el ARN se puede obtener mediante un procedimiento de producción que incluye las etapas de:
- preparar una dispersión de partículas complejas y una solución o una dispersión de los componentes constituyentes de la membrana lipídica y mezclar ambos líquidos para preparar el líquido F, en el que el líquido F contiene un disolvente orgánico polar y en el que los componentes constituyentes de la membrana lipídica y las partículas complejas están dispersos, por lo cual las partículas complejas son recubiertas con la membrana lipídica.
13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el disolvente orgánico polar es un alcohol.
14. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el disolvente orgánico polar es etanol.
15. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el lípido catiónico es uno o más compuestos seleccionados de cloruro de N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N,N-trimetilamonio, N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N-dimetilamina, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio, bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio y 3β-[N-(N'-dimetilaminoetil)carbamoil] colesterol.
16. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el derivado lipídico, el derivado de ácido graso o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia hidrosoluble es polietilenglicolfosfatidiletanolamina.
17. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el lípido neutro es fosfatidilcolina de yema de huevo.

Figura 1

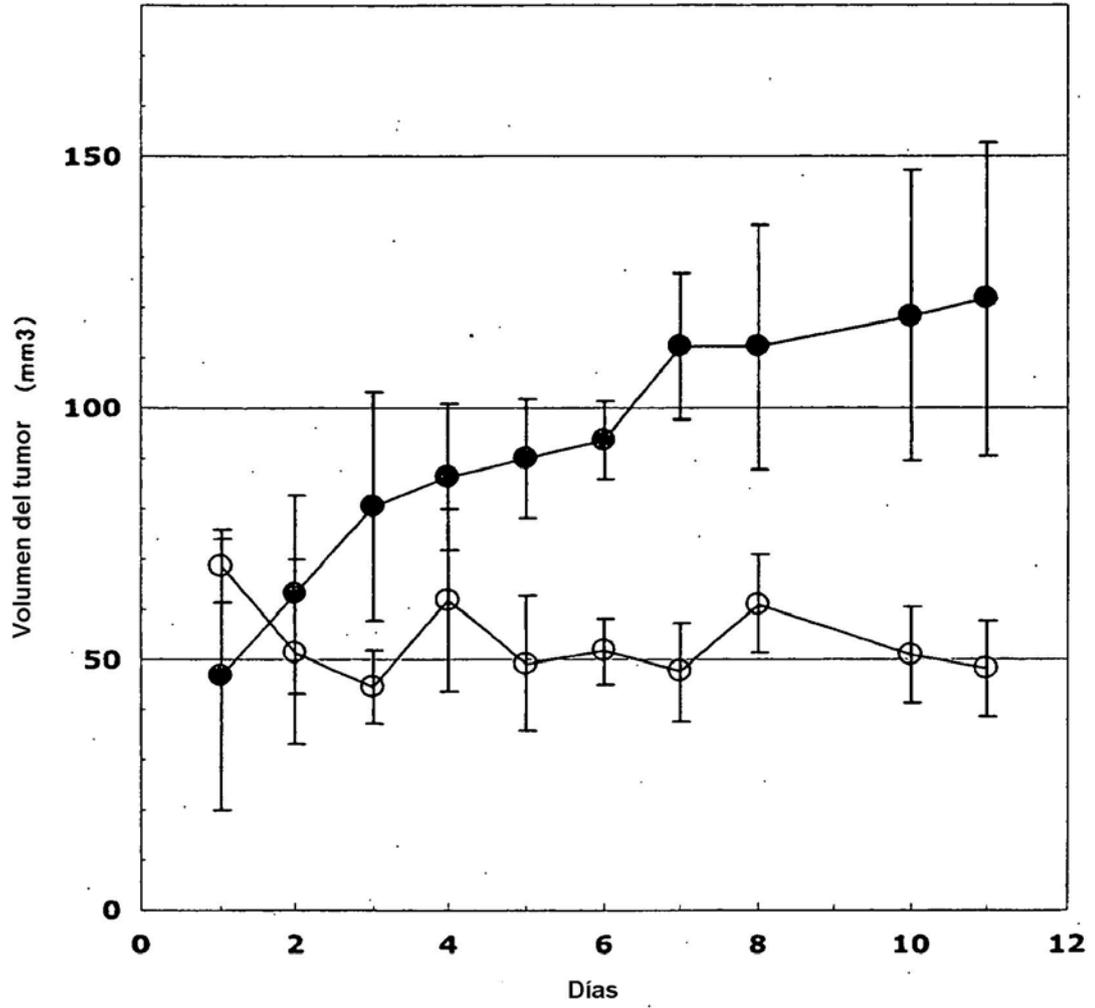


Figura 2

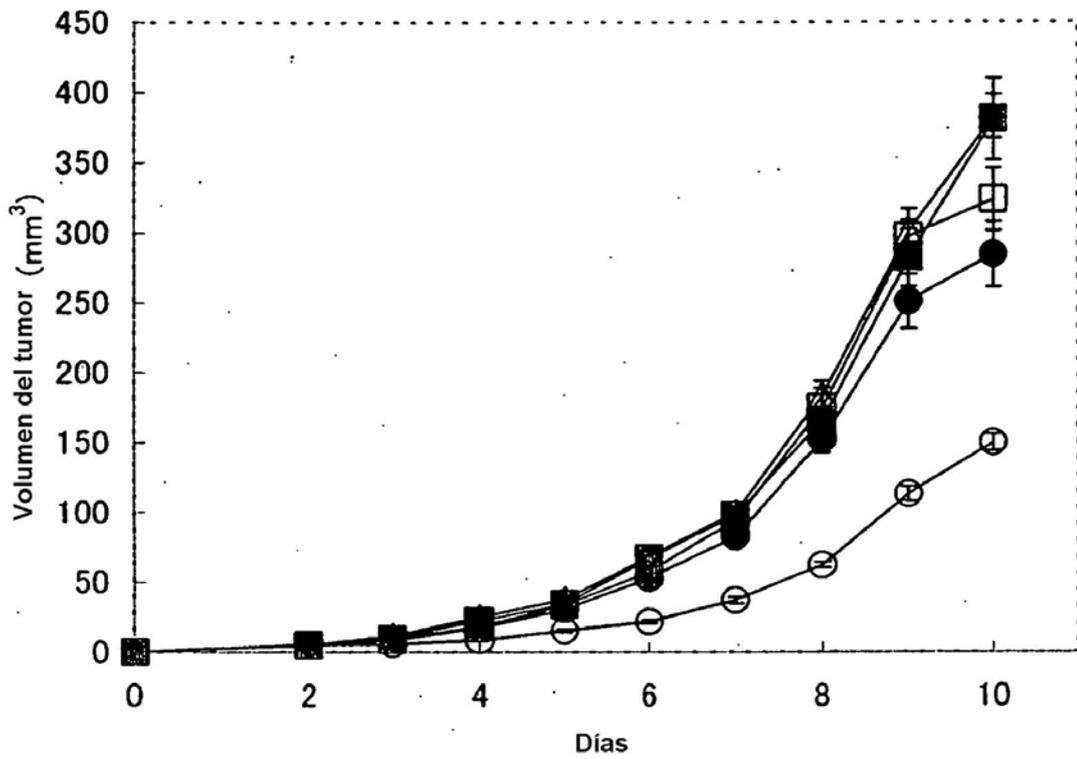


Figura 3

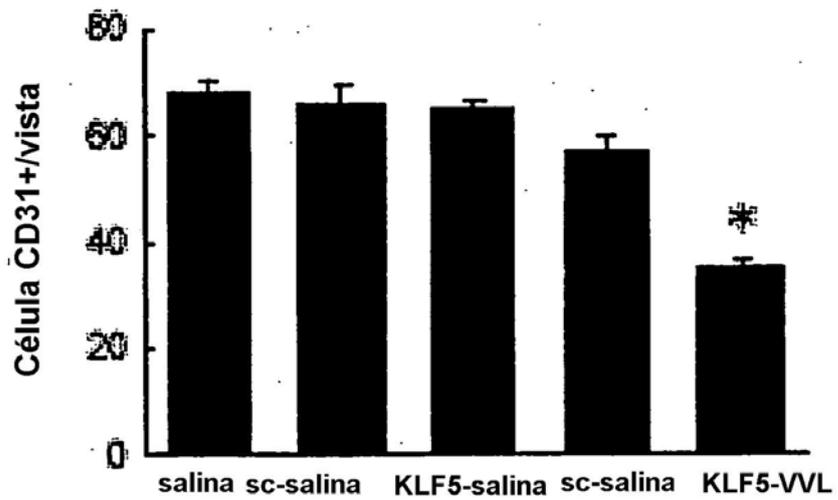


Figura 4

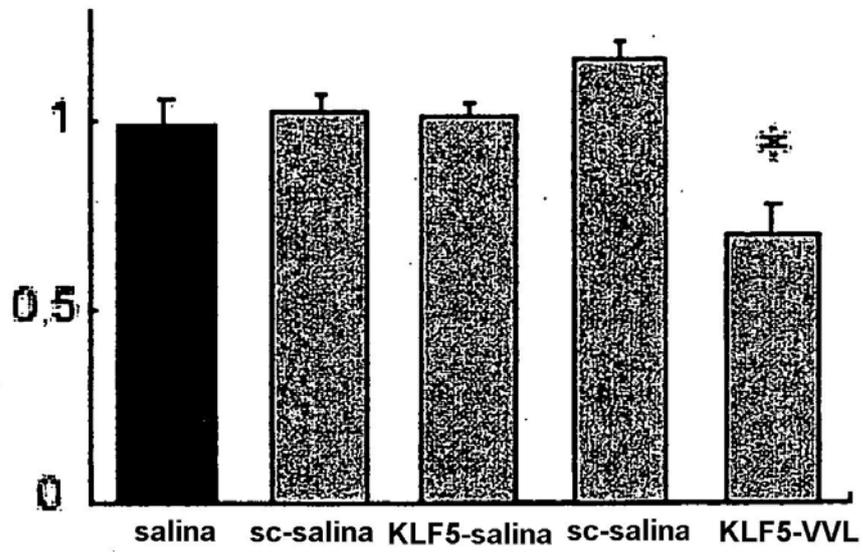


Figura 5

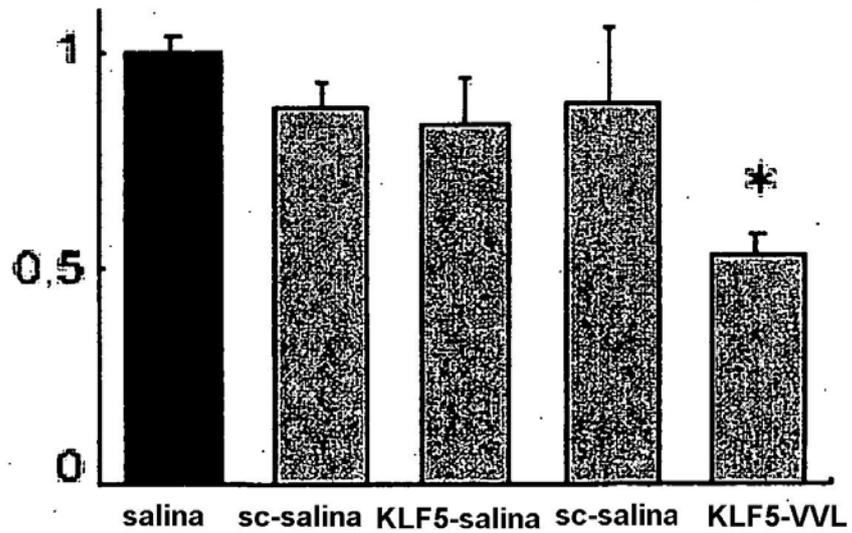


Figura 6

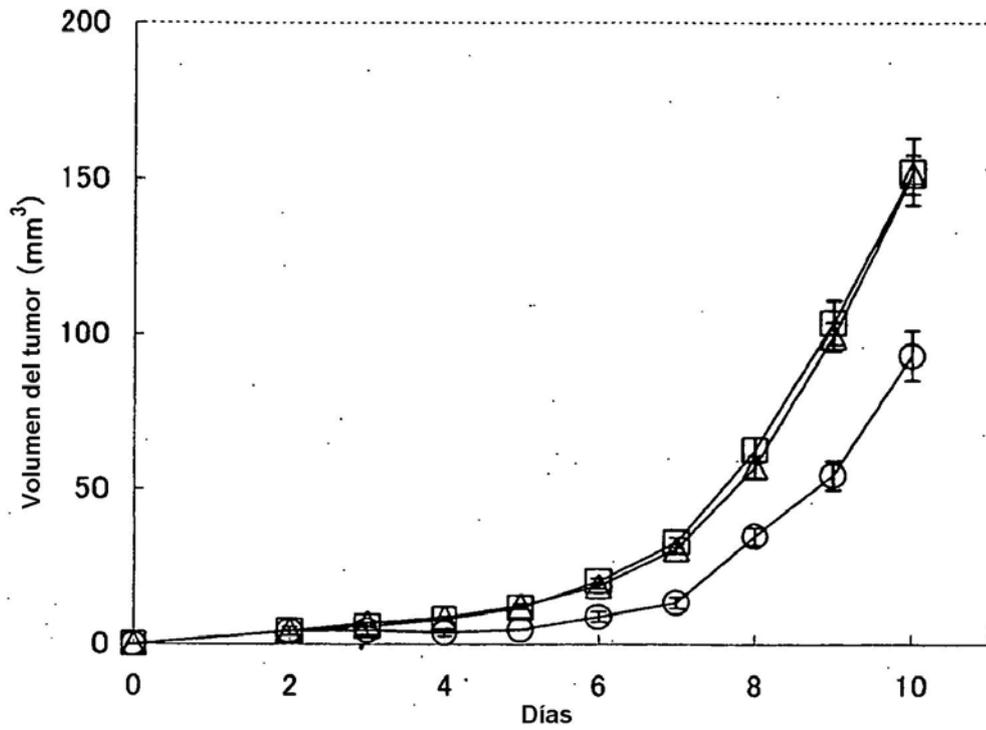


Figure 7

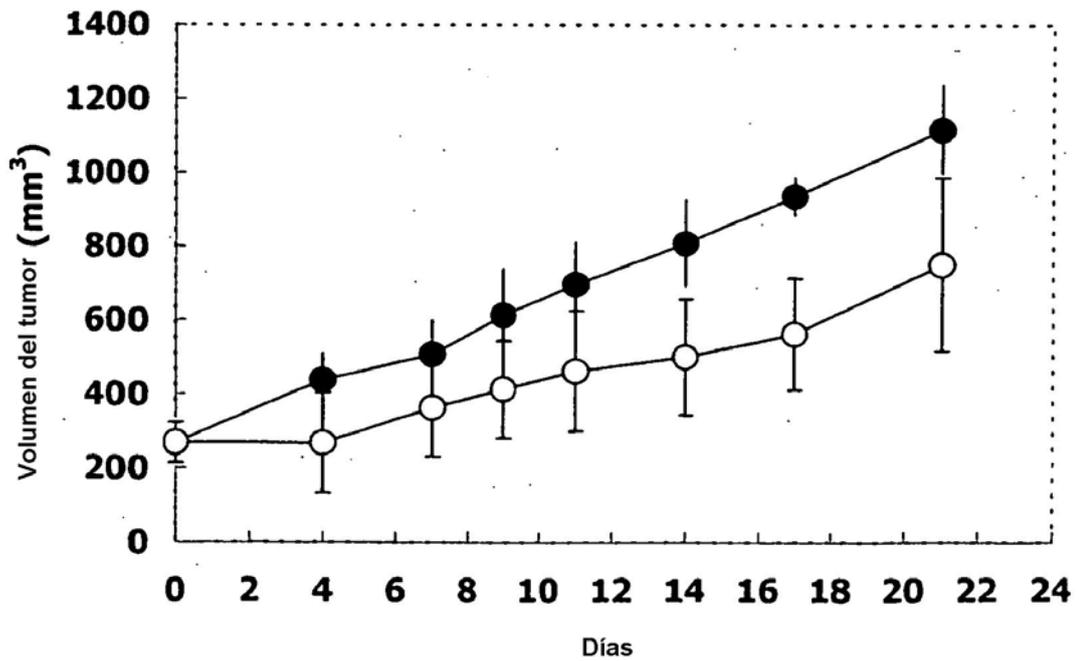


Figura 8

