

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 029**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2006 E 06811872 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1946761**

54 Título: **Composición portadora para el transporte de ácido nucleico**

30 Prioridad:

18.10.2005 JP 2005303497

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

09.07.2013

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9, Kandatsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**TOYOBUKU, HIDEKAZU;
MIYAO, HIDEO;
SATO, MASAOKO y
SEKIGUCHI, KAZUO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 412 029 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 portadora para el transporte de ácido nucleico.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición portadora de baja toxicidad y alta seguridad para administración de un ácido nucleico, la composición portadora, cuando se utiliza para administrar un ácido nucleico tal como un ARNsi en una célula u organismo de origen animal, que puede suministrar de manera eficaz el ácido nucleico en las células en tanto que se protege el ácido nucleico de ser degradado; y a una composición para administración de ácido nucleico.

Antecedentes de la técnica

15 Con los recientes avances de la biotecnología, se ha encontrado varios ácidos nucleicos que presentan funciones bioactivas en las células. Por ejemplo, los ARNsi (ARN de pequeña interferencia) son conocidos por causar la degradación de los ARNm de los genes diana en las células y por inhibir con ello la expresión de los genes diana (ARN de interferencia). La inhibición de la expresión del gen diana por el ARN de interferencia sirve para aliviar o tratar los síntomas de enfermedades causadas por la expresión anormal de genes o grupos de genes específicos, y por lo tanto se espera el desarrollo de los ARNsi como agentes terapéuticos. Sin embargo, a fin de utilizar los ácidos nucleicos tales como los ARNsi como agentes terapéuticos, es importante que dichos ácidos nucleicos presenten sus funciones en las células diana. Con esta finalidad, es indispensable que crear una tecnología para suministrar de manera eficaz los ácidos nucleicos en las células diana.

25 Tecnologías conocidas para suministrar moléculas de ácidos nucleicos exógenos o genes en células incluyen tratamientos de enfermedades intratables en seres humanos utilizando varios virus, incluyendo retrovirus, adenovirus, herpesvirus, etc. Sin embargo, dichos tratamientos implican dificultades debido a problemas de infecciosidad, inmunorreactividad, productividad y similares. Por lo tanto, se están desarrollando portadores no víricos que están exentos de problemas causados por los virus y que pueden suministrar moléculas de ácido nucleico en las células.

Por ejemplo, el documento de patente 1 ha descrito un lípido catiónico que tiene una estructura específica como un portador de administración de ácidos nucleicos no víricos que estimula la liberación de ácidos nucleicos tales como los ARNsi en células. Sin embargo, el lípido catiónico descrito en el documento de patente 1 tiene un defecto en que presenta toxicidad cuando se administra a las células cultivadas u organismos. El documento de Patente 2 da a conocer una composición portadora que contiene un compuesto anfifílico y policationes como un vehículo con relativamente baja toxicidad que puede suministrar ARNsi a las células. Sin embargo, la composición descrita en el documento de patente 2 también presenta un problema en su toxicidad a las células cuando se introduce una cantidad suficiente de ARNsi a la misma.

40 Frente a estos antecedentes de la técnica anterior, se desea el desarrollo de una composición portadora de baja toxicidad para la administración de un ácido nucleico que puede suministrar de manera eficaz ácidos nucleicos tales como ARNsi a las células.

45 [Documento de Patente 1]

Solicitud de patente japonesa no examinada nº de publicación 2002-529439

50 [Documento de patente 2]

Solicitud de patente japonesa no examinada nº de publicación 2005-508394

Descripción de la invención**55 Problemas que debe resolver la invención**

Un objetivo de la presente invención es resolver los problemas anteriores de la técnica anterior. Específicamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición portadora para administración de ácido nucleico de baja toxicidad y alta seguridad, la composición portadora, cuando se utiliza para administrar un ácido nucleico tal como un ARNsi en una célula u organismo de origen animal, que puede suministrar de manera eficaz los ácidos nucleicos en las células a la vez que las protege de ser degradadas; y una composición para administración de ácido nucleico que contiene la composición portadora y un ácido nucleico.

65 Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores realizaron una amplia investigación para resolver los problemas anteriores, y descubrieron

que una composición que contiene (A) un lípido catiónico con una estructura de esteroide (núcleo esteroide), en combinación con (B) un lípido catiónico del tipo sal de amonio cuaternario, sirve como vehículo para administración de ácido nucleico, ya que tiene baja toxicidad y puede suministrar de manera eficaz los ácidos nucleicos, protegiendo a la vez a los ácidos nucleicos de ser degradados. La presente invención se realizó por investigación adicional basándose en estos descubrimientos.

La presente invención proporciona los puntos siguientes:

Punto 1. Composición portadora para la administración de un ácido nucleico que comprende (A) un lípido catiónico con una estructura de esteroide (núcleo de esteroide) y (B) un lípido catiónico de tipo sal de amonio cuaternario.

Punto 2. Composición portadora según el punto 1, que comprende además (C) un material de base oleosa.

Punto 3. Composición portadora según el punto 1, en la que el componente (A) es 3β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano) carbamoyl]colesterol y/o yoduro de 3β -[N',N',N'-trimetilaminoetano]colesterol.

Punto 4. Composición portadora según el punto 1, en la que el componente (B) es por lo menos un miembro seleccionado de entre el grupo constituido por sal bromuro de dimetildioctadecilamonio, dioleiltrimetilamonio propano e hidrocloreto de N-[1-(2,3-bis (oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio].

Punto 5. Composición portadora según el punto 1, en la que el componente (B) está contenido en una proporción de 10 a 200 partes en peso por 100 partes en peso del componente (A).

Punto 6. Composición portadora según el punto 1, siendo la composición portadora es una composición portadora para la administración de un ARNs.

Punto 7. Composición para administración de ácido nucleico que comprende una composición portadora según cualquiera de los puntos 1 a 5 y un ácido nucleico.

Punto 8. Composición para administración de ácido nucleico según el punto 7, en el que el ácido nucleico es un ARNs.

Punto 9. Método de introducción de ácido nucleico *in vitro* que comprende poner en contacto una composición para administración de ácido nucleico según el punto 7 con una célula para introducir el ácido nucleico en la célula.

Punto 10. Utilización de (A) un lípido catiónico con una estructura de esteroide, en combinación con (B) tipo lípido catiónico de tipo sal de amonio cuaternario para la producción de una composición portadora para la administración de un ácido nucleico.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados del examen microscópico de las imágenes de fluorescencia procedentes del ácido nucleico de las células después del tratamiento utilizando cada una de las muestras de ensayo;

la figura 2 muestra gráficos que ilustran los resultados de la medición de las actividades de luciferasa de las células después del tratamiento con cada una de las muestras de ensayo;

la figura 3 muestra los resultados de la medición de las actividades de neprilisina (NEP), en los pulmones de ratas;

la figura 4 muestra los resultados de la medición del número de células vivas después del tratamiento utilizando cada una de las muestras de ensayo; y

la figura 5 muestra los resultados de la tinción de lonchas de tejidos pulmonares de ratas con hematoxilina y eosina, en los que se tiñen los núcleos, ribosomas, etc. de azul a azul celeste con hematoxilina, y el citoplasma, fibras, y los glóbulos rojos se tiñen de rojo con eosina.

Efectos de la invención

La composición portadora para la administración de un ácido nucleico y la composición para administración de ácidos nucleicos de la presente invención consiguen los siguientes efectos destacables.

(1) Los ácidos nucleicos pueden suministrarse de manera eficaz a las células para que éstos puedan poner de manifiesto sus funciones en las células.

(2) La degradación de los ácidos nucleicos puede suprimirse en los organismos y medios de cultivo.

(3) El vehículo y la composición tienen baja toxicidad y alta seguridad.

La composición portadora para la administración de un ácido nucleico y la composición para administración de ácidos nucleicos sirven por lo tanto para tratar varias enfermedades mediante la introducción de ácidos nucleicos, y en particular para el tratamiento de enfermedades intratables que son difíciles de tratar con compuestos de bajo peso molecular.

La composición para administración de ácido nucleico de la presente invención también tiene ventajas porque se puede liofilizar y por lo tanto se puede almacenar en estado liofilizado.

Mejor modo de poner en práctica la invención

La presente invención se describe a continuación con detalle.

Composición portadora para la administración de ácido nucleico

La composición portadora para la administración de un ácido nucleico de la presente invención comprende (A) un lípido catiónico con una estructura de esteroide (núcleo de esteroide) y (B) un lípido catiónico del tipo sal de amonio cuaternario.

La composición portadora de la presente invención se utiliza como un vehículo para suministrar (introducir) ácidos nucleicos en las células.

Los ácidos nucleicos que se pueden utilizar con la composición portadora de la presente invención no están restringidos en tipo y estructura, siempre que se necesiten suministrar a las células. Ejemplos de dichos ácidos nucleicos incluyen los ARNs, ARNm, ARNt, ARNr, ADNc, ARNm (microARN), ribozimas, oligonucleótidos señuelo, ADN plasmídicos, ácidos péptidonucleicos, oligonucleótidos formadores de triple cadena (por sus siglas en inglés, TFO), genes, etc. En particular, la composición portadora de la presente invención sirve para la administración de ARNs a las células. Los ácidos nucleicos que deben ser suministrados por la composición portadora de la presente invención pueden proceder de seres humanos, animales, plantas, bacterias, virus, etc., o los sintetizados químicamente. Además, dichos ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios, bicatenarios o tricatenarios, y no están restringidos por el peso molecular. Además, en la presente invención, también pueden utilizarse los ácidos nucleicos modificados con productos químicos, enzimas o péptidos. En la presente invención, dichos ácidos nucleicos pueden utilizarse individualmente o en combinación.

El lípido catiónico con una estructura esteroidea (denominado en lo sucesivo a veces "componente (A)") que se utiliza en la composición portadora de la presente invención es un lípido que es catiónico y tiene una estructura de esteroide (anillo perhidrociclopentafenantreno; $C_{17}H_{28}$). El lípido catiónico con una estructura de esteroide para su utilización en la presente invención no está restringido siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Ejemplos específicos de dichos lípidos incluyen 3β -[N-(N', N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Col), yoduro de 3β -[N', N', N'-trimetilaminoetano]colesterol (TC-Col), bis(guanidinio)-tren-colesterol (BGTC), N-colesteriloxycarbonil-3,7-diazanonano-1,9-diamina, β -alanina-dietanolamina-colesterol, N⁴-espermina colesteryl carbamato (GL-67), N⁴-[3-aminopropil]espermidina]colesteril carbamato (GL-78), N⁴ colesteryl espermina carboxiamida (GL-90), N¹, N⁸ bis-(argínico carboxiamida)-N⁴-espermidina colesteryl carbamato (GL-95), N-[N¹, N⁴, N⁸-tris(3-aminopropil)espermidina]colesteril carbamato (GL-96), y derivados similares del colesterol (lípidos catiónicos con una estructura de colesterol); escualamina, $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tris(3-aminopropoxi)-5 β -colan-24-(N,N-bis(3-aminopropil)amina), $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tris(3-aminopropoxi)-5 β -colan-24-(N-(N-(3-aminopropil))-3-aminopropil)amina, $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tris(3-azidopropoxi)-5 β -colan-24-(N, N-bis(2-cianoetil)amina), $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tris(3-azidopropoxi)-5 β -colan-24-(N-(benciloxycarbonil)-N-(3-hidroxipropil)amina) y lípidos catiónicos similares relacionados con los esteroides; conjugados genéricos de espermina y lípidos catiónicos similares relacionados con el ácido cólico; lípidos catiónicos relacionados con esterol glucósido de; lípidos catiónicos relacionados con esteroide saponina; etc. Dichos lípidos catiónicos simples con una estructura de esteroide se pueden utilizar solos o en combinación.

Los ejemplos preferibles de los lípidos catiónicos con una estructura esteroide incluyen derivados del colesterol (lípidos catiónicos con una estructura de colesterol), y los ejemplos más preferibles de los mismos incluyen 3β -[N-(N', N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol y yoduro de 3β -[N', N', N'-trimetilaminoetano]colesterol (TC-Col).

El lípido catiónico de tipo sal de amonio cuaternario para su utilización en la presente invención (en lo sucesivo denominado a veces "componente (B)") no está restringido siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Ejemplos específicos del mismo incluyen bromuro de dimetildiodecylamonio (BDDA), 1,2-dimiriostil-3-trimetilamonio propano, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DDAB), metilsulfato de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio propano, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio propano, hidrocloreto de N-(1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de dimiristoiloxipropil dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), bromuro de dioleiloxipropil dimetilhidroxietilamonio (DORIE), bromuro de dimetildidodecylamonio, hidrocloreto de N-(α -trimetilamonioacetil)didodecil-D-glutamina, hidrocloreto de N-(α -trimetilamonioacetil)-O,O'-bis-(1H,1H,2H,2H-

perfluorodecil)-L-glutamina, hidrocloreto de O,O'-didodecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina, bromuro de metilalildidodecilamonio, hidrocloreto de N-{p-(ω -trimetilamonio)butiloxi}benzoil}-didodecil-L-glutamina, bromuro de 9-(ω -trimetilamonio)butil)-3,6-bis(dodecanoil)carbazol, hidrocloreto de dimetildiodecilamonio, bromuro de N- ω -trimetilamoniododecanoil-dihexadecil-D-glutamina, bromuro de N-{p-(ω -trimetilamonio)hexiloxi}-benzoil}-ditetradecil-L-glutamina, sal bromuro de p-(ω -trimetilamonio)deciloxi)-p'-octiloxiazobenceno (MC-1-0810), sal bromuro de p-{ ω -(β -hidroxietil)-dimetil amonio-deciloxi}-p'-octiloxiazobenceno (MC-3-0810), bromuro de O,O',O''-tridodecanoil-N-(ω -trimetil-amoniododecanoil)tris(hidroximetil)aminometano (TC-1-12), 1,2-dilauril-glicerol-3-etilfosfolina, 1,2-dimiristol-glicerol-3-etilfosfolina, 1,2-dipalmitoil-glicerol-3-etilfosfolina, 1,2-diesterol-glicerol-3-etilfosfolina, 1,2-dioleilglicerol-3-etilfosfolina, 1-palmitoil-2-oreoil-glicerol-3-etilfosfolina, etc.

Dichos lípidos catiónicos de tipo sal de amonio cuaternario se pueden utilizar solos o en combinación.

Entre dichos lípidos catiónicos de amonio cuaternario de tipo sal, son preferibles bromuro de dimetildiodecilamonio (DDAB), propano dioleiltrimetilamonio (DOTAP), N-(1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-hidrocloreto de de trimetilamonio (DOTMA), O,O'-didodecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil) dietanolamina hidrocloreto de (DC-6-12, n = 12; 6 y DC-6-14, n = 14), p-{ ω - (β -hidroxietil) dimetilamonio-deciloxi)-p'-octiloxiazobenceno bromuro de sal (MC-3-0810), y O, O', O''-tridodecanoil-N-(ω -trimetil-amoniododecanoil)tris(hidroximetil)aminometano bromuro de (TC-1-12), y particularmente preferible son bromuro de dimetildiodecilamonio (DDAB), propano dioleiltrimetilamonio (DOTAP) e hidrocloreto de N-(1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA).

En la composición portadora de la presente invención, la proporción del componente (A) al componente (B) no está limitada, y desde el punto de vista de la mejora de la eficiencia de administración de ácidos nucleicos en las células, la proporción del componente (B) puede ser, por ejemplo, 10 a 200 partes en peso, preferentemente 30 a 150 partes en peso, y más preferentemente de 75 a 125 partes en peso, por 100 partes en peso del componente (A). La proporción total de los componentes (A) y (B) a la cantidad total de la composición portadora de la presente invención puede ser, por ejemplo, 10 a 100% en peso, preferentemente 20 a 80% en peso, y más preferentemente de 40 a 70% en peso.

La composición portadora de la presente invención puede contener un material de base oleosa (en lo sucesivo denominado a veces "componente (C)"), además de los componentes (A) y (B). Cuando se añade un material de base oleosa, sus propiedades hacen posible el control de la eficiencia de la introducción de ácido nucleico por la composición portadora para administración de ácido nucleico. Por ejemplo, cuando se añade un material de base oleosa para ajustar la gravedad específica de la composición portadora, el grado de contacto de la composición portadora con las células puede controlarse para mejorar de este modo la eficacia de introducción *in vitro*. Alternativamente, por ejemplo, cuando se añade un material de base oleosa sensible a la temperatura, el núcleo de la composición portadora puede desintegrarse en condiciones de temperatura predeterminadas para inducir fluctuaciones en la superficie de la célula, con lo que mejora la eficacia de la introducción del ácido nucleico. Alternativamente además, por ejemplo, cuando se añade un material de base oleosa que tiene una capacidad disgregante por un estímulo externo, el núcleo de la composición portadora puede disgregarse por un estímulo externo para provocar fluctuaciones en la superficie de la célula, con lo que mejora la eficacia de introducción del ácido nucleico.

Ejemplos de materiales de base oleosa que pueden añadirse a la composición portadora de la presente invención incluyen perfluorocarbono, perfluoropentano, bromuro de perfluorooctilo, perfluorohexano, perfluorotributilamina, aceite de soja, aceite de soja refinado, aceite de soja hidrogenado, aceite de soja insaponificado, escualeno, aceite de ricino, aceite de clavo, trioleato de sorbitán, aceite de trementina, aceite de cártamo, ácido graso del aceite de cártamo, ácido oleico, aceite de palma, aceite de colza, aceite de fusel, aceite de oliva, aceite de linaza, aceite de sésamo, aceite de clorofila, aceite de crotón, aceite de bergamota, aceite de cedro, aceite de naranja, aceite de hinojo, aceite de eucalipto, aceite de maíz, aceite de lavanda, aceite de mejorana, aceite de limón, aceite de semillas de algodón, aceite de coco, aceite de yema de huevo, aceite de rosa, aceite de pino, aceite de almendra, aceite de cacahuete, aceite de camelia, aceite blanco de alcanfor, aceite de manzanilla, aceite de canela, aceite de menta, aceite de maíz esterificado, aceite de jengibre, aceite de manzanilla romana, aceite de serpiente, aceite de menta verde, aceite de semillas de girasol, manteca de cacao, aceite de germen de trigo, aceite de óxido de zinc, aceites hidrogenados, aceites vegetales hidrogenados, parafina líquida ligera, parafina líquida, triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, aceite de visón, aceite de naranja amarga, aceite de ricino con polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 100, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 20, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 5, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 50, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 60, aceite de ricino con polioxil 35, aceites de proceso, etc. Entre dichos materiales de base oleosa, el perfluoropentano es sensible a la temperatura, y se caracteriza por hervir y gasificarse a 29,5°C. Además, perfluorohexano, bromuro de perfluorooctilo y perfluorotributilamina tienen capacidad disgregante por estímulo externo, y se caracterizan por producir cavitación en el núcleo de la composición portadora y disgregarlo cuando se recibe un estímulo externo tal como irradiación ultrasónica.

Cuando un material de base oleosa está contenido, la proporción del mismo no está limitada siempre y cuando los efectos de la presente invención no se vean afectados, y puede ser, por ejemplo, 0,1 a 50 partes en peso,

preferentemente de 1 a 30 partes en peso, y más preferentemente 5 a 20 partes en peso, por 100 partes en peso total de los componentes (A) y (B).

El vehículo para administración de ácidos nucleicos de la presente invención puede contener además un lípido de membrana fusógena (lípido cooperador), si es necesario. Cuando contiene dicho lípido de membrana fusible, la composición portadora de la presente invención tiene una eficacia mucho mejor de la administración de ácido nucleico en las células. Ejemplos de dichos lípidos de membrana fusible incluyen dioleoilfosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina, transfosfatidilfosfatidiletanolamina, 1,2-bis-(10,12-tricosadinoil)fosfoetanolamina, 1,2-dielaidoilfosfoetanolamina, 1,2-dihexadecilfosfoetanolamina, 1,2-dihexanoilfosfoetanolamina, 1,2-dilauroilfosfoetanolamina, 1,2-dilinoilfosfoetanolamina, 1,2-dimiristoilfosfoetanolamina, 1,2-dioleilfosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina, 1,2-difitanoilfosfoetanolamina, 1,2-diestearoilfosfoetanolamina, 1-palmitoil-2-oleoilfosfoetanolamina, 1-palmitoil-2-(10,12-tricosadinoil)fosfoetanolamina, 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-caproilamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-caproilamina, 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N,N-dimetilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N,N-dimetilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-dodecanoilo, 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-dodecanoilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-dodecanilamina, 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-glutarilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-glutarilo, 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-lactosa, 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidometil)ciclohexano-carboxilato], dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidometil)ciclohexano-carboxilato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidafenil)butilamida], 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidafenil)butirato], 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-metilo, dipalmitoilfosfoetanolamina-N-metilo, 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato], 1,2-dioleilfosfoetanolamina-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-(succinilo), etc. Entre dichos lípidos, puede utilizarse ventajosamente dioleoilfosfatidiletanolamina en el vehículo para administración de ácido nucleico de la presente invención.

Cuando está contenido dicho lípido de membrana fusible, la proporción del mismo no está limitado siempre y cuando los efectos de la presente invención no se vean afectados, y puede ser, por ejemplo, de 1 a 500 partes en peso, preferentemente de 10 a 250 partes en peso, y más preferentemente de 25 a 100 partes en peso, por 100 partes en peso total de los componentes (A) y (B).

La composición portadora de la presente invención puede contener diversos aditivos tales como agentes isotónicos, vehículos, diluyentes, espesantes, estabilizantes, tampones, conservantes, etc., según sea necesario. Las cantidades de dichos aditivos que se añaden se puede seleccionar adecuadamente según la forma de utilización de la composición portadora.

La composición portadora de la presente invención puede producirse mezclando los componentes (A) y (B), y opcionalmente otro(s) componente(s).

Composición para administración de ácidos nucleicos

La composición para administración de ácidos nucleicos de la presente invención comprende la composición portadora descrita anteriormente y un ácido nucleico. En esta composición, el ácido nucleico forma un complejo con el/los componente(s) de la composición portadora mediante enlaces iónicos y/o hidrófobos, de manera que la composición para administración de ácido nucleico ha mejorado la administración de ácido nucleico en las células.

La composición para administración de ácido nucleico de la presente invención se produce mezclando la composición portadora con un ácido nucleico, o mezclando un ácido nucleico con los componentes de la composición portadora en cualquier orden.

En la composición para administración de ácido nucleico de la presente invención, la proporción de ácido nucleico a la composición portadora varía dependiendo de los tipos de ácido nucleico y vehículo para la administración de ácido nucleico, del tipo de célula como diana para administración de ácidos nucleicos, etc., y la proporción de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, 0,1 a 300 partes en peso, preferentemente de 1 a 100 partes en peso, y más preferentemente de 2,5 a 50 partes en peso, por 100 partes en peso total de los componentes (A) y (B).

Además, la cantidad total de los componentes (A) y (B) en la composición para administración de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, 10 a 90% en peso, preferentemente 30 a 80% en peso, y más preferentemente 50 a 70% en peso, del peso total de la composición.

La composición para administración de ácido nucleico de la presente invención puede contener varios aditivos tales como agentes isotónicos, vehículos, diluyentes, espesantes, estabilizadores, tampones, conservantes, etc., según la forma de utilización. Las cantidades de dichos aditivos pueden seleccionarse adecuadamente según la forma de utilización de la composición para administración de ácido nucleico.

En la presente invención, los ejemplos de células a las que pueden administrarse ácidos nucleicos incluyen células cultivadas, células aisladas de organismos (incluyendo estirpes celulares creadas), etc.

La forma de utilización *in vitro* de la composición para administración de ácido nucleico de la presente invención no está restringida, siempre y cuando la composición se pueda poner en contacto con las células diana para la introducción del ácido nucleico. Un ácido nucleico se administra en células cultivadas o células aisladas de un organismo, y la composición para la administración del ácido nucleico puede añadirse previamente, por ejemplo, a un medio de cultivo celular. También puede suministrarse un ácido nucleico a las células cultivadas o a las células aisladas de un organismo en presencia de suero sanguíneo. También se da a conocer que un ácido nucleico puede administrarse en las células *in vivo*, y ejemplos de las formas de utilización de la composición incluyen la inyección directa en el tejido; la inyección bajo la piel o en una vena, músculo, la cavidad abdominal, ojo, órgano digestivo, dientes, etc.; la administración por inhalación en la cavidad nasal, la cavidad oral, los pulmones, etc.; administración oral; la administración transdérmica y la administración a través de la mucosa a través de la mucosa oral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa rectal o mucosa uterina; y similares.

Mejor modo de poner en práctica la invención

La presente invención se describe con detalle a continuación haciendo referencia a los Ejemplos y demás, que no están destinados a limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Se preparó una composición portadora para la administración de un ácido nucleico que tiene la fórmula siguiente.

Bromuro de dimetildioctadecilamonio	0,9 µg
3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol	0,9 µg
Dióleilfosfatidiletanolamina	0,9 µg
Glicerol	40,5 µg
Agua purificada	2 µl
Medio OPTI-MEM (producido por Invitrogen Corporation)	Cantidad apropiada
Cantidad total	50 µl

Ejemplo 2

Se preparó en primer lugar una solución que contiene un ácido nucleico que tiene la siguiente composición.

ARNsi	2 pmol
Medio OPTI-MEM (producido por Invitrogen Corporation)	Cantidad apropiada
Cantidad total	50 µl

A continuación, 50 µl de la composición portadora del Ejemplo 1 se mezclaron con 50 µl de la solución que contiene ácido nucleico, y la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, a fin de preparar una composición para administración de ácido nucleico.

Ejemplo 3

Se preparó una composición portadora para la administración de un ácido nucleico que tiene la fórmula siguiente.

Bromuro de dimetildioctadecilamonio	0,5 mg
3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol	0,5 mg
Dióleilfosfatidiletanolamina	0,5 mg
Sacarosa	88,9 mg
Agua purificada	Cantidad apropiada
Cantidad total	1,0 ml

Ejemplo 4

Se preparó una composición portadora para la administración de un ácido nucleico que tiene la fórmula siguiente.

Bromuro de dimetildioctadecilamonio	0,5 mg
3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol	0,5 mg
Dióleilfosfatidiletanolamina	0,5 mg
Agua purificada	Cantidad apropiada
Cantidad total	1,0 ml

Ejemplo de ensayo 1

Para evaluar la capacidad de la composición para administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2 para administrar

ARNsi dentro de las células, se realizaron los siguientes ensayos utilizando células A549 (cepa celular procedente de cáncer de pulmón humano; Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd.) como células modelo. En este ensayo, se utilizó GL3-ARNsi marcado con fluorescencia (Luciferasa de luciérnaga dirigida al ARNsi; Dharmacon Corporation, Boulder, CO, USA; transcrito: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT; complementario: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAGdTdT).

En primer lugar, las células A549, cuya concentración se había ajustado a $1,2 \times 10^5$ células/ml con medio DMEM (Dulbecco-Medio Esencial Mínimo), se sembraron en una placa de 24 pocillos a $6,0 \times 10^4$ células por pocillo. A continuación, se añadieron a cada pocillo 500 μ l de una de cada una de las muestras de ensayo mostradas en la Tabla 1, y se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 24 horas. Las imágenes de fluorescencia procedentes del ácido nucleico en las células se observaron con un microscopio de fluorescencia (microscopio de fluorescencia Olympus IX 71; Olympus, Toquio, Japón), así como para evaluar la capacidad de cada muestra de ensayo para administrar ARNsi dentro de las células.

Tabla 1

Muestra de ensayo		Fórmula
nº	Indicación en la figura 1	
1	Composición portadora + ARNsi	Composición del ejemplo 2 para administración de ácidos nucleicos
2	LFA2000 + ARNsi	Medio OPTI-MEM que contiene LFA2000 (Lipofectamina 2000; producida por Invitrogen Corporation) (1,0 mg/ml) y ARNsi (20 pmol/ml)
3	NeoPhectin + ARNsi	Medio OPTI-MEM que contiene NeoPhectin (producido por NeoPharm) (1,0 mg/ml) y ARNsi (20 pmol/ml)
4	ARNsi	Medio OPTI-MEM que contiene ARNsi (20 pmol/ml)

Los resultados se muestran en la figura 1. Cuando sólo se añadía el ARNsi, no se observaba fluorescencia en las células. Por el contrario, cuando la composición para administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2 o un vehículo para administración de células conocido (es decir, LFA 2000 o NeoPhectin) se añadía junto con el ARNsi, se observaba fluorescencia en las células. En particular, cuando se utilizaba la composición para administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2, se observaba una fuerte fluorescencia en las células. Estos resultados confirmaron que la composición para administración de ácidos nucleicos de la invención presenta una capacidad de administración de ácidos nucleicos excelente.

Ejemplo de ensayo 2

Con el fin de evaluar la supresión de un gen diana en las proteínas, un plásmido que codifica el gen de la luciferasa se introdujo temporalmente en las células, y posteriormente se añadió a las células la composición para administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2, para evaluar la cantidad de expresión de la luciferasa. En la prueba, se utilizó GL3-ARNsi (luciferasa de luciérnaga dirigida a ARNsi; Dharmacon Corporation, Boulder, CO, USA; transcrito: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT; complementario: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAGdTdT).

Más específicamente, se añadieron 10 μ g de pGL3 Luciferasa o Renilla Luciferase (Promega, Madison, WI, USA) a 5×10^6 células A549 (cepa celular procedente de cáncer de pulmón humano producida por Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd.), y las células se sometieron a electroporación utilizando un nucleofector (Amaxa Inc., Gaithersburg, MD, USA). Las células en las que se ha introducido pGL3 Luciferasa y Renilla Luciferasa se ajustaron a $1,2 \times 10^5$ /ml con medio DMEM (Dulbecco-Medio Esencial Mínimo), que está exento de suero o que contiene 10% en volumen de suero bovino fetal, y posteriormente se sembraron en una placa de 24 pocillos a razón de $6,0 \times 10^4$ células por pocillo. A continuación, 500 μ l de una de cada una de las muestras de ensayo mostradas en la Tabla 2 se añadió a cada pocillo, y se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 24 horas. Las células en los pocillos se lisaron por un procedimiento convencional para preparar lisados celulares, y en los lisados celulares se evaluó la actividad de luciferasa utilizando un sistema analítico Dual-Luciferase Reporter (Promega, Madison, WI, USA). Las actividades de luciferasa se evaluaron calculando la relación de la luciferasa de luciérnaga a las actividades de luciferasa de Renilla (actividad relativa:%).

Tabla 2

Muestra de ensayo		Fórmula
nº	Indicación en la figura 2	
1	Composición portadora + ARNsi	Composición del ejemplo 2 para administración de ácidos nucleicos
2	LFA2000 + ARNsi	Medio OPTI-MEM que contiene LFA2000 (Lipofectamina 2000; producida por Invitrogen Corporation) (1,0 mg/ml) y ARNsi (20 pmol/ml)
3	NeoPhectin + ARNsi	Medio OPTI-MEM que contiene NeoPhectin (producido por NeoPharm) (1,0 mg/ml) y ARNsi (20 pmol/ml)
4	ARNsi	Medio OPTI-MEM que contiene ARNsi (20 pmol/ml)

Muestra de ensayo		Fórmula
nº	Indicación en la figura 2	
5	LFA2000	Medio OPTI-MEM que contiene LFA2000 (Lipofectamina 2000; producida por Invitrogen Corporation) (1,0 mg/ml)
6	NeoPhectin	Medio OPTI-MEM que contiene NeoPhectin (producido por NeoPharm) (1,0 mg/ml)
7	Composición portadora	Medio OPTI-MEM que contiene la composición portadora del ejemplo 1 (50% en volumen)
8	Referencia	Medio OPTI-MEM

Los resultados se muestran en la figura 2. Los resultados confirmaron que el uso de la composición para la administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2 permite la administración del ARNsi muy eficaz en células y la expresión de la función de ARNsi en las células, independientemente de la presencia o ausencia de suero en el medio.

Ejemplo de ensayo 3

En este ensayo, se evaluó la capacidad de la composición portadora del Ejemplo 3 para administrar ARNsi en células de tejido pulmonar y la funcionalidad de ARNsi en las células, utilizando (neprilisina de rata dirigida a ARNsi (NM_012608); RNA-TEC NV Corporation, Bélgica; Transcrito: 5'-GCUCCAAAGCCGAAGAAGAdTd; complementario: 5'-UCUUCUUCGGCUUUGGAGCdTdT).

La composición para administración de ácido nucleico se preparó mezclando la composición portadora del Ejemplo 3 con ARNsi en una proporción de 1:1 en peso. A continuación, 0,4 ml de una solución de ensayo, que se preparó diluyendo la composición para administración de ácido nucleico con un vehículo apropiado (8,89% p/v de de sacarosa), se administró por vía pulmonar a ratas SD macho que pesaban 250-320 g, mientras que se anestesiaban con un agente anestésico por inhalación, isoflurano (producido por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), utilizando un dispositivo de inhalación IA-1B (PENNCENTURY, Filadelfia, PA, USA). La solución de ensayo se preparó por dilución de la composición para administración de ácido nucleico según proceda de manera que la dosis de ARNsi sea de 0,04 a 1,2 mg/kg (por rata). Veinticuatro horas después de la administración pulmonar, cada rata se anestesió con éter, y se fijó en la posición supina. Se hizo una incisión abdominal en la línea media, y la rata murió desangrado por la vena cava abdominal inferior. Los pulmones se extirparon posteriormente de la rata, y se lavaron con solución salina fisiológica enfriada con hielo. Utilizando los pulmones extirpados, se midió la cantidad de expresión de ARNm de un gen diana modelo, NEP (endopeptidasa neutra), y la cantidad de expresión de ARNm de un gen constitutivo, GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Por otra parte, se midió la actividad de Neprilisina de rata (NEP) en los pulmones extirpados. Los métodos y los resultados de la medición se describen con detalle a continuación. Como referencia, se realizó un ensayo de manera similar administrando sólo el vehículo (8,89% p/v de solución de sacarosa) a ratas en las mismas condiciones. Para comparación, se realizó también un ensayo utilizando EGFP (proteína verde fluorescente) dirigida a ARNsi (Takara, Japón; transcrito: 5'-GAACGGCAUCAAGGUGAACTT, complementario: 5'-GUUCACCUUGAUGCCGUUCTT) en lugar de Neprilisina de rata.

Método y resultados de la cuantificación de NEP ARNm y GAPDH ARNm

Se aisló ARN total a partir de una parte de los pulmones extirpados, y se purificó, utilizando un RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Alemania). La conversión de los ARNm en ADNc se realizó utilizando un Sistema de Síntesis SuperScript III First-Strand para RT-PCR (Invitrogen, California, USA). La cantidad del ARNm para el gen diana modelo NEP (endopeptidasa neutra) se cuantificó por PCR en tiempo real, utilizando el ADNc preparado. De manera similar, se cuantificó la cantidad del ARNm para el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) constitutivo. La supresión de la expresión de ARNm Neprilisina se evaluó calculando la relación de NEP ARNm a GAPDH ARNm.

El resultado confirmó que la expresión del Neprilisina ARNm en los pulmones fue suprimida significativamente por Neprilisina-ARNsi a una dosis de 0,08 mg/kg. Debido a que esta dosis es menor que las descritas anteriormente que proporcionan efectos de ARNi *in vivo*, se demostró que la administración eficaz de ARNsi en células de tejido pulmonar se puede conseguir utilizando la composición portadora del Ejemplo 3.

Procedimiento y resultados de la medición de la actividad de neprilisina (NEP) de rata

Se homogeneizó una porción de los pulmones extirpados, y se midió la actividad de neprilisina de rata en el homogenado. Se determinó la actividad de neprilisina (NEP) de rata midiendo cuanto sustrato NEP, DAGNPG (N-dansil-D-Ala-Gly-p-nitro-Phe-Gly; SIGMA), se hidrolizó en un período dado, en presencia o ausencia de un inhibidor específico de NEP, fosforamidón (SIGMA), y evaluando la diferencia en las cantidades de hidrolizado en presencia o ausencia del inhibidor. El homogeneizado de pulmón de rata se utilizó en una cantidad de 50 µl; el sustrato DAGNPG se utilizó en una concentración de 1 mM, y el inhibidor, fosforamidón, cuando está presente, se añadió a

una concentración de 10 mM, de modo que las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 100 µl. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 10 minutos, y se interrumpieron incubando a 90°C durante 10 minutos. La actividad de NEP se determinó midiendo las cantidades de hidrolizado DAG (dansil-D-Ala-Gly) resultante. La cantidad de hidrolizado producido se determinó midiendo la fluorescencia del hidrolizado: la excitación se realizó a 360 nm, y se midió la emisión de fluorescencia a 535 nm.

Los resultados en el caso de la dosis de ARNsi de 0,4 mg/kg se muestran en la figura 3. Los resultados muestran que la actividad de NEP en los pulmones se suprimió significativamente por NF-ARNsi a una dosis de 0,4 mg/kg. En consecuencia, los resultados mencionados anteriormente también confirmaron que la administración eficaz de ARNsi en células de tejido pulmonar se puede conseguir utilizando la composición portadora del Ejemplo 3.

Ejemplo de ensayo 4

Se evaluó la citotoxicidad de la composición portadora del Ejemplo 1 utilizando un sistema analítico de proliferación celular Premix WST-1 (Takara, Siga, Japón). Más específicamente, células A549 (cepa celular procedente de cáncer de pulmón humano; producida por Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd.), cuya concentración se había ajustado a 1×10^5 células/ml con medio DMEM (Dulbecco-Medio Esencial Mínimo), se sembraron en una placa de 96 pocillos a razón de 10^4 células por pocillo. Una de cada una de las muestras de ensayo, es decir, la composición portadora del Ejemplo 1, LFA2000 (Lipofectamina 2000, producido por Invitrogen) y NeoPhectin (producido por NeoPharm Corporation), se añadieron posteriormente en cada pocillo a una concentración de 2 a 20 µg/ml. A continuación, 10 µl de una solución de premezcla WST-1 se añadió a cada pocillo, y las células se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se midió posteriormente la absorbancia de cada pocillo a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Tecan, Maennedorf, Suiza). Como referencia, se añadió un medio a los pocillos en lugar de las muestras de ensayo, y se realizó la medición de manera similar. La absorbancia a 450 nm representa la absorbancia del colorante formazán que forma una reductasa a partir de la WST-1. Debido a que existe una relación lineal entre esta absorbancia y las células vivas, se preparó una curva de calibración entre el número de células vivas sembradas y la absorbancia. El número de las células de cada muestra de ensayo se determinó basándose en la curva de calibración.

Los resultados se muestran en la figura 4. Los resultados confirmaron que el número de células apenas disminuyó con la adición de la composición portadora del Ejemplo 1, y por lo tanto la composición portadora tiene una baja toxicidad y es muy segura.

Ejemplo de ensayo 5

Para ratas SD macho (SLC, Tokio, Japón) con un peso de 250 a 320 g se administraron por vía pulmonar una solución de prueba preparada diluyendo 500 µg de la composición portadora del Ejemplo 4 con agua purificada hasta 0,4 ml utilizando un dispositivo 1A-IC producido por la Penncentury Corporation. Cada rata después de la administración se devolvió a la jaula, y se mantuvo en condiciones normales. Veinticuatro horas después de la administración pulmonar, 50 mg/kg (1 ml/kg) de pentobarbital (Nembutal, producido por Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd.) se administró por vía intraperitoneal a la rata, y la rata bajo anestesia se fijó posteriormente en posición supina. Se hizo una incisión abdominal en la línea media, la rata se sacrificó por desangrado por la vena cava inferior abdominal. Posteriormente se extirparon los pulmones de la rata, y se lavaron con solución salina fisiológica enfriada con hielo. Se prepararon lonchas de tejido pulmonar extirpado, y las lonchas se examinaron al microscopio por tinción con hematoxilina y eosina, a fin de evaluar la toxicidad de la composición portadora para el tejido pulmonar. Para comparación, las pruebas se realizaron en las mismas condiciones que anteriormente, utilizando LFA2000 (Lipofectamina 2000, producido por Invitrogen) o NeoPhectin (producido por NeoPharm Corporation) en lugar de la composición portadora del Ejemplo 4. Debido a que las ratas se sacrificaron mediante la administración de 500 µg de LFA2000, el ensayo se realizó con la dosis de LFA2000 cambiado a 250 µg.

Los resultados se muestran en la figura 5. La inflamación se produjo en las ratas a las que se les administró LFA2000 y NeoPhectin localmente a los pulmones, y se observaron edemas locales. Por el contrario, se confirmó que dichos síntomas de inflamación se redujeron en las ratas a las que se les había administrado la composición portadora del Ejemplo 4. Los resultados confirmaron que la composición portadora del Ejemplo 4 tiene una toxicidad baja, incluso después de la administración pulmonar local, y es muy segura.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición portadora para la administración de un ácido nucleico que comprende (A) un lípido catiónico con una estructura de esteroide y (B) un lípido catiónico de tipo sal de amonio cuaternario.
2. Composición portadora según la reivindicación 1, que comprende además (C) un material de base oleosa.
- 10 3. Composición portadora según la reivindicación 1, en la que el componente (A) es 3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol y/o yoduro de 3 β -[N',N',N'-trimetilaminoetano] colesterol.
4. Composición portadora según la reivindicación 1, en la que el componente (B) es al menos un miembro seleccionado de entre el grupo constituido por sal bromuro de dimetildiocetadecilamonio, dioleiltrimetilamonio propano e hidrocloreuro de N-[1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio].
- 15 5. Composición portadora según la reivindicación 1, en la que el componente (B) está contenido en una proporción de 10 a 200 partes en peso por 100 partes en peso del componente (A).
- 20 6. Composición portadora según la reivindicación 1, siendo la composición portadora una composición portadora para la administración de un ARNs.
7. Composición para administración de ácido nucleico, que comprende una composición portadora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un ácido nucleico.
- 25 8. Composición para administración de ácido nucleico según la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico es un ARNs.
9. Procedimiento de introducción de ácido nucleico *in vitro* que comprende la puesta en contacto de una composición para administración de ácido nucleico según la reivindicación 7 con una célula para introducir el ácido nucleico en la célula.
- 30 10. Utilización de (A) un lípido catiónico con una estructura de esteroide, en combinación con (B) un lípido catiónico del tipo sal de amonio cuaternario para la producción de una composición portadora para la administración de un ácido nucleico.

Fig. 1

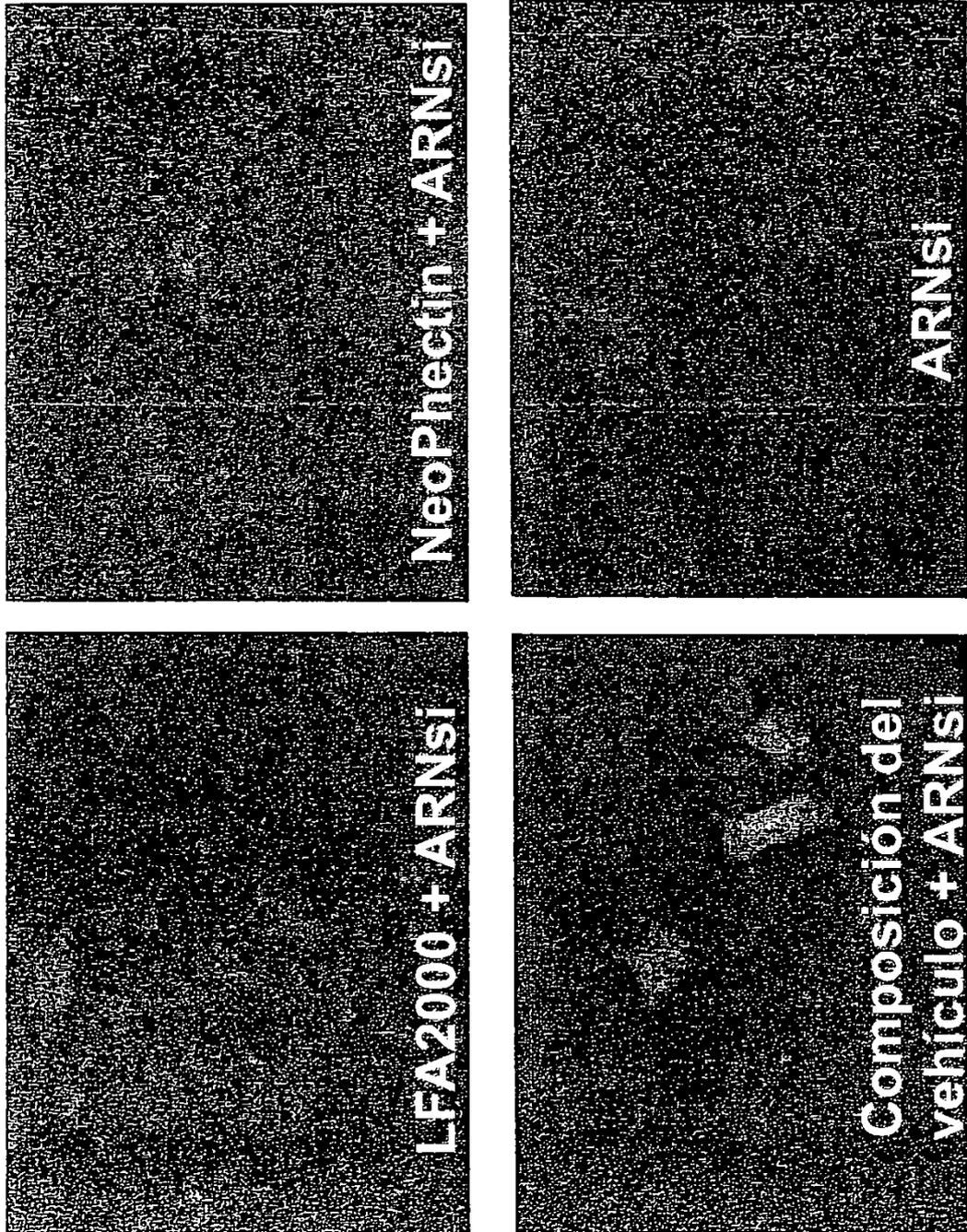


Fig. 2

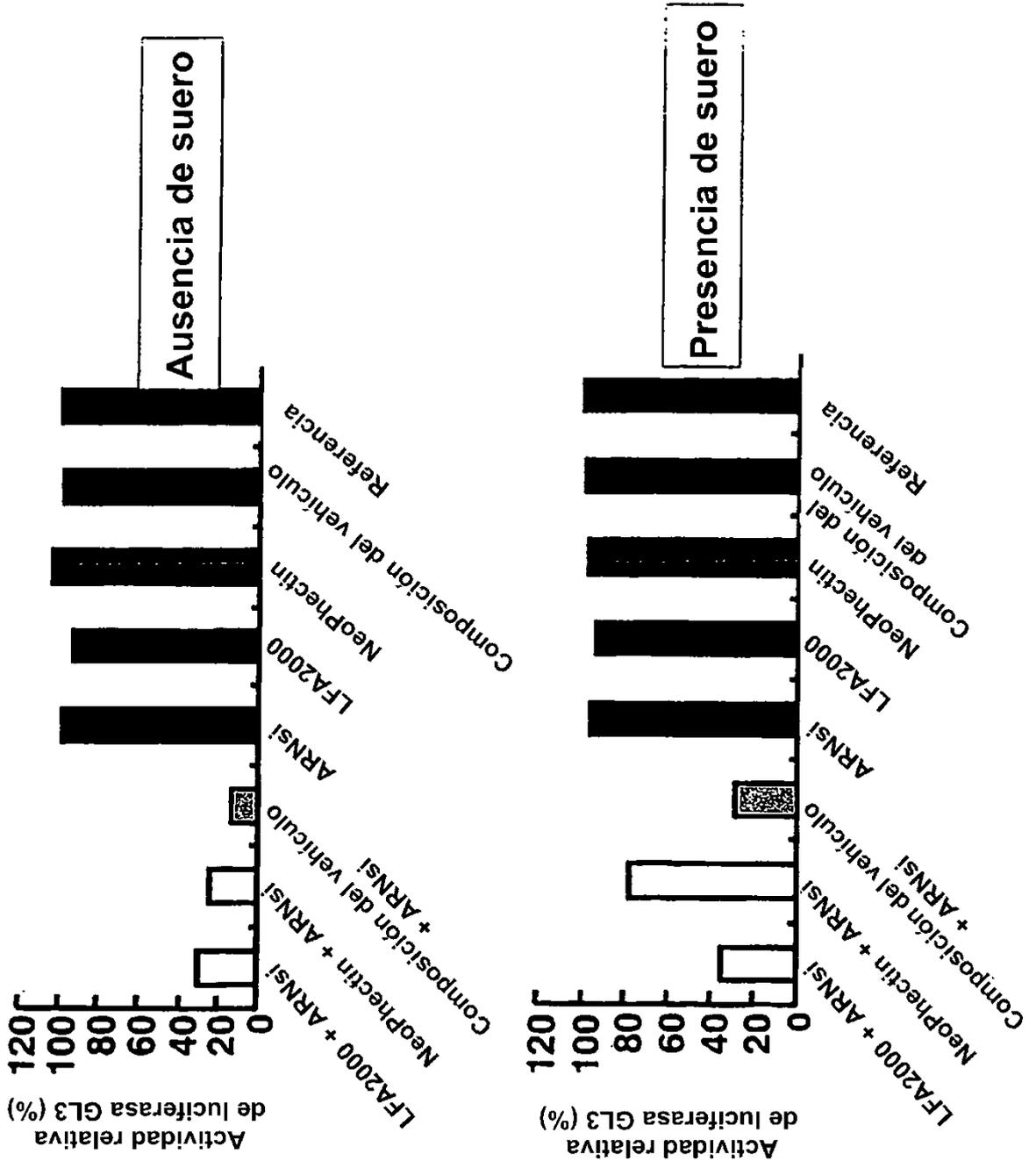


Fig. 3

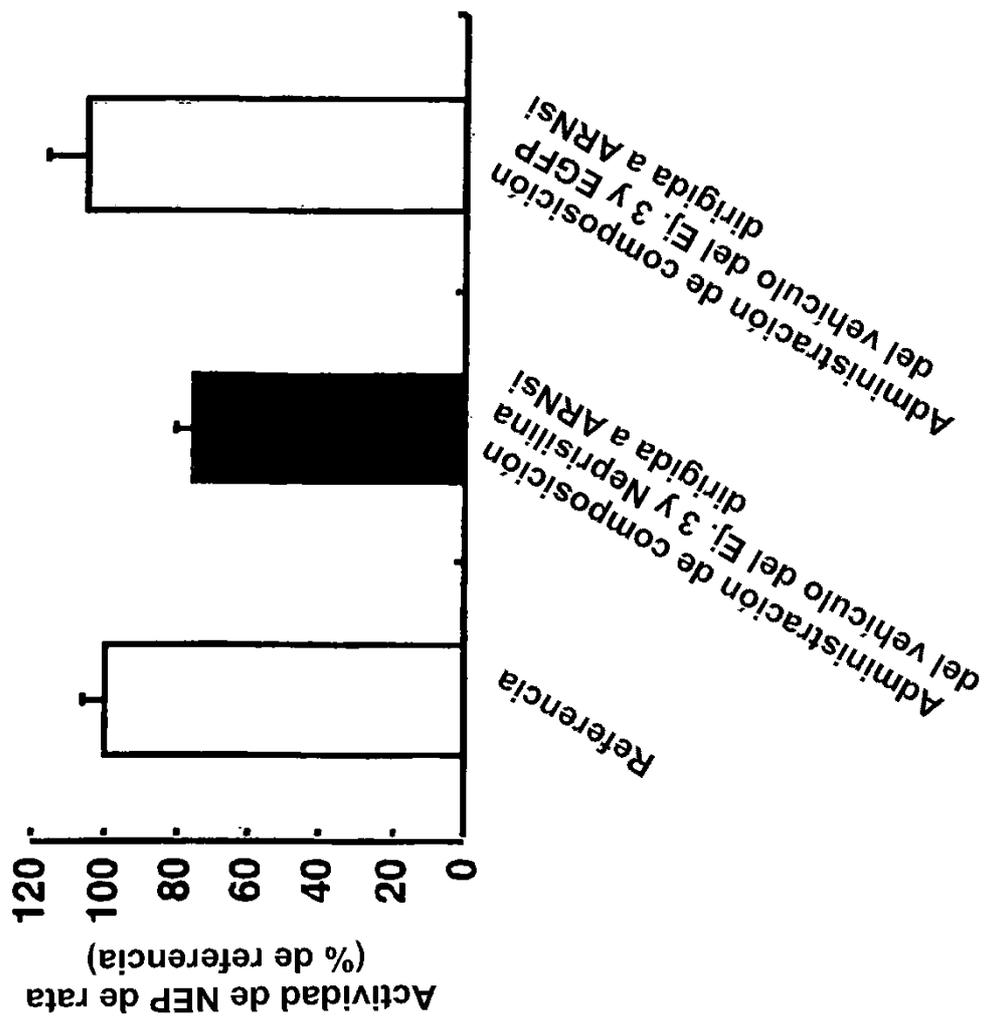


Fig. 4

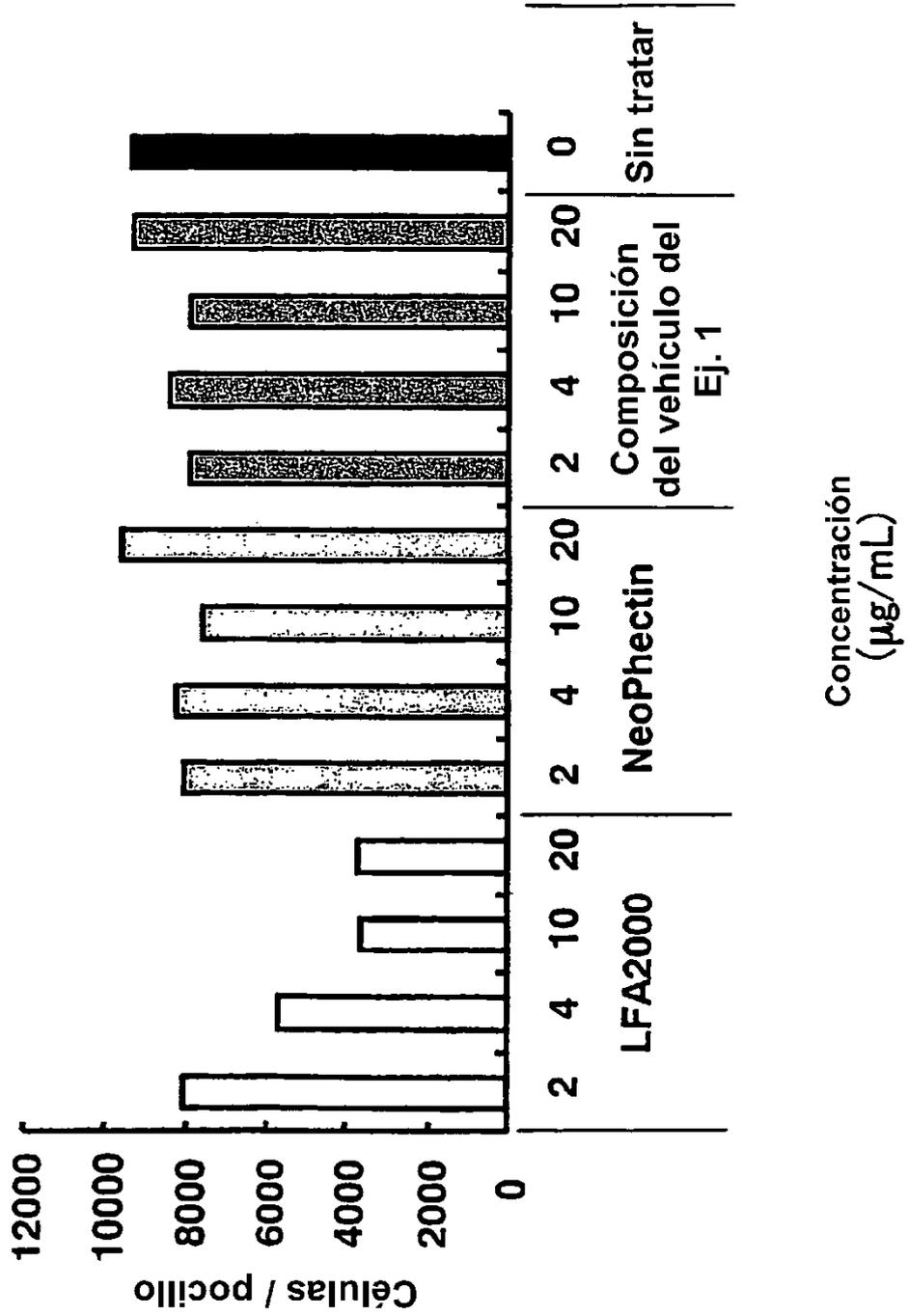
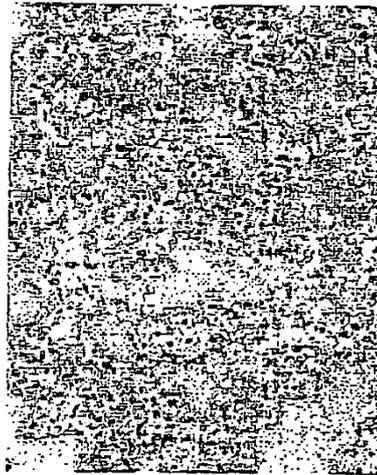


Fig. 5



**Composicion del
vehículo del Ej. 4
Dosis: 500 µg/rata**



**NeoPhectin
Dosis: 500 µg/rata**



**Lipofectamina 2000
Dosis: 250 µg/rata**