

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 864**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2008 E 08738918 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2140870**

54 Título: **Composición portadora de administración rápida de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

26.03.2007 JP 2007079944

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

12.08.2015

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
9, Kanda-Tsukasa-machi 2-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP y
TAKEUCHI, HIROFUMI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAKEUCHI, HIROFUMI;
HIRA, YASUYUKI;
NAKANO, KOJI y
TOYOBUKU, HIDEKAZU**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 542 864 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 de administración rápida de ácidos nucleicos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición portadora para la administración de ARNip que puede administrar eficientemente un ARNip en las células al administrar un ARNip en células de origen animal u organismos y que también presenta una baja toxicidad y una elevada seguridad, y a una composición para la administración de ARNip.

Antecedentes de la técnica

Se han descubierto diversos tipos de ácidos nucleicos que ejercen funciones fisiológicamente activas dentro de las células mediante los recientes desarrollos biotecnológicos. Por ejemplo, es conocido que el ARN de interferencia pequeño (ARNip) induce la degradación del ARNm de un gen diana existente dentro de las células e inhibe la expresión del gen diana (interferencia de ARN). La función inhibidora de la expresión del gen diana debido a la interferencia del ARN resulta útil para mitigar o tratar síntomas de enfermedad causados por la expresión irregular de genes o grupos génicos particulares, y se prevé el desarrollo de agentes terapéuticos que utilicen el ARNip. Para utilizar ácidos nucleicos, incluyendo el ARNip, como agentes terapéuticos resulta importante que el ARNip funcione en la célula diana y, por lo tanto, resulta esencial establecer técnicas eficientes para administrar los ácidos nucleicos en las células diana.

La utilización de un portador (vector) es conocida como técnica para administrar moléculas de ácidos nucleicos o genes exógenos en el interior de células. Entre los vectores se incluyen vectores víricos y vectores no víricos. Los vectores víricos presentan una elevada eficiencia de transferencia génica; sin embargo, existen diversos aspectos de seguridad desconocidos, incluyendo la patogenicidad, la inmunogenicidad y la citotoxicidad. Por lo tanto, se espera al desarrollo de vectores no víricos, más seguros.

Como portador no vírico de administración de ácidos nucleicos que induce la administración de un ácido nucleico, tal como el ARNip, en las células, se ha informado, por ejemplo, de un lípido catiónico con una estructura específica en el documento de patente nº 1. Sin embargo, el lípido catiónico informado en el documento de patente nº 1 presenta la desventaja de que muestra toxicidad al administrarlo en células en cultivo u organismos vivos. Además, el documento de patente nº 2 da a conocer una composición que contiene un compuesto anfifílico y un policatión como composición portadora que presenta una toxicidad comparativamente reducida y puede administrar el ARNip en las células. Sin embargo, la composición dada a conocer en el documento de patente nº 2 además presenta un problema de seguridad, ya que su citotoxicidad se vuelve no despreciable en el caso de que se introduzca una cantidad suficiente de ARNip en las células.

El documento de patente WO 2005007196 da a conocer moléculas de ARNip que comprenden diestearoilfosfatidilcolina, colesterol, N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi-propilamina:PEG-dimiristilglicerol o PEG-diestearilglicerol.

A partir de la técnica anterior, se ha deseado el desarrollo de una composición portadora para la administración de ARNip que presenta una toxicidad baja y pueda administrar eficientemente un ARNip en las células.

[Documento de patente 1] publicación de patente japonesa no examinada nº 2002-529439
 [Documento de patente 2] publicación de patente japonesa no examinada nº 2005-508394.

50 Exposición de la invención

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es resolver los problemas anteriormente indicados de la técnica anterior. Concretamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición portadora para la administración de ARNip que pueda administrar eficientemente ARNip en las células al administrar un ARNip en células de origen animal o animales y que además presente una toxicidad baja y una seguridad elevada, y una composición para la administración de ARNip que contenga la composición portadora y ARNip. Además, otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para introducir un ARNip en las células que pueda administrar eficientemente el ARNip en las células con una seguridad elevada.

Medios para resolver el problema

Se ha investigado exhaustivamente con el fin de conseguir el objetivo mencionado anteriormente y se ha descubierto que una composición que contiene (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o lípidos catiónicos con un esqueleto de colesterol y (C) una amina primaria alifática, presenta una toxicidad baja y una seguridad elevada,

puede administrar eficientemente ARNip en las células y por lo tanto resulta útil como portador para la administración de ARNip. También se ha descubierto que resulta posible obtener una seguridad más excelente y propiedades de introducción de ARNip mediante la utilización de una composición que contiene los componentes (A) a (C) tras la conformación en una forma liposómica. La presente invención se ha completado realizando mejoras adicionales basándose en estos resultados.

La presente invención proporciona las formas de realización siguientes.

1. Una composición para la administración de ARNip, que comprende:

un ARNip y

una composición portadora para la administración de ARNip, que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en colesterol y lípidos catiónicos que presentan un esqueleto de colesterol, y (C) una amina primaria alifática.

2. La composición para la administración de ARNip según el ítem 1, en la que el componente (A) es una diacilfosfatidilcolina cuya fracción grupo acilo presenta entre 4 y 23 átomos de carbono.

3. La composición para la administración de ARNip según el ítem 1 o 2, en la que el componente (B) es colesterol.

4. La composición para la administración de ARNip según cualquiera de los ítems 1 a 3, en la que el componente (C) es una alquilamina que presenta entre 10 y 20 átomos de carbono.

5. La composición para la administración de ARNip según el ítem 1,

en la que el componente (A) es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina,

el componente (B) es colesterol, y el componente (C) es estearilamina.

6. La composición para la administración de ARNip según cualquiera de los ítems 1 a 5, en la que la proporción molar de componente (A):componente (B):componente (C) es 5-9:1-5:1.

7. La composición para la administración de ARNip según cualquiera de los ítems 1 a 6, en la que la composición portadora para la administración de ARNip es una preparación de liposomas en la que se forma una membrana liposómica a partir de los componentes (A) a (C).

8. La composición para la administración de ARNip según cualquiera de los ítems 1 a 6, que es una preparación de liposomas.

9. La composición según cualquiera de los ítems 1 a 8 para la utilización en medicina.

10. La composición según cualquiera de los ítems 1 a 8 para la utilización en la inhibición de la expresión de un gen diana en células presentes en los organismos vivos.

11. Utilización de una composición portadora que comprende: (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en colesterol y lípidos catiónicos que presentan un esqueleto de colesterol, y (C) una amina primaria alifática y un ARNip, en la preparación de una composición según cualquiera de los ítems 1 a 10.

12. Un procedimiento para la introducción de un ARNip, que comprende la etapa de introducir el ARNip en células en cultivo o en células separadas de organismos vivos mediante la puesta en contacto con las células de la composición para la administración de ARNip según el ítem 1.

Efectos de la invención

La composición portadora para la administración de ARNip y la composición para la administración de ARNip de la invención presenta la ventaja de que puede administrar eficazmente un ARNip en las células, ejerciendo de esta manera una función útil de los ácidos nucleicos en las células y además presenta una toxicidad baja y una seguridad elevada. Por lo tanto, la composición portadora para la administración de ARNip y la composición para la administración de ARNip resultan útiles para el tratamiento de diversas enfermedades mediante la introducción de un ARNip, particularmente el tratamiento de enfermedades intratables que resultan difíciles de tratar con un compuesto de bajo peso molecular.

La composición portadora para la administración de ARNip y la composición para la administración de ARNip de la invención resultan particularmente preferidas para la introducción de ARNip en las células ya que la inducción de la expresión de interferón, que es una reacción adversa del ARNip, puede suprimirse eficazmente.

Además, la composición para la administración de ARNip de la invención además presenta la ventaja de que la composición puede almacenarse en estado liofilizado, ya que puede someterse a un tratamiento de liofilización.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados del ejemplo de ensayo 1, es decir, los resultados de la evaluación de la seguridad para las células de una composición para la administración de ácidos nucleicos.

La figura 2 muestra los resultados de la evaluación de la introducción de ARNip en células mediada por cada composición para la administración de ácidos nucleicos en el Ejemplo de ensayo 2. La ordenada en la figura 2 indica la intensidad media de fluorescencia por cada célula.

La figura 3 muestra los resultados de la evaluación de la introducción de ARNip en las células al modificar la concentración de los lípidos constituyentes (DSPC, colesterol y estearilamina) del portador para la administración de ácidos nucleicos en una composición para la administración de ácidos nucleicos en el ejemplo de ensayo 2.

La figura 4 muestra los resultados de la evaluación de la inhibición de la inducción del interferón por una composición que contiene ARNip para la administración de ácidos nucleicos en el ejemplo de ensayo 3.

Mejor modo de poner en práctica la invención

A continuación se describe en detalle la presente invención.

Portador para la administración de ácidos nucleicos

La composición portadora para la administración de ARNip de la invención comprende: (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) un colesterol y/o lípidos catiónicos que presentan un esqueleto de colesterol, y (C) una amina primaria alifática.

La composición portadora para la administración de ARNip de la invención se utiliza como portador de ARNip para la administración (introducción) de un ARNip en las células.

La composición portadora para la administración de ARNip de la invención presenta la característica útil de inhibir la inducción de la expresión del interferón, que es una reacción adversa del ARNip y, de esta manera, resulta útil para administrar el ARNip en las células. El ARNip para el que se utiliza la composición portadora para la administración de ARNip de la invención puede derivarse de seres humanos, animales, plantas, bacterias y virus, y además puede producirse mediante síntesis química. El ARNip puede modificarse con compuestos químicos, enzimas o péptidos. En la invención, estos ARNip pueden utilizarse solos, o pueden utilizarse en combinación dos o más tipos de los mismos.

La diacilfosfatidilcolina (en adelante en ocasiones denominada "componente (A)") utilizada en la composición portadora para la administración de ácidos nucleicos de la invención no se encuentra específicamente limitada con la condición de que resulte farmacológicamente aceptable, y entre los ejemplos de la misma se incluyen una diacilfosfatidilcolina cuya fracción grupo acilo presente 4 a 23 átomos de carbono. El número de átomos de carbono de dos grupos acilo constituyentes de la diacilfosfatidilcolina puede ser igual o diferente.

Entre los ejemplos concretos de la diacilfosfatidilcolina utilizada en la presente invención se incluyen dilauoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina, palmitoilestearoilfosfatidilcolina, dibutiloilfosfatidilcolina, dihexanoilfosfatidilcolina, diheptanoilfosfatidilcolina, didecanoilfosfatidilcolina, diftanoilfosfatidilcolina, didodecilfosfatidilcolina, dieicosenoilfosfatidilcolina, dihencosanoilfosfatidilcolina, dierucoilfosfatidilcolina, diaraquidonoilfosfatidilcolina y bis(tricosadinoil)fosfatidilcolina. De entre estas diacilfosfatidilcolinas, resulta preferente una diacilfosfatidilcolina la fracción grupo acilo de la cual presenta entre 12 y 18 átomos de carbono; una diacilfosfatidilcolina con una fracción grupo acilo de entre 13 y 17 átomos de carbono, tal como dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina y palmitoilestearoilfosfatidilcolina resulta más preferida; dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina resultan particularmente preferidas y diestearoilfosfatidilcolina resulta más preferida. Estas diacilfosfatidilcolinas pueden utilizarse solas o pueden utilizarse en combinación dos o más tipos de las mismas.

El colesterol y/o derivado del mismo (en adelante denominado en ocasiones "componente (B)") utilizado en la composición portadora para la administración de ARNip de la presente invención no se encuentra específicamente

limitado con la condición de que resulte farmacológicamente aceptable. El derivado de colesterol es un lípido catiónico que presenta un esqueleto de colesterol y entre los ejemplos concretos del mismo se incluyen:

3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Col),
 yoduro de 3β-[N',N',N'-trimetilaminoetano]colesterol (TC-Col),
 bis(guanidino)-tren-colesterosa (BGTC),
 N-colesteriloxicarbonil-3,7-diazanonán-1,9-diamina,

β-alanín-dietanolamina-colesterol, carbamato de colesteril-espermina N⁴ (GL-67), carbamato de colesteril-N[N⁴-3-aminopropil-espermidina (GL-78), carboxamida de colesteril-espermina N⁴ (GL-90), carbamato de N¹,N⁸-bis(arginín-carboxamida) de colesteril-espermidina N⁴ y carbamato de colesteril-N[N¹,N⁴,N⁸-tris(3-aminopropil)espermidina (GL-96). En la invención, el componente (B) preferentemente es colesterol. En la invención, como componente (B), puede utilizarse colesterol y derivados del mismo solo, o pueden utilizarse en combinación dos o más tipos de los mismos.

La amina primaria alifática (en adelante en ocasiones denominada "componente (C)") utilizada en la composición portadora para la administración de ARNip de la invención no se encuentra específicamente limitada con la condición de que resulte farmacológicamente aceptable, y entre los ejemplos de la misma se incluyen una alquilamina cuya fracción grupo alquilo presenta entre 10 y 20 átomos de carbono.

Entre los ejemplos concretos de la amina primaria alifática utilizada en la presente invención se incluyen laurilamina, miristilamina, palmitilamina, estearilamina, oleilamina, decanoilamina y ftanoilamina. De entre estas aminas primarias alifáticas, resulta preferente una alquilamina cuya fracción grupo alquilo presenta entre 12 y 18 átomos de carbono; estearilamina, oleilamina y palmitoilamina resultan más preferentes, y la estearilamina resulta particularmente preferente. Dichas aminas primarias dialifáticas pueden utilizarse solas o pueden utilizarse en combinación dos o más tipos de las mismas.

La composición portadora para la administración de ARNip de la presente invención contiene una combinación de los componentes (A) a (C). Debido al incremento adicional de la eficiencia de la administración de ARNip en las células y la baja toxicidad utilizando las combinaciones siguientes, resulta preferida una combinación de (A) una diacilfosfatidilcolina cuya fracción de grupo acilo presenta entre 4 y 23 átomos de carbono, (B) un colesterol y/o lípidos catiónicos que presentan un esqueleto de colesterol y (C) una alquilamina que presenta entre 10 y 20 átomos de carbono y resulta más preferida una combinación de (A) dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y/o diestearoilfosfatidilcolina, (B) colesterol y (C) estearilamina.

En la composición portadora para la administración de ARNip de la presente invención, no se encuentra específicamente limitada la proporción entre los componentes (A) a (C). Por ejemplo, la proporción molar componente (A):componente (B):componente (C) es 5-9:1-5:1, preferentemente de 6-9:1-4:1, y más preferentemente 7-8:2-3:1. La eficiencia de la administración de un ARNip en las células y la baja toxicidad puede incrementarse adicionalmente mediante la satisfacción de la proporción molar.

La cantidad total de los componentes (A) a (C) basada en la cantidad total de la composición portadora para la administración de ARNip de la presente invención es, por ejemplo, de entre 1% y 100% en peso, preferentemente de entre 20% y 90% en peso, y más preferentemente de entre 30% y 70% en peso.

La composición portadora para la administración de ARNip de la presente invención puede contener, además de los componentes (A) a (C), otros lípidos catiónicos. Entre los ejemplos concretos de lípidos catiónicos se incluyen los lípidos catiónicos unidos con un esteroide, tal como escualamina, 3a,7a,12a-tris(3-aminopropoxi)-5β-colán-24-(N,N-bis(3-aminopropil)amina, 3a,7a-12a-tris(3-aminopropoxi)-5β-colán-24-(N-(N-(3-aminopropil)-3-aminopropil)-amina), 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxi)-5β-colán-24-(N,N-bis(2-cianoetil)amina) y 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxi)-5β-colán-24-(N-(benciloxicarbonil)-N-(3-hidroxipropil)-amina)); lípidos catiónicos unidos con ácido cólico, tales como conjugados de umbrella-espermina; lípidos catiónicos unidos con esterolglucósido; lípidos catiónicos unidos con esteroide-saponina, y lípidos catiónicos de tipo sal de amonio cuaternario, tales como bromuro de dimetildioctadecil-amonio (DDAB), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-dioleoil-3-trimetilamino-propano (DOTAP), sulfato de 1,2-dioleoil-3-trimetilamino-propanometilo, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamino-propano, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano, hidrocloreto de N-(1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetil-amonio (DOTMA), bromuro de dimiristoiloxipropildimetilhidroxietil-amonio (DMRIE), bromuro de dioleiloxipropildimetilhidroxietil-amonio (DORIE), bromuro de dimetildidodecil-amonio, hidrocloreto de N-(a-trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamina, hidrocloreto de N-(a-trimetilamonioacetil)-O,O'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)-L-glutamina, hidrocloreto de O,O'-didodecanoil-N-(a-trimetilaminioacetil)dietanolamina, bromuro de metilalilididodecil-amonio, hidrocloreto de N-{p-(w-trimetilaminiobutiloxi)-benzoil}-didodecil-L-glutamina, bromuro de 9-(w-trimetilaminobutil)-3,6-bis(dodecanoil)carbazol, hidrocloreto de dimetildioctadecil-amonio, bromuro de N-w-trimetilamoniododecanoil-dihexadecil-D-glutamina, bromuro de N-{p-(w-trimetilamoniohexiloxi)-benzoil}-ditetradecil-L-glutamina, bromuro de p-(w-trimetilamoniodeciloxi)-p'-octiloxiazobenceno (MC-1-0810), bromuro de O,O',O"-tridodecanoil-N-(w-trimetil-amoniodecanoil)-tris(hidroximetil)aminometano (TC-1-12), 1,2-dilauril-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dimiristoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dipalmitoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-

diestearoil-glicero-3-etilfosfolina, 1,2-dioleoil-glicero-3-etilfosfolina y 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-etilfosfolina.

En la invención, en el caso de que se encuentren contenidos lípidos catiónicos diferentes de los componentes (A) a (C), la proporción del lípido catiónico no se encuentra específicamente limitada con la condición de que los efectos de la invención no resulten adversamente afectados. La proporción del lípido catiónico es de entre 1 y 10 partes en peso, preferentemente de entre 2 y 8 partes en peso y más preferentemente de entre 4 y 6 partes en peso, por cada 100 partes en peso de la cantidad total de los componentes (A) a (C).

Además, la composición portadora para la administración de ARNip de la invención puede contener una base aceitosa, en caso necesario. Mediante la inclusión de una base aceitosa y utilizando sus características resulta posible controlar la eficiencia del ARNip que debe introducirse con la composición portadora para la administración. Por ejemplo, el ajuste de la gravedad específica de la composición portadora para la administración de ARNip mediante la inclusión de la base aceitosa controla el contacto entre el ARNip y la composición portadora para la administración de ARNip y permite mejorar la eficiencia de introducción in vitro. Además, por ejemplo, mediante la inclusión de un compuesto con una función sensible a la temperatura como la base aceitosa, puede inducirse la fluctuación sobre una superficie celular debido a la alteración nuclear de una composición portadora de ARNip bajo unas condiciones de temperatura dadas, permitiendo de esta manera mejorar la eficiencia de introducción del ARNip. Además, por ejemplo mediante la inclusión de un compuesto con una propiedad de alteración de estimulación externa como la base aceitosa, puede inducirse la fluctuación sobre la superficie celular debido a la alteración nuclear de una composición portadora de ARNip causada por estimulación externa, permitiendo de esta manera mejorar la eficiencia de introducción del ARNip.

Entre los ejemplos de la base aceitosa incluida en la composición portadora para la administración de ARNip de la presente invención se incluyen perfluorocarbono, perfluoropentano, bromuro de perfluorooctilo, perfluorohexano, perfluorotributilamina, aceite de soja, aceite de soja refinado, aceite de soja endurecido, aceite de soja no saponificado, escualeno, aceite de ricino, aceite de clavo, trioleato de sorbitán, aceite de trementina, aceite de cártamo, ácido graso de aceite de cártamo, ácido oleico, aceite de coco, aceite de colza, aceite de camelina, aceite de oliva, aceite de linaza, aceite de sésamo, aceite de clorofila, aceite de croton, 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 semilla de algodón, aceite de yema de huevo, aceite de rosa, aceite de pino, aceite de almendra, aceite de cacahuete, aceite de camelia, aceite de alcanfor blanco, aceite de manzanilla, aceite de canela, aceite de hierbabuena, aceite de maíz esterificado, aceite de pan, aceite de *Anthemis nobilis*, aceite de serpiente, aceite de menta verde, aceite de girasol, manteca de cacao, aceite de germen de trigo, aceite de óxido de cinc, aceite endurecido, aceite vegetal hidrogenado, parafina líquida ligera, parafina líquida, triglicérido de ácido graso de cadena intermedia, aceite de visón, aceite de piel de naranja, aceite de ricino-polioxietileno, aceite de ricino endurecido polioxietileno 10, aceite de ricino endurecido polioxietileno 100, aceite de ricino endurecido polioxietileno 20, aceite de ricino endurecido polioxietileno 40, aceite de ricino endurecido polioxietileno 5, aceite de ricino endurecido polioxietileno 50, aceite de ricino endurecido polioxietileno 60, aceite de ricino polioxil 35 y aceite de proceso. De dichas bases aceitosas, el perfluoropentano presenta una sensibilidad a la temperatura y también presenta la característica de que se volatiliza a 29,5°C. Además, el perfluorohexano, el bromuro de perfluorooctilo y la perfluorotributilamina presentan la propiedad de alteración de estimulación externa y la característica de que se genera cavitación en el núcleo de la composición portadora mediante estimulación externa, tal como la estimulación causada por la irradiación con ultrasonidos, provocando de esta manera la alteración nuclear.

En el caso de que la composición portadora para la administración de ARNip contenga la base aceitosa, la proporción de la misma no se encuentra limitada específicamente con la condición de que los efectos de la invención no resulten afectados adversamente. La proporción de la base aceitosa es de entre 0,1 y 50 partes en peso, preferentemente de entre 1 y 30 partes en peso, y más preferentemente de entre 5 y 20 partes en peso, por cada 100 partes en peso de la cantidad total de los componentes (A) a (C).

Además, la composición portadora para la administración de ARNip de la invención puede contener un lípido fusogénico de membrana. Entre los ejemplos del lípido fusogénico de membrana se 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-dioleoilfosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoileoilfosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina, 1,2-difitanoilfosfoetanolamina, 1,2-diestearoilfosfoetanolamina, 1-palmitoil-2-oleoilfosfoetanolamina, 1-palmitoil-2-(10,12-tricosadinoil)fosfoetanolamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N-caproilamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamín-N-caproilamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N,N-dimetilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamín-N,N-dimetilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamín-N-dodecanoilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N-dodecanoilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N-dodecanilamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamín-N-dodecanilamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N-glutarilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamín-N-glutarilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N-lactosa, 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N-[4-(p-maleimidometil)ciclohexán-carboxilato], dipalmitoilfosfoetanolamín-N-[4-(p-maleimidometil)ciclohexán-carboxilato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamín-N-[4-(p-maleimidofenil)butiramida], 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N-[4-(p-maleimidofenil)butirato], 1,2-dioleoilfosfoetanolamín-N-metilo, dipalmitoilfosfoetanolamín-N-metilo, 1,2-

diololeoilfosfoetanolamín-N-[3-(2-piridilditio)propionato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamín-N-[3-(2-piridilditio)propionato], 1,2-diololeoilfosfoetanolamín-N-(succinilo) y 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamín-N-(succinilo). De estos lípidos fusogénicos de membrana, la diololeoilfosfatidiletanolamina preferentemente se utiliza en la composición portadora para la administración de ácidos nucleicos de la invención.

5 En el caso de que la composición portadora para la administración de ARNip contenga el lípido fusogénico de membrana, la proporción del lípido fusogénico de membrana no se encuentra limitada específicamente con la condición de que los efectos de la invención no resulten afectados adversamente. La proporción del lípido fusogénico de membrana es de entre 1 y 500 partes en peso, preferentemente de entre 10 y 250 partes en peso, y más preferentemente de entre 25 y 100 partes en peso, por cada 100 partes en peso de la cantidad total de los componentes (A) a (C).

15 La composición portadora para la administración de ARNip de la invención puede contener diversos aditivos, tales como agentes isotónicos, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, tampones y conservantes, y vehículos acuosos tales como agua purificada, una solución acuosa de sacáridos, una solución tampón, una solución salina fisiológica, una solución acuosa de polímero y agua sin ARNasa, según su forma. Las cantidades de los aditivos y vehículos acuosos puede fijarse apropiadamente según la forma del portador para la administración de ARNip.

20 La formación de la composición portadora para la administración de ARNip de la invención no se encuentra específicamente limitada con la condición de que pueda incluir el ARNip diana que debe administrarse en las células, y la composición preferentemente se encuentra en la forma de un liposoma.

25 En el caso de que la composición portadora para la administración de ARNip de la invención se encuentre en forma liposómica, los componentes (A) a (C) y otros lípidos, que se añaden opcionalmente, forman una membrana liposómica. En el caso de que se forme el liposoma, puede ser en forma de vesículas unilamelares pequeñas (VUP), vesículas unilamelares grandes (VUG) o vesículas multilamelares (VML). Además, el diámetro de partícula puede fijarse apropiadamente según el tipo de células que debe administrarse, por ejemplo, el diámetro de partícula es de entre 20 y 100 nm para las VUP, de entre 200 y 1.000 nm para las VUG y de entre 400 y 3.500 nm para las VML. El diámetro de partícula se determina utilizando un método de dispersión dinámica de la luz.

35 La producción del liposoma y el ajuste de su diámetro de partícula se implementan según métodos que son conocimientos comunes para el experto en la materia. Más concretamente, el liposoma puede formarse utilizando una fase aceite que contenga los componentes (A) a (C) y una fase acuosa (vehículo acuoso) mediante un método de película delgada, un método de evaporación de fase inversa, un método de infusión de éter, un método de surfactante y un método de calentamiento. Además, el diámetro de partícula puede ajustarse utilizando un método de extrusión, un método de prensa francesa y un método de homogeneización.

40 La composición portadora para la administración de ARNip de la invención se prepara mediante la mezcla de los componentes (A), (B) y (C) y, en caso necesario, otros componentes, y formando apropiadamente la mezcla en una preparación según la forma deseada.

Composición para la administración de ARNip

45 La composición para la administración de ARNip de la invención contiene una composición portadora para la administración de ARNip y ARNip. De esta manera, la composición para la administración de ARNip se utiliza para introducir el ARNip contenido en la composición dentro de las células, que se convierten en la diana de administración.

50 En el caso de que la composición portadora para la administración de ARNip se encuentre en forma liposómica, en la composición para la administración de ARNip, el ARNip puede existir en un estado incluido en la fase acuosa del liposoma, o en un estado unido al interior o exterior de una membrana liposómica mediante un enlace iónico o hidrófobo. Además, en el caso de que la composición portadora para la administración de ARNip no se encuentre en forma liposómica, en la composición para la administración de ARNip, únicamente resulta necesario formar un complejo del ARNip con componentes de la composición portadora para la administración de ARNip mediante un enlace iónico o hidrófobo.

60 La composición para la administración de ARNip de la invención se prepara mediante la mezcla de la composición portadora para la administración de ARNip y ARNip, y la conformación de la mezcla en una forma deseada, o la producción mediante la mezcla de ARNip y componentes de las composiciones portadoras para la administración de ARNip en cualquier orden.

65 En la composición para la administración de ARNip de la presente invención, la proporción de mezcla del ARNip y la composición portadora para la administración de ARNip varía según el tipo de ARNip, la composición portadora para la administración de ARNip utilizada y el tipo de células de la diana de administración. La proporción de ARNip es de entre $1,0 \times 10^{-5}$ y 1,0 partes en peso, preferentemente de entre $1,0 \times 10^{-4}$ y $1,0 \times 10^{-1}$ partes en peso, y más

preferentemente de entre $1,0 \times 10^{-3}$ y $1,0 \times 10^{-2}$ partes, por cada 100 partes en peso de la cantidad total de los componentes (A) a (C) contenidos en la composición portadora para la administración de ARNip.

5 Además, la cantidad total de los componentes (A) a (C) contenidos en la composición para la administración de ARNip es de entre 10% y 90% en peso, preferentemente de entre 30% y 80% en peso, y más preferentemente de entre 40% y 60% en peso, basado en la cantidad total de la composición.

10 La composición portadora para la administración de ARNip de la invención puede contener diversos aditivos, tales como agentes isotónicos, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, agente tamponador y conservantes, y vehículos acuosos tales como agua purificada, una solución acuosa de sacáridos, un tampón, una solución salina fisiológica, según su forma. Las cantidades de los aditivos y vehículos acuosos pueden fijarse apropiadamente según la forma del portador para la administración de ácidos nucleicos.

15 En la invención, entre los ejemplos de las células en las que se administra ARNip se incluyen células en cultivo, células separadas a partir de organismos vivos (incluyendo líneas celulares establecidas) y células presentes en organismos vivos, tales como seres humanos.

20 La forma de la composición para la administración de ARNip de la invención no se encuentra limitada específicamente con la condición de que se utilice una cantidad correcta de la composición para la administración de ARNip de manera que se ponga en contacto con las células diana en las que se ha introducido el ARNip. En el caso de que el ARNip se administre en células presentes en organismos vivos, tales como seres humanos, entre los ejemplos de la aplicación se incluyen la infusión directa en tejidos; las inyecciones intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, digestiva orgánica y endodóntica; la administración por inhalación en la cavidad nasal, la cavidad bucal y los pulmones; la administración oral; la administración percutánea a través de la piel; y la administración mucosa a través de la membrana mucosa oral, la membrana mucosa vaginal, la membrana mucosa ocular, la membrana mucosa rectal y la membrana mucosa uterina. Alternativamente, en el caso de que se administre el ARNip en las células separadas a partir de organismos vivos y células en cultivo, se ejemplifica un método de cultivo de células en presencia de una cantidad apropiada de la composición para la administración de ARNip añadida antes de la incubación. Además, en el caso de que el ARNip se administre en las células separadas a partir de organismos vivos o células en cultivo, el ARNip también puede administrarse en las células incluso en presencia de suero.

35 La cantidad de la composición para la administración de ARNip de la invención aplicada en las células diana de administración se determina según el tipo de ARNip utilizado, el tipo de composición portadora para la administración de ARNip utilizado y el tipo de células diana. Por ejemplo, en el caso de que la diana de administración sean células en seres humanos, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición para la administración de ARNip de la invención se administra en el paciente del que se espera la ganancia terapéutica mediante la administración del ARNip.

40 Ejemplos

A continuación se describe en detalle la invención basándose en ejemplos y similares, aunque la invención no se encuentra limitada a los mismos. En los ejemplos siguientes, la diesteoroilfosfatidilcolina se abrevia como "DSPC", la dipalmitoilfosfatidilcolina se abrevia como "DPPC" y la dimiristoilfosfatidilcolina se abrevia como "DMPC". En los ejemplos de ensayo 1 y 2 siguientes, se utilizó como ARNip el ARNip-GL3 (ARNip de luciferasa de luciérnaga, Dharmacon Co., Boulder, CO, USA; cadena de sentido: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT; cadena antisentido: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT). En el ejemplo de ensayo 3, se utilizó como ARNip el ARNip-MMP-9 humano (Samchully Pharm., Co., Ltd., Corea; cadena de sentido: 5'-CCAACUAUGACCAGGAUAAdTdT-3', cadena antisentido: 5'-UUAUCCUGGUCAUAGUUGGdTdT-3').

50 Ejemplo 1

Preparación de composición portadora que contiene DSPC para la administración de ARNip

55 Se pesó DSPC, colesterol y estearilamina en una proporción molar de 7:3:1 y después se disolvieron en cloroformo utilizando un matraz de recuperación. La solución se secó bajo presión reducida utilizando un evaporador giratorio, formando una membrana lipídica delgada. Tras añadir agua tratada con DEPC (fabricada por Ambion Co., agua sin ARNasa) a la solución de manera que su concentración de DSPC fuese de 30 mg/ml, se ajustó el diámetro de partícula de la solución resultante pasándola a través de una membrana con un diámetro de poro de 100 nm utilizando un extrusor, a fin de preparar una composición portadora para la administración de ARNip en forma liposómica catiónica.

Ejemplo 2Preparación de composición portadora que contiene DPPC para la administración de ARNip

- 5 Análogamente al ejemplo 1, excepto en que se utilizó DPPC en lugar de DSPC, se preparó una composición portadora para la administración de ARNip en una forma liposómica catiónica.

Ejemplo 310 Preparación de composición portadora que contiene DMPC para la administración de ARNip

Análogamente al ejemplo 1, excepto en que se utilizó DMPC en lugar de DSPC, se preparó una composición portadora para la administración de ARNip en una forma liposómica catiónica.

15 **Ejemplo 4**Preparación de composición portadora que contiene DSPC para la administración de ARNip

- 20 Se preparó una solución que contenía ARNip a una concentración de 2 μM (solución de ARNip) utilizando una solución preparada mediante la dilución de 20 x tampón Tris-EDTA (TE) (fabricado por Invitrogen Co.) 20 veces con agua tratada con DEPC (fabricada por Ambion Co., agua sin ARNasa). A continuación, se mezcló una cantidad igual de la composición portadora para la administración de ácidos nucleicos del ejemplo 1 y la solución de ARNip para formar un lipoplejo (complejo), obteniendo de esta manera una composición para la administración de ARNip.

25 **Ejemplo 5**Preparación de composición portadora que contiene DPPC para la administración de ARNip

- 30 Se preparó una solución que contenía ARNip a una concentración de 2 μM (solución de ARNip) utilizando una solución preparada mediante la dilución de 20 x tampón Tris-EDTA (TE) (fabricado por Invitrogen Co.) 20 veces con agua tratada con DEPC (fabricada por Ambion Co., agua sin ARNasa). A continuación, se mezcló una cantidad igual de la composición portadora para la administración de ARNip del ejemplo 2 y la solución de ARNip para formar un lipoplejo (complejo), obteniendo de esta manera una composición para la administración de ARNip.

35 **Ejemplo 6**Preparación de composición portadora que contiene DMPC para la administración de ARNip

- 40 Se preparó una solución que contenía ARNip a una concentración de 2 μM (solución de ARNip) utilizando una solución preparada mediante la dilución de 20 x tampón Tris-EDTA (TE) (fabricado por Invitrogen Co.) 20 veces con agua tratada con DEPC (fabricada por Ambion Co., agua sin ARNasa). A continuación, se mezcló una cantidad igual de la composición portadora para la administración de ácidos nucleicos del ejemplo 3 y la solución de ARNip para formar un lipoplejo (complejo), obteniendo de esta manera una composición para la administración de ARNip.

45 **Ejemplo de ensayo 1: ensayo de evaluación de la seguridad para las células**

- La evaluación se llevó a cabo utilizando un ensayo de MTS. Para el ensayo de MTS se utilizó un ensayo de proliferación celular en solución CellTiter 96 Aqueous One fabricado por Promega Co. Concretamente, se inocularon células A594 (ATCC, USA) a razón de $3,16 \times 10^4$ células/pocillo en 200 μl de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero de feto bovino (FBS) al 10% en volumen en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Tras enjuagar con una solución salina tamponada de Hank (HBSS) 3 veces, se cambió el medio a DMEM sin FBS y después se añadieron 20 μl de cada una de las composiciones para la administración de ácidos nucleicos de los ejemplos 4 a 6 a cada pocillo y se incubaron a 37°C bajo 5% de CO_2 durante 4 horas. A continuación, se cambió el sobrenadante de cultivo en los pocillos a DMEM con FBS al 10% en vol. y se incubó nuevamente a 37°C bajo 5% de CO_2 durante 20 horas. Se añadieron a cada pocillo 20 μl de un reactivo de MTS (metanotiosulfonato) y 100 μl de un medio DMEM con FBS al 10% en volumen, se incubaron durante 2 horas, seguido de la determinación de la absorbancia a 492 nm y el cálculo posterior de la viabilidad celular. Se calculó la viabilidad celular fijando como 100% la absorbancia a 492 nm determinada sin adición de la composición para la administración de ácidos nucleicos incubada bajo las condiciones anteriormente indicadas.

- 60 Se muestran los resultados en la figura 1. Tal como se muestra en la figura 1, resultó evidente que todas las composiciones para la administración de ARNip de los ejemplos 4 a 6 presentaban una citotoxicidad reducida y una seguridad elevada. En particular, se confirmó que la seguridad era significativamente elevada en las composiciones para la administración de ARNip utilizando DSPC o DPPC como la diacilfosfatidilcolina (ejemplo 4 o 5).

65

Ejemplo de ensayo 2: ensayo de evaluación de la eficiencia de administración de ARNip en las células

Se evaluó la introducción intracelular de ARNip mediante la medición de la intensidad de fluorescencia de ARNip marcado con FITC utilizando la citometría de flujo. En el presente ensayo, se utilizó una composición para la administración de ácidos nucleicos preparada con ARNip premarcado con FITC. Concretamente, se inocularon células A594 (ATCC, USA) a razón de 5×10^5 células/pocillo en 500 μ l de DMEM con FBS al 10% en vol. en una palca de 24 pocillos y se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 24 horas. Tras enjuagar tres veces con HBSS, se cambió el medio a DMEM que no contenía FBS y después se añadieron 0,05 ml de cada una de las composiciones para la administración de ácidos nucleicos de los Ejemplos 4 a 6 a cada pocillo y se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 4 horas. A continuación, el sobrenadante de cultivo en los pocillos se cambió a DMEM con FBS al 10% en vol. y nuevamente se incubó a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas. Cada pocillo se enjuagó con HBSS una vez y se añadieron 0,2 ml de CellScrubBuffer (Gene Therapy Systems, Inc.), seguido de la incubación a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 15 minutos. Nuevamente se enjuagaron los pocillos con HBSS 2 veces y se desengancharon células adheridas al fondo del pocillo utilizando tripsina y se recogieron mediante centrifugación y después las células resultantes se suspendieron en HBSS. Se filtró la suspensión a través de una membrana con un diámetro de poro de 41 μ m. Se midió la intensidad de fluorescencia de las células utilizando citometría de flujo a las 2 horas y 24 horas después de la adición de las composiciones para la administración de ácidos nucleicos. A modo de control también se midió de la manera indicada anteriormente la intensidad de fluorescencia de una composición de control para la administración de ácidos nucleicos obtenida mediante la mezcla de una solución de Lipofectamina 2000™ (Invitrogen) utilizada con frecuencia como vector génico disponible comercialmente, diluido con medio OptiMEM a 0,1 mg/ml, y solución de ARNip diluida con tampón TE a una concentración de 2 μ M en una proporción de volúmenes de 1:1.

Se muestran los resultados en la figura 2. A partir de dichos resultados, se confirmó que la ARNip se incorporaba en las células en cualquier caso de composición para la administración de ARNip de los ejemplos 4 a 6. En particular, en las composiciones para la administración de ácidos nucleicos utilizando DSPC o DMPC como la diacilfosfatidilcolina (ejemplos 4 y 6), se puso de manifiesto que la introducción de ARNip 2 horas después de la adición era significativamente elevada en comparación la Lipofectamina™ 2000 utilizada con frecuencia como vector génico disponible comercialmente y que las composiciones presentaban características favorables de excelente acción rápida.

Además, se produjo un portador para la administración de ARNip con una concentración de DSPC de entre 7,5 y 30 mg/ml de la misma manera que en el Ejemplo 1, utilizando DSPC, colesterol y estearilamina (DSPC:colesterol:estearilamina=7:3:1 en proporción molar, en lo sucesivo denominado colectivamente "lípidos constituyentes del portador para la administración de ARNip"). Se formó un lipoplejo (complejo) mediante la mezcla de una cantidad igual de dicho portador para la administración de ARNip y tampón TE que contenía ARNip 200 nM y la composición para la administración de ARNip. Mediante la utilización de la composición para la administración de ARNip preparada de esta manera, se evaluó la introducción de ARNip en las células de la misma manera que la indicada anteriormente. Se muestran los resultados en la figura 3. A partir de estos resultados, al modificar la concentración del lípido constituyente del portador para la administración de ARNip, se modificó correspondientemente la cantidad de ARNip introducida en las células medidas por la composición para la administración de ARNip. Además, se encontró que el lípido constituyente del portador para la administración de ARNip mostraba un valor de cantidad de ARNip introducido a las 24 horas de la adición en comparación 2 horas después de la adición a cualquier concentración y que la desaparición del ARNip se iniciaba 24 horas después de la adición. Por lo tanto, los resultados también revelan que resulta posible administrar ARNip dentro de las células en un periodo de tiempo corto, de 2 horas, tras la adición, mediante la utilización de la combinación de DSPC, colesterol y estearilamina como portador para la administración de ARNip y que las composiciones presentan características favorables de excelente acción rápida.

Ejemplo de ensayo 3: ensayo de evaluación de la inhibición de la inducción del interferón

Se inocularon células A594 (ATCC, USA) a razón de 5×10^5 células/pocillo en 500 μ l de DMEM con FBS al 10% en vol. en una palca de 24 pocillos y se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 24 horas. Tras enjuagar tres veces con HBSS, se añadieron a cada pocillo 450 μ l de medio DMEM que no contenía FBS; además, se añadieron 50 μ l de la composición para la administración de ARNip del ejemplo 4 a cada pocillo y se incubó a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 4 horas. A continuación, se cambió el sobrenadante de cultivo en los pocillos por DMEM con FBS al 10% en vol. y se incubó nuevamente a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas. Tras enjuagar tres veces con HBSS, las células adheridas sobre el fondo del pocillo se desengancharon utilizando tripsina y se recogieron mediante centrifugación. Se extrajo el ARN de las células resultantes utilizando Rneasy Plus Mini (Qiagen) y después se obtuvo el ADNc mediante transcripción utilizando el kit QutantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Mediante la utilización del ADNc resultante, el ensayo QutantiTectPrimer (Qiagen) e iCycler iQ (Bio-RAD), se cuantificó el ARNm de IFIT-1, que es un gen inductor del interferón, mediante PCR en tiempo real. A modo de control se cuantificó el ARNm de IFIT-1 en una composición de control para la administración de ácidos nucleicos obtenida mediante la mezcla de una solución de Lipofectamina 2000™ (Invitrogen), utilizada con frecuencia como vector génico disponible comercialmente, diluida con medio OptiMEM a 0,1 mg/ml y la solución de ARNip diluida con tampón TE a una concentración de 2 μ M en una proporción de volúmenes de 1:1 de la manera indicada anteriormente. A modo de gen

de mantenimiento para corregir la cuantificación se utilizó ARN 18r. Además, a modo de blanco, se cuantificó el ARNm de IFIT-1 bajo las condiciones anteriormente indicadas sin adición de la composición para la administración de ARNip.

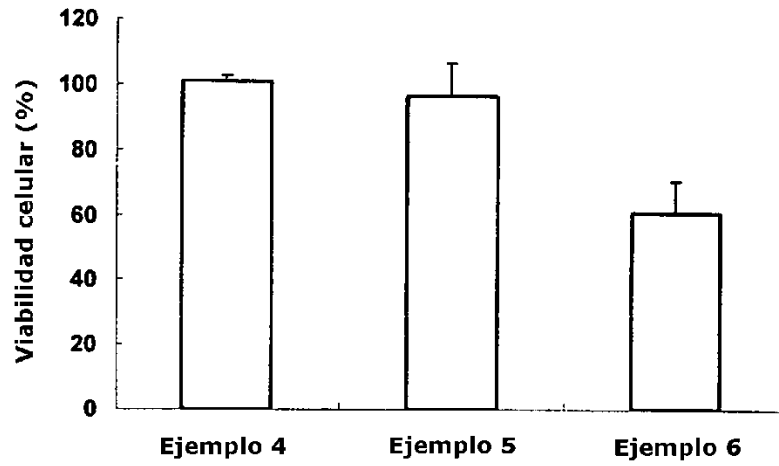
- 5 Se muestran los resultados en la figura 4. La composición para la administración de ARNip del ejemplo 4 utilizando DSPC mostró una inducción significativamente baja de interferón en comparación con la composición de control para la administración de ARNip utilizando Lipofectamina™ 2000. Los resultados revelaron que resulta posible inhibir la inducción del interferón, que es un efecto adverso del ARNip, utilizando la composición para la administración de ARNip de la presente invención.

10

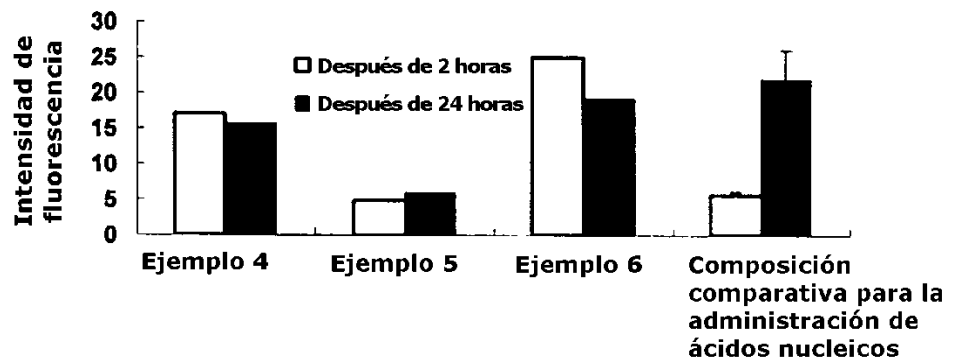
REIVINDICACIONES

1. Composición para la administración de ARNip, que comprende:
 - 5 un ARNip, y
una composición portadora para la administración de ARNip, que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en colesterol y lípidos catiónicos que presentan un esqueleto de colesterol, y (C) una amina primaria alifática.
- 10 2. Composición para la administración de ARNip según la reivindicación 1, en la que el componente (A) es una diacilfosfatidilcolina cuya fracción grupo acilo presenta 4 a 23 átomos de carbono.
- 15 3. Composición para la administración de ARNip según la reivindicación 1 o 2, en la que el componente (B) es el colesterol.
- 20 4. Composición para la administración de ARNip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el componente (C) es una alquilamina que presenta 10 a 20 átomos de carbono.
- 25 5. Composición para la administración de ARNip según la reivindicación 1,
en la que el componente (A) es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina,
el componente (B) es el colesterol, y
el componente (C) es la estearilamina.
- 30 6. Composición para la administración de ARNip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proporción molar de componente (A):componente (B):componente (C) es 5-9:1-5:1.
- 35 7. Composición para la administración de ARNip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición portadora para la administración de ARNip es una preparación de liposomas en la que se forma una membrana liposómica de los componentes (A) a (C).
- 40 8. Composición para la administración de ARNip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es una preparación de liposomas.
- 45 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la utilización en medicina.
- 50 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la utilización en la inhibición de la expresión de un gen diana en células existentes en los organismos vivos.
11. Utilización de una composición portadora que comprende: (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en colesterol y lípidos catiónicos que presentan un esqueleto de colesterol, y (C) una amina primaria alifática y un ARNip, en la preparación de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Procedimiento para la introducción de un ARNip, que comprende la etapa de introducir el ARNip en células cultivadas o en células separadas a partir de organismos vivos mediante la puesta en contacto de la composición para la administración de ARNip según la reivindicación 1 con las células.

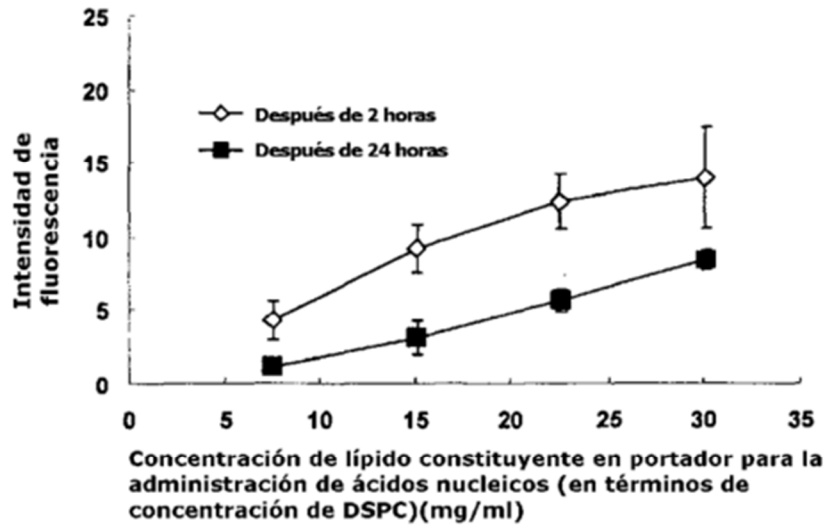
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

