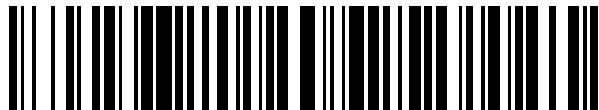


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 874**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2010 E 10748819 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2405001**

54 Título: **Complejo de ácidos nucleicos y composición de administración de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

04.03.2009 JP 2009051312

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

12.08.2015

73 Titular/es:

TAKEUCHI, HIROFUMI (50.0%)
c/o Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1
Mitahorahigashi
Gifu-shi, Gifu 502-8585, JP y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

TAKEUCHI, HIROFUMI;
TOZUKA, YUICHI;
MURATA, MITSUTAKA y
TOYOBUKU, HIDEKAZU

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 542 874 T3

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

DESCRIPCIÓN

Complejo de ácidos nucleicos y composición de administración de ácidos nucleicos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un complejo de ácidos nucleicos de baja toxicidad y elevada seguridad, que presenta una excelente capacidad de administración de una molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN o inhibir la traducción en una célula, y una composición de administración de ácidos nucleicos capaz de administrar eficientemente el complejo de ácidos nucleicos hasta el interior de la célula.

Antecedentes de la técnica

Los últimos avances biotecnológicos han conducido al descubrimiento de diversas moléculas de ácidos nucleicos que muestran funciones intracelulares de interferencia por ARN. Por ejemplo, el ARNip (ARN interfiriente pequeño) es conocido por su capacidad de causar la degradación del ARNm de un gen diana en una célula, inhibiendo de esta manera la expresión del gen diana (interferencia del ARN). Esta función de inhibición de la expresión del gen diana debido a la interferencia por ARN resulta eficaz para aliviar o tratar presentaciones de enfermedad causadas por la expresión anormal de genes o agrupaciones de genes específicos; por lo tanto, se prevé el desarrollo de agentes terapéuticos que utilicen ARNip. Sin embargo, el ARNip y otras terapias génicas plantean el problema de que, debido a que la molécula de ácido nucleico es un polímero de carga negativa soluble en agua, presenta una eficiencia de administración intracelular de los genes extremadamente baja, resultando en un efecto terapéutico ineficiente.

La utilización de un portador (vector) es conocido que administra eficientemente genes en las células. Los vectores se clasifican en vectores víricos y no víricos. A pesar de su elevada eficiencia de introducción de los ácidos nucleicos, los vectores víricos presentan algunos problemas de seguridad, entre ellos la patogenicidad, la inmunogenicidad y la citotoxicidad. Por lo tanto, se desea la utilización de vectores no víricos para el uso clínico.

Entre los ejemplos de vectores no víricos se incluyen la lipofectaminaTM 2000, que ya se encuentra disponible comercialmente, un lípido catiónico (ver el documento de patente nº 1) que presenta una estructura específica y una composición (ver el documento de patente nº 2) que contiene un compuesto anfífilico y un polication. La administración de una molécula de ácidos nucleicos en una célula utilizando un vector no vírico se lleva a cabo mediante la mezcla de una molécula de ácidos nucleicos con un vector no vírico, que forma un complejo, y poniendo en contacto el complejo con la célula diana. En el caso de que el vector no vírico sea capaz de formar un liposoma, el vector se incorpora en una célula con un ácido nucleico encapsulado en el liposoma, llevando a cabo de esta manera la administración de los ácidos nucleicos.

Sin embargo, las moléculas de ácidos nucleicos capaces de interferencia por ARN, tales como el ARNip, presentan una característica particular: son inestables y presentan una elevada carga negativa. Por lo tanto, se reduce problemáticamente la estabilidad al mezclar la molécula de ácidos nucleicos con un vector catiónico como vector no vírico debido a la neutralización de la carga, lo que perjudica la administración continua de las moléculas de ácidos nucleicos hasta el interior de la célula. Aunque se conoce un ejemplo en el que se atrapa un ácido nucleico en un liposoma mediante la formación de un complejo del ARNip y el polímero catiónico (ver el documento no de patente nº 1), no se ha confirmado su eficacia práctica en términos de la citotoxicidad del polímero catiónico. Además, aunque los vectores no víricos conocidos pueden formar complejos estables con las moléculas de ácidos nucleicos, el problema de un rendimiento de administración insuficiente hasta el interior de la célula sigue existiendo o, aunque la administración se realice con éxito, el tiempo de retención del complejo en la célula es corto. Por estos motivos los vectores no víricos conocidos adolecen del defecto de que no pueden mantener la molécula de ácidos nucleicos dentro de la célula, dificultando la provisión constante de los efectos deseados de la molécula de ácidos nucleicos.

Bartlett *et al.* (ver el documento no de patente nº 2) se refieren a la caracterización físicoquímica y biológica de las nanopartículas dirigidas que contienen ácidos nucleicos.

A partir de dichas circunstancias de la técnica anterior, ha existido una demanda de una técnica que garantice una elevada seguridad y baja toxicidad de la administración de las moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo de ARNip, capaces de interferir por ARN o de inhibir la traducción en una célula, y de mantener continuamente las moléculas de ácidos nucleicos dentro de la célula.

60 [Documentos de patente]

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

65 [Documentos no de patente]

[Documento no de patente nº 1] Kintaro Kogure *et al.*, Development of a Non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method, J. Control. Release 98:317-323, 2004.

5 [Documento no de patente nº 2] Dereke W. Bartlett *et al.*, Physicochemical and Biological Characterization of Targeted, Nucleic Acid-Containing Nanoparticles, Bioconjugate Chem. 18:456-468, 2007.

Sumario de la invención

Problema técnico

10 Un objetivo de la presente invención es resolver el problema anteriormente indicado de la técnica anterior. Concretamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un complejo de ácidos nucleicos de baja toxicidad y elevada seguridad que presente una excelente capacidad de administrar una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia del ARN o inhibición de la traducción en una célula, y una composición de administración de ácidos nucleicos capaz de administrar eficientemente el complejo de ácidos nucleicos hasta el interior de una célula. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición médica que contiene la composición de administración de ácidos nucleicos y un procedimiento para administrar una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia por ARN o inhibición de la traducción en una célula mediante la puesta en contacto de la composición de administración de ácidos nucleicos con una célula.

Solución al problema

20 Los inventores de la presente invención han llevado a cabo una amplia investigación para resolver los problemas anteriormente indicados y han encontrado que, mediante la mezcla de una molécula de ácidos nucleicos (una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción) que debe introducirse en una célula y un compuesto cicloamilosa, resulta posible formar un complejo que presenta una baja toxicidad y una elevada seguridad y que es capaz de administrar la molécula de ácidos nucleicos hasta dentro de la célula. Los presentes inventores han descubierto además que la seguridad, eficacia de administración intracelular y persistencia intracelular de los ácidos nucleicos puede mejorarse adicionalmente mediante la utilización, como portador de administración de ácidos nucleicos para la introducción del complejo de ácidos nucleicos en la célula, de un portador que comprende: (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado del mismo, y (C) una amina primaria alifática. La presente invención se ha llevado a cabo llevando a cabo una investigación adicional basándose en dichos resultados.

35 Concretamente, la presente invención proporciona invenciones con los aspectos siguientes tal como se indica en las reivindicaciones:

[Ítem 1]

40 Un complejo de ácidos nucleicos que comprende por lo menos un compuesto cicloamilosa seleccionado de entre el grupo que consiste en cicloamilosa y derivados de la misma, y una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción, en la que el compuesto cicloamilosa presenta un grado de polimerización de entre 10 y 100.

[Ítem 2]

45 El complejo de ácidos nucleicos según el ítem 1, en el que la cantidad del compuesto cicloamilosa es de entre 1 y 4.000 partes en peso por cada parte en peso de la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción.

[Ítem 3]

50 El complejo de ácidos nucleicos según el ítem 1, en el que la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción es ARNip.

[Ítem 4]

55 El complejo de ácidos nucleicos según el ítem 1, que es un agregado obtenido mediante la mezcla de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción con un compuesto cicloamilosa en una solución acuosa.

[Ítem 5]

60 Una composición de administración de ácidos nucleicos que comprende el complejo de ácidos nucleicos según cualquiera de los ítems 1 a 4 y un portador de administración de ácidos nucleicos.

[Ítem 6]

65 La composición de administración de ácidos nucleicos según el ítem 5, en la que el portador de administración de ácidos nucleicos es una composición que comprende: (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un elemento seleccionado de entre colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática.

[Ítem 7]

La composición de administración de ácidos nucleicos según el ítem 6, en la que el componente (A) en el portador de administración de ácidos nucleicos es una diacilfosfatidilcolina en la que la fracción acilo presenta entre 4 y 23 átomos de carbono.

5

[Ítem 8]

La composición de administración de ácidos nucleicos según el ítem 6, en la que el componente (B) en el portador de administración de ácidos nucleicos es colesterol.

10

[Ítem 9]

La composición de administración de ácidos nucleicos según el ítem 6, en la que el componente (C) en el portador de administración de ácidos nucleicos es una alquilamina que presenta entre 10 y 20 átomos de carbono.

[Ítem 10]

15 La composición de administración de ácidos nucleicos según el ítem 6, en la que la proporción molar de componentes (A):(B):(C) es de 5-9:1-5:1.

[Ítem 11]

20 La composición de administración de ácidos nucleicos según el ítem 6, en la que el portador de administración de ácidos nucleicos es una preparación de liposomas en la que se forma una membrana liposómica a partir de los componentes (A) a (C).

[Ítem 12]

25 Una composición farmacéutica que comprende la composición de administración de ácidos nucleicos según cualquiera de los ítems 5 a 11.

[Ítem 13]

30 Utilización de por lo menos un compuesto cicloamilosa seleccionado de entre el grupo que consiste en cicloamilosa y derivados del mismo, y una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción, produciendo un complejo de ácidos nucleicos en el que el compuesto cicloamilosa presenta un grado de polimerización de entre 10 y 100.

[Ítem 14]

35 Utilización del complejo de ácidos nucleicos según cualquiera de los ítems 1 a 4 y un portador de administración de ácidos nucleicos para producir una composición de administración de ácidos nucleicos.

[Ítem 15]

40 Utilización del complejo de ácidos nucleicos según cualquiera de los ítems 1 a 4 para producir un producto farmacéutico para la administración de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción en una célula.

[Ítem 16]

45 Un procedimiento para administrar una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN en una célula, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto por lo menos un compuesto cicloamilosa seleccionado de entre el grupo que consiste en cicloamilosa y derivados de la misma, y una composición de ácidos nucleicos que contiene una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción, con una célula *in vitro* o *ex vivo*, en el que el compuesto cicloamilosa presenta un grado de polimerización de entre 10 y 100.

50

[ítem 17]

El procedimiento según el ítem 16, en el que la composición de administración de ácidos nucleicos según cualquiera de los ítems 5 a 11 se pone en contacto con una célula.

Efectos ventajosos de la invención

55

El complejo de ácidos nucleicos de la presente invención, que es un complejo de ácidos nucleicos obtenido mediante la formación de un complejo utilizando una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción y un compuesto cicloamilosa, es un complejo de ácidos nucleicos altamente seguro que permite administrar la molécula de ácidos nucleicos hasta el interior de la célula y que es capaz de ejercer el efecto de interferir por ARN derivado de la molécula de ácidos nucleicos en la célula. Además, el complejo de ácidos nucleicos de la presente invención puede combinarse fácilmente con un portador de administración de ácidos nucleicos y puede encapsularse fácilmente incluso en un portador de administración de ácidos nucleicos en una forma liposómica. Por lo tanto, el complejo de la presente invención también resulta excelente por su facilidad de formulación en una composición de administración de ácidos nucleicos. Además, la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención puede introducir el complejo de ácidos nucleicos en la célula.

60

65

Para la administración del complejo de ácidos nucleicos de la presente invención en la célula, la utilización de un portador que comprende: (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado del mismo y (C) una amina primaria alifática, como portador para la administración intracelular puede incrementar la eficiencia de la administración intracelular del complejo de ácidos nucleicos y puede mejorar además la persistencia y la seguridad de la administración intracelular.

Tal como se ha explicado anteriormente, el complejo de ácidos nucleicos y la composición para la administración de ácidos nucleicos de la presente invención permite que la molécula de ácidos nucleicos ejerza eficazmente su interferencia del ARN y presenta una elevada seguridad. Por lo tanto, resulta particularmente útil como medicamento para la terapia génica. De esta manera, la composición farmacéutica o el procedimiento de administración de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción en la célula según la presente invención puede administrar una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o inhibir la traducción en la célula más eficazmente.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: la figura 1 muestra los resultados del ejemplo de ensayo 3, más concretamente los resultados de una evaluación de la seguridad celular de la composición de administración de ácidos nucleicos (liposomalización y método Lipoplex). En la figura, la expresión "grupo de control" se refiere al caso en el que no se ha añadido la composición de administración de ácidos nucleicos del ejemplo 2; la "liposomalización" se refiere al caso en que se añade la composición de administración de ácidos nucleicos del ejemplo 2 preparada mediante liposomalización y el "método Lipoplex" se refiere al caso en que se añade la composición de administración de ácidos nucleicos del ejemplo 2 preparada mediante el método Lipoplex.

Figura 2: la figura 2 muestra los resultados de una evaluación de la introducción del ARNip en las células mediada por la composición de administración de ácidos nucleicos (liposomalización) en el ejemplo de ensayo 4. La ordenada en la figura 2 indica la intensidad media de fluorescencia por cada célula. En la figura, la "liposomalización" se refiere a una composición de administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2 preparada mediante liposomalización.

Descripción de formas de realización

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación.

(1) Complejo de ácidos nucleicos

El complejo de ácidos nucleicos de la presente invención se caracteriza por que comprende una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción, y un compuesto cicloamilosa.

El tipo y la estructura de la molécula de ácidos nucleicos utilizada para el complejo de ácidos nucleicos de la presente invención no se encuentran particularmente limitados en la medida en el que el complejo sea capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción en el interior de una célula y muestre su efecto al ser administrada dentro de la célula. El número de bases de la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción no se encuentra limitado en la medida en que la capacidad de interferir por ARN o la capacidad de inhibir la traducción se encuentren garantizadas. Por ejemplo, la molécula presenta entre 30 y 80 bases, preferentemente entre 38 y 64 bases, y más preferentemente entre 38 y 54 bases. En los casos en que la molécula de ácidos nucleicos forma un dímero u otro complejo multimérico, los números de bases ejemplificados de la molécula de ácidos nucleicos indican el número total de bases del dímero o de otro complejo multimérico.

Entre los ejemplos de moléculas de ácidos nucleicos capaces de interferir por ARN o de inhibir la traducción se incluyen cualesquiera moléculas conocidas en el campo relacionado, tales como moléculas de ARN, incluyendo ARNip, ARNhp, ARNmi y ARN no codificante. Entre ellos, el ARN pequeño, tal como el ARNip, el ARNhp y el ARNmi, y particularmente el ARNip, resultan preferentes. El ARNip presenta la desventaja de que su estabilidad se reduce en coexistencia con los vectores no víricos conocidos; sin embargo, al ser procesado para formar el complejo de ácidos nucleicos de la presente invención, consigue una estabilidad superior y la capacidad de administración dentro de la célula. Las longitudes de bases de la hebra codificante y de la hebra no codificante de ARNip no se encuentran particularmente limitadas en la medida en que las cadenas garanticen la capacidad de interferencia del ARNip; por ejemplo, cada una de las cadenas presenta entre 10 y 50 bases, preferentemente entre 15 y 30 bases, más preferentemente entre 19 y 23 bases y particularmente preferentemente 21 bases. El ARNip puede presentar una estructura en la que la hebra codificante y la hebra no codificante se hibriden y uno o ambos extremos pueden formar una parte protuberante (extremo colgante) o un extremo romo. Además, en el caso de que uno o ambos extremos del ARNip formen una parte colgante, la parte colgante puede estar formada de ácido desoxirribonucleico (ADN).

Además, el gen diana de la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción, en otras palabras, el gen diana sometido a supresión mediante interferencia de ARN o inhibición de la traducción, se selecciona apropiadamente según el uso pretendido, etc., del complejo de ácidos nucleicos de la presente invención.

Desde un punto de vista médico, es conocido que, por ejemplo, los genes del factor $\beta 1$ de crecimiento transformante (FCT- $\beta 1$), Smad3, proteína 1 quimioatrayente de monocitos (PQM-1), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), el factor de crecimiento del tejido conectivo (FCTC), etc. participan en enfermedades concretas, y que la supresión de la expresión de estos genes resulta eficaz para aliviar las enfermedades. Por lo tanto, las moléculas de ácidos nucleicos capaces de inducir la interferencia del ARN o la inhibición de la traducción de dichos agentes son un ejemplo preferente de la molécula de ácidos nucleicos.

La secuencia de bases de la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN puede diseñarse según el gen diana. Pueden utilizarse cualesquiera métodos de diseño conocidos de secuencia en el campo relacionado.

La molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción utilizada para el complejo de ácidos nucleicos de la presente invención puede derivarse de seres humanos, animales, plantas, bacterias, virus o similares, o puede sintetizarse químicamente. Además, las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla, de doble cadena o de triple cadena, y no se encuentran limitadas por el peso molecular. Además, en la presente invención, la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción puede modificarse químicamente, enzimáticamente o con un péptido. Además, en la presente invención, las moléculas de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más.

El compuesto cicloamilosa utilizado para el complejo de ácidos nucleicos de la presente invención es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en cicloamilosa y derivados de la misma.

La cicloamilosa es un α -1,4-glucano cíclico formado de glucosas unidas mediante enlace α -1,4 y presenta una parte hueca estereoscópica con un cierto grado de profundidad en el interior de la estructura de hélice. El grado de polimerización de la glucosa en la cicloamilosa utilizada para la presente invención no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, el grado de polimerización es generalmente de entre 10 y 500, preferentemente de entre 10 y 100 y más preferentemente de entre 22 y 50. La cicloamilosa puede prepararse a partir de glucosa utilizando un enzima, tal como amilomaltasa. Además, debido a que la cicloamilosa se encuentra disponible comercialmente, la presente invención puede utilizar un producto comercial.

Los derivados de cicloamilosa utilizados para la presente invención no se encuentran limitados en la medida en que sean farmacológicamente aceptables. Entre los ejemplos de ellos se incluyen derivados que contienen alquilo, tal como metilo, etilo, propilo o similar (número de carbonos=1 a 18); derivados que contienen hidroxialquilo, tal como hidroximetilo, hidroxipropilo, hidroxipropilo o similares (número de carbonos=1 a 4), y derivados que contienen un azúcar, tal como monosacáridos, oligosacáridos, aminoazúcares, o similares.

En la presente invención, la cicloamilosa o derivado de la misma puede utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más. Entre la cicloamilosa y los derivados de la misma resulta preferente la cicloamilosa.

En el complejo de ácidos nucleicos de la presente invención, la proporción entre el compuesto de cicloamilosa y la molécula de ácidos nucleicos no se encuentra particularmente limitada sino que habitualmente es de entre 1 y 4.000 partes en peso, preferentemente entre 10 y 1.000 partes en peso y más preferentemente entre 100 y 400 partes en peso, del compuesto cicloamilosa por cada parte en peso del ácido nucleico. En términos de proporción molar, la proporción anteriormente indicada es, por ejemplo, de entre 0,1 y 1.000 moles, preferentemente de entre 1 y 100 moles, y más preferentemente de entre 10 y 20 moles, del compuesto cicloamilosa por cada mol del ácido nucleico. La satisfacción de dicha proporción permite que sea más notable la continuidad de la administración intracelular del ácido nucleico con un portador de administración de ácidos nucleicos y la seguridad del mismo.

El diámetro medio de partícula del complejo de ácidos nucleicos de la presente invención habitualmente es de entre 6 y 60 nm y preferentemente de entre 8 y 40 nm. El diámetro medio de partícula del complejo de ácidos nucleicos se mide como diámetro de partícula medio en volumen utilizando un método de dispersión dinámica de luz láser.

El complejo de ácidos nucleicos de la presente invención es un complejo formado mediante agregación de la molécula de ácidos nucleicos y el compuesto cicloamilosa. El complejo de ácidos nucleicos de la presente invención se produce mediante la mezcla de la molécula de ácidos nucleicos y el compuesto cicloamilosa en una solución que puede dispersar establemente las dos sustancias. Entre los ejemplos concretos de soluciones que pueden dispersar establemente la molécula de ácidos nucleicos y el compuesto de cicloamilosa se incluyen tampones tales como Tris y similares. Los tampones pueden contener agentes quelantes tales como ácido etilén-diamina-tetraacético (EDTA) y similares. Las condiciones para la mezcla de la molécula de ácidos nucleicos y el compuesto cicloamilosa puede ser tales que, en la solución anteriormente indicada, por ejemplo entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 100 μ M, preferentemente entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 10 μ M, del ácido nucleico se mezclan con entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 1.000 μ M, y preferentemente entre aproximadamente 10 μ M y aproximadamente 100 μ M, del compuesto de cicloamilosa, a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 a 100 minutos, y preferentemente durante aproximadamente 5 a 10 minutos. El complejo de ácidos nucleicos de la presente invención producido de esta manera se encuentra presente en forma de una dispersión en la solución. La

dispersión puede mezclarse sin modificación o, tras dilución o concentración en caso necesario, con un portador de administración de ácidos nucleicos.

(2) Composición de administración de ácidos nucleicos

El complejo de ácidos nucleicos se incorpora en un portador de administración de ácidos nucleicos mediante la mezcla con el portador de administración de ácidos nucleicos y de esta manera se consigue que la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN o de inhibir la traducción pueda administrarse dentro de la célula. Es decir, la presente invención proporciona además una composición de administración de ácidos nucleicos que comprende el complejo de ácidos nucleicos y un portador de administración de ácidos nucleicos.

El portador de administración de ácidos nucleicos es un vector no vírico utilizado como portador de ácidos nucleicos para administrar (introducir) una molécula de ácidos nucleicos en la célula. La composición de administración de ácidos nucleicos es una composición utilizada mediante la puesta en contacto con la célula en la que debe administrarse el ácido nucleico, con el fin de introducir el ácido nucleico contenido en la composición en la célula.

Formulación del portador de administración de ácidos nucleicos

El portador de administración de ácidos nucleicos utilizado en la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención no se encuentra limitado con la condición de que sea capaz de incorporar un complejo de ácidos nucleicos en la célula. Entre los ejemplos de portadores de administración de ácidos nucleicos utilizables se incluyen los portadores conocidos, tales como Lipofectamine™ 2000 y similares.

Desde el punto de vista de mejorar adicionalmente el rendimiento de administración de la molécula de ácidos nucleicos contenida en el complejo de ácidos nucleicos y mejorar adicionalmente la eficiencia y la seguridad de la administración intracelular resulta preferido utilizar, por ejemplo, un portador que comprende: (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado del mismo y (C) una amina primaria alifática (en adelante denominada "Portador 1").

La diacilfosfatidilcolina (en adelante en ocasiones denominada componente (A)) utilizada en el Portador 1 no se encuentra limitada con la condición de que resulte farmacológicamente aceptable y puede ser, por ejemplo, una diacilfosfatidilcolina en la que la fracción acilo presenta entre 4 y 23 átomos de carbono. El número de carbonos de los dos grupos acilo que constituyen la diacilfosfatidilcolina puede ser igual o diferente.

Entre los ejemplos específicos de diacilfosfatidilcolinas se incluyen dilauoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina, palmitoilestearoilfosfatidilcolina, dibutiloilfosfatidilcolina, dihexanoilfosfatidilcolina, diheptanoilfosfatidilcolina, didecanoilfosfatidilcolina, diftanoilfosfatidilcolina, didodecilfosfatidilcolina, dieicosanoilfosfatidilcolina, dihénicosanoilfosfatidilcolina, dierucoilfosfatidilcolina, diaraquidonoilfosfatidilcolina, bis(tricosadinoil)fosfatidilcolina, etc. De entre ellos, entre los ejemplos preferentes se incluyen diacilfosfatidilcolinas en la que la fracción acilo presenta entre 12 y 18 átomos de carbono; entre los ejemplos más preferentes se incluyen dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina, palmitoilestearoilfosfatidilcolina, y diacilfosfatidilcolinas similares en las que la fracción acilo presenta entre 13 y 17 átomos de carbono; entre los ejemplos particularmente preferentes se incluyen dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina, y entre los ejemplos más preferentes se incluyen diestearoilfosfatidilcolina. Dichas diacilfosfatidilcolinas pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más.

El colesterol y/o un derivado del mismo (en adelante en ocasiones denominado componente (B)) utilizado en el Portador 1 no se encuentra limitado con la condición de que resulte farmacológicamente aceptable. Los derivados de colesterol son lípidos catiónicos con un esqueleto de colesterol y entre los ejemplos específicos se 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-colesteriloxicarbonil-3,7-diazanonan-1,9-diamina, β-alanín-dietanolamín-colesterol, carbamato de N⁴-esperimín-colesterilo (GL-67), carbamato de N⁴-3-aminopropilespermidín]colesterilo (GL-78), carboxamida de N⁴-esperimín-colesterilo (GL-90), carbamato de N¹,N⁶-bis(arginín-carboxamida)-N⁴-espermidín-colesterilo (GL-95) y carbamato de N-[N¹,N⁴,N⁸-tris(3-aminopropil)espermidín]colesterilo (GL-96). Entre los ejemplos preferidos del componente (B) se incluyen el colesterol. En el Portador 1, el colesterol y los derivados del mismo pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más a modo de componente (B).

La amina primaria alifática (en adelante en ocasiones denominada componente (C)) utilizada en el Portador 1 no se encuentra limitada con la condición de que resulte farmacológicamente aceptable y puede ser, por ejemplo, una alquilamina en la que la fracción alquilo presenta entre 10 y 20 átomos de carbono.

Entre los ejemplos específicos de aminas primarias alifáticas se incluyen laurilamina, miristilamina, palmitilamina, estearilamina, oleilamina, decanoilamina, ftanoilamina, etc. Entre ellos, las alquilaminas en las que la fracción alquilo presenta entre 12 y 18 átomos de carbono resultan preferentes; resultan más preferentes estearilamina, oleilamina y palmitoilamina y resulta especialmente preferente la estearilamina. Estas aminas primarias alifáticas pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más.

Para el Portador 1 que comprende una combinación de componentes (A) a (C) indicados anteriormente, resulta más preferido disponer las combinaciones siguientes en orden a fin de mejorar adicionalmente la eficiencia de la administración intracelular de ácidos nucleicos y reducir adicionalmente la toxicidad: (A) una diacilfosfatidilcolina en la que la fracción acilo presenta entre 4 y 23 átomos de carbono, (B) colesterol y/o un derivado del mismo, y (C) una alquilamina C₁₀₋₂₀, y más preferentemente, (A) dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y/o diestearoilfosfatidilcolina, (B) colesterol y (C) estearilamina.

En el portador 1, la proporción entre los componentes (A) y (C) no se encuentra limitada y puede ser, por ejemplo, una proporción molar de componente (A):(B):(C) de 5-9:1-5:1, preferentemente de 6-9:1-4:1, y más preferentemente de 7-8:2-3:1. La satisfacción de dicha proporción permite conseguir una administración intracelular de ácidos nucleicos de eficiencia adicionalmente mejorada y de toxicidad más baja.

La cantidad total de los componentes (A) a (C) en la cantidad total de portador 1 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.

El portador 1 puede contener, además de los componentes (A) a (C), otros lípidos catiónicos. Entre los ejemplos específicos de lípidos catiónicos utilizables se incluyen escualamina, 3a,7a,12a-tris(3-aminopropoxi)-5β-colan-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-colan-24-(N,N-bis(2-cianoetil)amina)), 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxi)-5,3-colan-24-(N-(benciloxicarbonil)-N-(3-hidroxi)propil)amina), y lípidos catiónicos similares a los que se encuentran unidos esteroides; conjugados de umbrela-espermina y lípidos catiónicos similares a los que se encuentra unido el ácido cólico; lípidos catiónicos a los que se encuentran unidos esteroil-glucósido; lípidos catiónicos a los que se encuentra unido el esteroide saponina; sal bromuro de dimetildioctadecil-amonio (DDAB), 1,2-dimiristoil-3-trimetil-amonio-propano, 1,2-dioleoil-3-trimetil-amonio-propano (DOTAP), metilsulfato de 1,2-dioleoil-3-trimetil-amonio-propano, 1,2-dipalmitoil-3-trimetil-amonio-propano, 1,2-diestearoil-3-trimetil-amonio-propano, hidrocloreto de N-(1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetil-amonio (DOTMA), sal bromuro de dimiristoiloxipropil-dimetilhidroxietil-amonio (DMRIE), bromuro de dioleoiloxipropil-dimetilhidroxietil-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-trimetilamonioacetil)diestanolamina, bromuro de metilalil-didodecil-amonio, hidrocloreto de N-{p-(w-trimetilamoniobutiloxi)benzoil}-didodecil-L-glutamina, bromuro de 9-(w-trimetilamoniobutil)-3,6-bis(dodecanoil)carbazol, hidrocloreto de dimetildioctadecil-amonio, bromuro de N-w-trimetilamoniodecanoil-dihexadecil-D-glutamina, bromuro de N-{p-(w-trimetilamoniohexiloxi)-benzoil}-ditetradecil-L-glutamina, sal bromuro de p-(w-trimetilamoniodeciloxi)-p'-octiloxiazobenceno (MC-1-0810), sal bromuro de p-{w-(b-hidroxi)etil}dimetil-amonio-deciloxi)-p'-octiloxiazobenceno (MC-3-0810), sal 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-glicerol-3-etilfosfocolina, 1,2-dioleoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1-palmitoil-2-oreoil-glicero-3-etilfosfocolina y lípidos catiónicos de tipo sal amónica cuaternaria similares, etc.

En el caso de que el portador 1 contenga un lípido catiónico diferente de los componentes (A) a (C), la proporción del lípido catiónico no se encuentra limitada con la condición de que los efectos de la presente invención no resulten afectados negativamente y puede ser, por ejemplo, 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 los componentes (A) a (C) en total.

El portador 1 puede contener además una base aceitosa, en caso necesario. La adición de una base aceitosa y la utilización de sus propiedades permite controlar la eficiencia de la introducción de los ácidos nucleicos por el portador 1. Por ejemplo, en el caso de que se añada una base aceitosa para ajustar la gravedad específica del portador 1, puede controlarse el contacto de la célula con el portador 1, mejorando de esta manera la eficiencia de introducción *in vitro*. Además, por ejemplo, en el caso de que se añada una base aceitosa con una función de sensibilidad térmica, el núcleo del portador de ácidos nucleicos puede desintegrarse bajo condiciones térmicas predeterminadas para inducir fluctuaciones en la superficie celular, mejorando de esta manera la eficiencia de introducción de la molécula de ácidos nucleicos. Además, por ejemplo, en el caso de que se añade una base aceitosa que presenta la capacidad de ser alterada por un estímulo externo, el núcleo del portador 1 puede resultar desintegrado por un estímulo externo, induciendo fluctuaciones en la superficie celular y mejorando de esta manera la eficiencia de introducción de la molécula de ácidos nucleicos.

Entre los ejemplos de bases aceitosas que pueden añadirse al portador 1 se incluyen perfluorocarbono, perfluoropentano, bromuro de perfluorooctilo, perfluorohexano, perfluorotributilamina, aceite de soja, aceite de soja refinado, aceite de soja hidrogenado, 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 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 semilla 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 de cáñfor blanco, aceite de manzanilla, aceite de canela, aceite de hierbabuena, aceite de maíz esterificado, aceite de ginebra, aceite de manzanilla romana, aceite de serpiente, aceite de menta verde, aceite de girasol, manteca de cacao, aceite de germen de trigo, aceite de óxido de cinc, aceites endurecidos, aceite vegetales hidrogenados, parafina líquida ligera, parafina líquida, triglicéridos de ácido graso de cadena intermedia, aceite de visón, aceite de naranja amarga, aceite de ricino-polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado-polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado-polioxietileno 10, aceite de ricino hidrogenado-polioxietileno 100, aceite de ricino hidrogenado-polioxietileno 20, aceite de ricino hidrogenado-polioxietileno 40, aceite de ricino hidrogenado-polioxietileno 5, aceite de ricino hidrogenado-polioxietileno 50, aceite de ricino hidrogenado-polioxietileno 60, aceite de ricino polioxilo 35, aceites de proceso, etc. Entre dichas bases aceitosas, el perfluoropentano es sensible a la temperatura y presenta la propiedad de hervir a 29,5°C y de esta manera convertirse en un gas. Además, el perfluorohexano, el bromuro de perfluorooctilo y la perfluorotributilamina presenta la capacidad de resultar alterados por un estímulo externo y presentan la propiedad de causar la cavitación en el núcleo del portador 1 y de desintegrarlo al recibir un estímulo externo, tal como la irradiación ultrasónica.

En el caso de que se encuentre contenido una base aceitosa, la proporción de la misma no se encuentra limitada con la condición de que los efectos de la presente invención no resulten alterados negativamente, y puede ser, por ejemplo, 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 los componentes (A) a (C) en total.

El portador 1 puede contener además un lípido fusogénico de membrana (lípido ayudante) en caso necesario. En el caso de que contenga un lípido fusogénico de membrana, el portador 1 presenta una eficiencia de administración intracelular de moléculas de ácidos nucleicos adicionalmente mejorada. Entre los ejemplos de dichos lípidos fundibles con membrana se incluyen dioleoilfosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina, trans-fosfatidilfosfatidiletanolamina, 1,2-bis(10,12-tricosadinoil)-fosfoetanolamina, 1,2-dilaidoilfosfoetanolamina, 1,2-dihexadecilfosfoetanolamina, 1,2-dihexanoilfosfoetanolamina, 1,2-dilauroilfosfoetanolamina, 1,2-dilinoilfosfoetanolamina, 1,2-dimiristoilfosfoetanolamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina, 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-dioleoilfosfoetanolamin-N-caproilamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamin-N-caproilamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-caproilamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N,N-dimetilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamin-N-dodecanoilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-dodecanoilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-dodecanilamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamin-N-dodecanilamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-glutarilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamin-N-glutarilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-lactosa, 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-[4-(p-maleimidemetil)ciclohexán-carboxilato], dipalmitoilfosfoetanolamin-N-[4-(p-maleimidemetil)ciclohexán-carboxilato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamin-N-[4-(p-maleimidafenil)butilamida], 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-[4-(p-maleimidafenil)butirato], 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-metilo, dipalmitoilfosfoetanolamin-N-metilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-[3-(2-piridilditio)propionato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamin-N-[3-(2-piridilditio)propionato], 1,2-dioleoilfosfoetanolamin-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamin-N-(succinilo), etc. Entre dichos lípidos, puede utilizarse ventajosamente en el portador 1 la dioleoilfosfatidiletanolamina.

En el caso de que se encuentre contenido un lípido fusogénico de membrana, la proporción del mismo no se encuentra limitada con la condición de que los efectos de la presente invención no resulten afectados negativamente y pueden ser, por ejemplo, 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 los componentes (A) a (C) en total.

El portador 1 puede contener diversos aditivos, tales como agentes isotónicos, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, tampones y conservantes, y/o vehículos acuosos, tales como agua purificada, soluciones acuosas de azúcar, soluciones tampón, solución salina fisiológica, soluciones acuosas de polímero y agua sin ARNasa, según la forma de utilización. Las cantidades de dichos aditivos y vehículos acuosos que deben añadirse pueden seleccionarse convenientemente según la forma de utilización del portador de administración de ácidos nucleicos.

Forma del portador de administración de ácidos nucleicos

La forma del portador de administración de ácidos nucleicos no se encuentra limitada en la medida en que el complejo de ácidos nucleicos que debe administrarse en una célula pueda encapsularse, aunque preferentemente se encuentra en forma de liposoma. Por ejemplo, en el caso de que el portador 1 presente la forma de un liposoma, los componentes (A) a (C), y opcionalmente otros lípidos utilizados, forman una membrana liposómica.

En el caso de que el portador de administración de ácidos nucleicos se encuentre en forma de un liposoma, puede ser una vesícula unilamelar pequeña (VUP), una vesícula unilamelar grande (VUG) o una vesícula multilamelar (VML). El diámetro de partícula de la misma se selecciona convenientemente según el tipo de célula en la que se administra el ácido nucleico y puede ser, por ejemplo, de entre aproximadamente 20 y 100 nm para las VUP, de entre aproximadamente 200 y 1.000 nm para las VUG y de entre aproximadamente 400 y 3.500 nm para las VML. El diámetro de partícula del liposoma se mide utilizando un método de dispersión dinámica de luz láser.

Se utilizan métodos conocidos en la técnica para producir el liposoma y ajustar el diámetro de partícula del mismo. Por ejemplo, en el caso del portador 1, puede formarse un liposoma mediante un método de película delgada, un método de evaporación de fase inversa, un método de inyección de éter, un método de surfactante, un método de calentamiento, o similar, utilizando una fase aceite que contiene los componentes (A) a (C) y una fase acuosa (vehículo acuoso). El diámetro de partícula puede ajustarse mediante un método de extrusión, un método de prensa francesa, un método de homogeneización o similar.

15 Forma, formulación y procedimiento de utilización de la composición de administración de ácidos nucleicos

En el caso de que el portador de administración de ácidos nucleicos se encuentre en forma de un liposoma, el complejo de ácidos nucleicos en la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención puede encontrarse presente en un estado encapsulado dentro de la fase acuosa interna del liposoma, o en un estado unido a la superficie interna o externa de la membrana liposómica mediante un enlace iónico o hidrófobo. Resulta preferido el primer estado. Además, en el caso de que el portador de administración de ácidos nucleicos se encuentre en una forma diferente de un liposoma, el complejo de ácidos nucleicos en la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención forma un complejo Lipoplex con componentes del portador de administración de ácidos nucleicos mediante un enlace iónico o hidrófobo.

La composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención se produce mediante la mezcla del complejo de ácidos nucleicos con el portador de administración de ácidos nucleicos y la formulación de la mezcla en una forma deseada, o mediante la mezcla de los ingredientes del complejo de ácidos nucleicos y la composición portadora de administración de ácidos nucleicos en un orden arbitrario y la formulación de la mezcla en una forma deseada.

En la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención, la proporción entre el complejo de ácidos nucleicos y el portador de administración de ácidos nucleicos depende del tipo de complejo de ácidos nucleicos, del tipo de portador de administración de ácidos nucleicos, del tipo de célula diana, etc. Por ejemplo, la proporción puede ser de entre 1 y 100 partes en peso, preferentemente de entre 10 y 100 partes en peso y más preferentemente de entre 20 y 100 partes en peso, del complejo de ácidos nucleicos por cada 100 partes en peso de la cantidad total del portador de administración de ácidos nucleicos. Más concretamente, en el caso de que se utilice el portador 1 como el portador de administración de ácidos nucleicos, la proporción puede ser de entre 1 y 100 partes en peso, preferentemente de entre 10 y 100 partes en peso y más preferentemente de entre 20 y 100 partes en peso del complejo de ácidos nucleicos, basado en la cantidad total, es decir, 100 partes en peso de los componentes (A) a (C) contenidos en el portador 1.

Además, en la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención, el contenido del complejo de ácidos nucleicos no se encuentra particularmente limitado; por ejemplo, el contenido del complejo de ácidos nucleicos en la composición de administración de ácidos nucleicos puede ser de entre 1% y 50% en peso, preferentemente de entre 10% y 50% en peso, más preferentemente de entre 15% y 50% en peso, basado en el contenido total de la composición de administración de ácidos nucleicos.

Además, en el caso de que se utilice el portador 1 como el portador de administración de ácidos nucleicos, la cantidad total de los componentes (A) a (C) contenida en el portador 1 puede ser, por ejemplo, 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 de la cantidad total de la composición de administración de ácidos nucleicos.

La composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención puede contener diversos aditivos, tales como agentes isotónicos, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, tampones y conservantes, y/o portadores tales como agua purificada, soluciones acuosas de glucosa, soluciones tampón y solución salina fisiológica, según la forma de utilización. Las cantidades de dichos aditivos y portadores se seleccionan según la forma de utilización de la composición de administración de ácidos nucleicos.

La composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención puede utilizarse por sí misma como producto farmacéutico para la terapia génica, es decir como una composición farmacéutica para la administración de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción en la célula. En el caso de que la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención se utilice como composición farmacéutica, el portador de administración de ácidos nucleicos, aditivo y bases anteriormente indicados se seleccionan de entre las farmacológicamente aceptables. En el caso de que la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención se utilice como composición farmacéutica, la

composición farmacéutica puede formularse en diversas formas farmacéuticas. Entre los ejemplos de la forma de la composición farmacéutica de la presente invención se incluyen preparaciones líquidas, tales como soluciones (incluyendo jarabes y similares), gotas e inyecciones, y preparaciones sólidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos, gránulos y cápsulas (incluyendo cápsulas blandas). En el caso de que la composición farmacéutica de la presente invención sea una preparación líquida, puede conservarse mediante congelación, o mediante liofilización para eliminar el agua. Las preparaciones liofilizadas, jarabes secos, etc., se redisuelven en agua que ha sido destilada para la utilización mediante inyección, agua que ha sido esterilizada, etc., en el momento de la utilización. Además, en el caso de que la composición farmacéutica de la presente invención sea una preparación sólida, puede redisolverse en agua que ha sido destilada, para la utilización mediante inyección, agua que ha sido esterilizada, etc.

En la presente invención, la célula en la que debe administrarse la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción, o en otras palabras, la célula diana de la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención, es cualquier célula en la medida en que requiera la interferencia con el ARN o la inhibición de la traducción del gen diana mediante la utilización de la molécula de ácidos nucleicos, o una célula dentro de un tejido que requiere la interferencia del ARN o la inhibición de la traducción del gen diana. Entre los ejemplos de las mismas se incluyen una célula en cultivo, una célula aislada a partir de un organismo (incluyendo líneas celulares establecidas) y una célula *in vivo*. Pueden obtenerse a partir de un ser humano o de un animal no humano. La composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención puede aplicarse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Además, por ejemplo en el caso de que la supresión de la expresión de un gen específico en un tejido que presenta una enfermedad causada por la expresión de dicho gen específico resulte eficaz para tratar o aliviar la enfermedad, la enfermedad puede tratarse mediante la introducción de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN con respecto al gen específico en las células del tejido enfermo.

En la presente invención puede administrarse en una célula una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia por ARN o de inhibición de la traducción mediante la etapa de puesta en contacto de la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención con una célula. El procedimiento de puesta en contacto de la composición de administración de ácidos nucleicos con una célula no se encuentra limitado en la medida en que se ponga en contacto una cantidad adecuada de la composición de administración de ácidos nucleicos con la célula en la que debe introducirse la molécula de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el procedimiento puede ser igual a un procedimiento anteriormente conocido de terapia génica, e igualmente la cantidad que debe ponerse en contacto: se seleccionan convenientemente el procedimiento y la cantidad. Por lo tanto, la aplicación de la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención en la célula permite la fácil administración intracelular de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción y el mantenimiento de la molécula de ácidos nucleicos administrada de manera estable dentro de la célula.

Por ejemplo, para poner en contacto la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención con una célula *in vitro*, la célula se cultiva en presencia de una cantidad adecuada de la composición de administración de ácidos nucleicos. Además, para poner en contacto la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención con una célula en cultivo o con una célula aislada a partir de un organismo *in vitro*, el contacto puede llevarse a cabo en presencia de suero sanguíneo. Para poner en contacto la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención con una célula *in vivo*, la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención puede ponerse en contacto con la célula mediante, por ejemplo, la inyección directa en un tejido, la inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intraocular, o la inyección en el tracto digestivo, un diente o similar, la administración mediante inhalación en la cavidad nasal, la cavidad oral, los pulmones o similar, la administración oral, la administración transdérmica, la administración transmucosa a través de la mucosa oral, la mucosa vaginal, la mucosa ocular, la mucosa rectal o la mucosa uterina, o similar.

Además, al aplicar la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula, la aplicación se lleva a cabo con una cantidad eficaz de la composición de administración de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la cantidad de moléculas de ácidos nucleicos capaces de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción contenidas en la composición de administración de ácidos nucleicos es de entre 0,001 pmoles y 10 pmoles, preferentemente de entre 0,01 pmoles y 1 pmol, y más preferentemente de entre 0,01 pmoles y 0,1 pmoles, en cada célula.

La composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención permite la administración intracelular de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción. Más concretamente, la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención resulta útil para administrar la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción, la cual presenta la forma de un complejo de administración de ácidos nucleicos y se encuentra contenida en la composición de administración de ácidos nucleicos, en una célula mediante la puesta en contacto de la composición de administración de ácidos nucleicos con la célula.

(3) procedimiento para la administración de una molécula de ácidos nucleicos en una célula

La presente invención proporciona además un procedimiento para la administración de una molécula de ácidos nucleicos en una célula. El procedimiento de administración de una molécula de ácidos nucleicos en una célula según la presente invención comprende la etapa de poner en contacto el complejo de ácidos nucleicos o de la composición de administración de ácidos nucleicos indicada anteriormente, con la célula. El contacto entre el complejo de ácidos nucleicos o la composición de administración de ácidos nucleicos y la célula no se encuentra limitado en la medida en que se ponga en contacto una cantidad adecuada del complejo de ácidos nucleicos o de la composición de administración de ácidos nucleicos, con la célula en la que se introduce la molécula de ácidos nucleicos.

De esta manera, mediante la puesta en contacto del complejo de ácidos nucleicos o de la composición de administración de ácidos nucleicos con una célula, puede mantenerse establemente dentro de la célula la molécula de ácidos nucleicos. Para la puesta en contacto con la célula, el complejo de ácidos nucleicos puede utilizarse solo o en combinación con un aditivo o un portador listado anteriormente. Para una administración intracelular más eficiente de la molécula de ácidos nucleicos, resulta preferente poner en contacto la composición de administración de ácidos nucleicos con la célula.

En la presente invención, tal como se ha indicado anteriormente, la célula en la que se administra la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción no se encuentra limitada en la medida en que requiera la interferencia con el ARN o la inhibición de la traducción del gen diana por parte de la molécula de ácidos nucleicos, o en la medida en que sea una célula en un tejido que requiera la interferencia con el ARN o la inhibición de la traducción del gen diana. Entre los ejemplos de la misma se incluyen una célula en cultivo, una célula aislada a partir de un organismo (incluyendo líneas celulares establecidas) y una célula *in vivo*. Puede derivarse de un ser humano o de un animal no humano. El contacto de la composición de administración de ácidos nucleicos de la presente invención con la célula puede llevarse a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Además, por ejemplo en el caso de que la supresión de la expresión de un gen específico en un tejido que presenta una enfermedad causada por la expresión de dicho gen específico resulte eficaz para tratar o aliviar la enfermedad, la enfermedad podrá tratarse mediante la introducción de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interferir por ARN del gen específico en las células del tejido enfermo.

Por ejemplo, para poner en contacto el complejo de ácidos nucleicos o la composición de administración de ácidos nucleicos con una célula *in vitro*, la célula puede cultivarse en presencia de una cantidad adecuada del complejo de ácidos nucleicos o de la composición de administración de ácidos nucleicos. Para poner en contacto el complejo de ácidos nucleicos o la composición de administración de ácidos nucleicos con una célula en cultivo o una célula aislada a partir de un organismo *in vitro*, el contacto puede llevarse a cabo en presencia de suero sanguíneo. En el caso de que se ponga en contacto el complejo de ácidos nucleicos o la composición de administración de ácidos nucleicos con una célula *in vivo*, el complejo de ácidos nucleicos o la composición de administración de ácidos nucleicos puede ponerse en contacto con la célula mediante, por ejemplo, inyección directa en un tejido, inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intraocular, o mediante inyección en el tracto digestivo, un diente o similar, mediante la administración por inhalación en la cavidad nasal, la cavidad oral, los pulmones o similar, la administración oral, la administración transdérmica, la administración transmucosal en la mucosa oral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa rectal o mucosa uterina, o similar.

En el procedimiento para la administración de ácidos nucleicos en una célula según la presente invención, una cantidad eficaz del complejo de ácidos nucleicos o de la composición de administración de ácidos nucleicos se pone en contacto con una célula a fin de introducir la molécula de ácidos nucleicos capaz de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción, dentro de la célula. Por ejemplo, la cantidad del complejo de ácidos nucleicos o de la composición de administración de ácidos nucleicos que debe administrarse se selecciona de manera que se administren por cada célula entre 0,001 y 10 pmoles, preferentemente entre 0,01 y 1 pmol y más preferentemente entre 0,01 y 0,1 pmoles de las moléculas de ácidos nucleicos capaces de interferencia con el ARN o de inhibición de la traducción.

El procedimiento de administración de la presente invención puede llevarse a cabo mediante el contacto de la composición de administración de ácidos nucleicos con la célula.

Ejemplos

La presente invención se describe más concretamente a continuación, basándose en ejemplos y similares. Sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada a estos ejemplos. En los Ejemplos y Ejemplos de ensayos siguientes, a modo de ARNip se utilizó GL3-ARNip (ARNip para la luciferasa de luciérnaga, Dharmacon Research, Inc. (Boulder, Colo.), USA; hebra codificante: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdtdT (SEC ID nº 1), hebra no codificante: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT (SEC ID nº 2). A modo de cicloamilosa se utilizó cicloamilosa (grado de polimerización=22 a 50 (peso molecular medio en peso=6.000 a 8.000), Wako Pure Chemical Ind.).

Ejemplo 1Preparación de un complejo que contiene ARNip y cicloamilosa

5 Se preparó una solución que contenía ARNip a una concentración de 2 μM (solución de ARNip) utilizando una solución tampón de Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka Co., Ltd.). Además, se preparó una solución que contenía cicloamilosa a una concentración de 25 μM (solución de cicloamilosa) utilizando una solución tampón de Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka). Se mezclaron cantidades iguales de dichas soluciones durante un minuto, formando un complejo de ARNip.

10

Ejemplos comparativos 1 a 4Preparación de un complejo que contiene ARNip y ciclodextrina

15 Se preparó una solución que contenía ARNip a una concentración de 2 μM (solución de ARNip) utilizando una solución tampón de Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka Co., Ltd.). Además, se preparó una solución que contenía α -ciclodextrina a una concentración de 2 μM (solución de α -ciclodextrina) utilizando una solución tampón de Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka). Se mezclaron cantidades iguales de dichas soluciones durante un minuto para formar un complejo de ARNip (Ejemplo comparativo 1).

20

Bajo condiciones iguales a las del Ejemplo comparativo 1, excepto por la utilización de una solución que contenía ARNip a una concentración de 20 μM (solución de ARNip), se preparó un complejo de ARNip (Ejemplo comparativo 2).

25 Se preparó una solución que contenía ARNip a una concentración de 2 μM (solución de ARNip) utilizando una solución tampón de Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka Co., Ltd.). Además, se preparó una solución que contenía γ -ciclodextrina a una concentración de 2 μM (solución de γ -ciclodextrina) utilizando una solución tampón de Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka). A temperatura ambiente se mezclaron cantidades iguales de dichas soluciones, formando un complejo de ARNip (Ejemplo comparativo 3).

30

Bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo comparativo 3, excepto por la utilización de una solución que contenía ARNip a una concentración de 20 μM (solución de ARNip), se preparó un complejo de ARNip (Ejemplo comparativo 4).

Ejemplo de ensayo 1Mediciones del diámetro de partícula y el potencial zeta de un complejo de ARNip

40 Se midieron los diámetros de partícula de los complejos de ARNip obtenidos en el Ejemplo 1 y en los Ejemplos comparativos 1 y 2, y el potencial zeta de las soluciones que contenían los complejos de ARNip. Los diámetros de partícula mostrados son los diámetros medios de partícula (nm) medidos utilizando un ZETASIZER 300HSA (MALVERN INSTRUMENTS) (el diámetro de partícula medio en volumen se midió utilizando un método de difracción láser). El potencial zeta se midió utilizando un ZETASIZER 300HSA (MALVERN INSTRUMENTS).

45

[Tabla 1]

	Diámetro de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
Ejemplo 1	33,0	-12,8
Ejemplo comparativo 1	No detectado	No detectado
Ejemplo comparativo 2	400,0	-25,2
Ejemplo comparativo 3	No detectado	No detectado
Ejemplo comparativo 4	631,4	-32,0

Se observó agregación en los complejos de ARNip de los Ejemplos comparativos 1 a 4.

50 Los resultados demostraron que, mediante la producción de un complejo de ARNip utilizando cicloamilosa, resulta posible producir un complejo de ARNip que presenta un menor diámetro de partícula que los producidos utilizando α -ciclodextrina o γ -ciclodextrina. Cuanto menor sea el diámetro de partícula del complejo de ARNip, más fácil resulta introducirlo en la célula. Por lo tanto, se confirmó que el complejo de ARNip que utilizaba cicloamilosa resultaba adecuado para la administración intracelular.

Ejemplo 2Preparación de una composición de administración de ácidos nucleicos que contiene un complejo de ARNip

5 Se pesaron diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol y estearilamina en una proporción molar de 7:3:1 y se disolvieron en cloroformo utilizando un matraz de tipo berenjena (matraz de recuperación). Se secó la solución bajo presión reducida utilizando un evaporador giratorio para formar una capa de membrana delgada lipídica. Se añadió la solución que contenía 0,014 mg/ml de un complejo de ARNip obtenida en el Ejemplo 1 a la capa de membrana delgada lipídica resultante de manera que la solución presentase una concentración de DSPC de 30 mg/ml y después se mezcló. A continuación, se ajustó el diámetro de partícula de la solución pasando la solución a través de membranas que presentaban diámetros de poro de 800 nm y 200 nm utilizando un extrusor, a fin de preparar una composición para la administración de ARNip en una forma liposómica catiónica.

[Ejemplo 2: liposomalización]

15 Se añadió la solución tampón de Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka) a la capa de membrana delgada lipídica resultante de manera que la solución presentase una concentración de DSPC de 63,2 mg/ml y después se mezcló. A continuación, se ajustó el diámetro de partícula de la solución pasando la solución a través de membranas con diámetros de poro de 800 nm y 200 nm utilizando un extrusor, a fin de preparar un liposoma catiónico. A continuación, mediante la mezcla del liposoma catiónico resultante (concentración de DSPC=63,2 mg/ml) y una solución que contenía un complejo de ARNip obtenido en el Ejemplo 1 (concentración de complejo de ARNip=0,028 mg), se preparó una composición de administración de ARNip (Ejemplo 2: método Lipoplex).

25 La Tabla 2 muestra las propiedades de la composición de administración de ARNip obtenida (Ejemplo 2). La composición producida mediante la adición de una solución de complejo de ARNip tras la formación de un liposoma catiónico (liposomalización) presentaba un diámetro de partícula de aproximadamente 300 nm y un potencial zeta de 20 mV. De esta manera, dicha composición se encontraba en forma de liposoma en la que las partículas presentaban un tamaño de partícula uniforme. Por otra parte, la composición producida mediante la adición de una solución de complejo de ARNip tras la formación de un liposoma catiónico (método Lipoplex) presentaba un diámetro de partícula de aproximadamente 800 nm y un potencial zeta de 20 mV. El diámetro de partícula mostrado es un diámetro de partícula medio (nm) medido utilizando un ZETASIZER 300HSA (MALVERN INSTRUMENTS) (se midió el diámetro de partícula medio en volumen utilizando un método de difracción láser). El potencial zeta se midió utilizando un ZETASIZER 300HSA (MALVERN INSTRUMENTS).

35 [Tabla 2]

Método de preparación	Diámetro de partícula	Potencial zeta
Liposomalización	319,5	24,9±0,2
Método Lipoplex	869,6	19,2±0,3

40 Se prepararon composiciones de administración de ácidos nucleicos utilizando los complejos de ARNip de los Ejemplos comparativos 1 o 3 bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 2. En estas composiciones el complejo de ARNip también se adhería a la superficie del liposoma, mostrando que el complejo de ARNip no se encontraba suficientemente encapsulado en el liposoma.

Ejemplo de ensayo 2Evaluación de la eficiencia de inclusión del ARNip

45 Se preparó un complejo de ARNip marcado con FITC de la misma manera que en el Ejemplo 1, anteriormente, utilizando ARNip premarcado con FITC. Utilizando el complejo de ARNip marcado con FITC, se preparó una composición de administración de ácidos nucleicos bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 2. La composición de administración de ARNip inmediatamente tras la preparación se precipitó mediante centrifugación (a 50 75.000 rpm durante 1 hora) y se midió la intensidad de fluorescencia del ARNip marcado con FITC presente en el sobrenadante con el fin de calcular la eficiencia de inclusión del ARNip (la proporción (%) del ARNip encapsulado en el liposoma respecto al total de ARNip).

55 En consecuencia, tal como se muestra en la Tabla 3, la eficiencia de inclusión del ARNip indicó niveles elevados, de 95,9%, al prepararlo mediante liposomalización, y de 91,5% al prepararlo mediante el método Lipoplex. Lo anterior reveló que el complejo de ácidos nucleicos de la presente invención presentaba la característica de ser eficientemente introducido en un portador para la administración de ácidos nucleicos en forma liposómica. Aunque no se desea una interpretación restrictiva, lo anterior se debe presumiblemente a que la cicloamilosa forma un complejo compacto con el ARNip.

60

[Tabla 3]

Método de preparación	Eficiencia de inclusión (%)
Liposomalización	95,9
Método Lipoplex	91,5

Ejemplo de ensayo 3

5 Ensayo de evaluación de la seguridad celular

Se llevó a cabo una evaluación utilizando un ensayo de MTS. Se utilizó un ensayo de proliferación celular en solución CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, producido por Promega Corporation, para el ensayo de MTS. Concretamente se inocularon células A594 (ATCC, USA) a razón de $3,16 \times 10^4$ células por pocillo en 200 μ l de medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) que contenía suero de feto bovino (SFB) al 10% en volumen en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Tras enjuagar tres veces con solución salina equilibrada de Hank (SSEH), el medio se cambió a MEMD sin SFB. Se añadió la composición de administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2 (liposomalización y método Lipoplex) en una cantidad de 20 μ l en cada pocillo y se incubó a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 4 horas. A continuación, el sobrenadante de cultivo en los pocillos se cambió a MEMD con SFB al 10% en volumen y nuevamente se incubó a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas. Se añadieron veinte μ l de un reactivo de MTS y 100 μ l de un medio MEMD con SFB al 10% en volumen a cada pocillo y se incubaron durante dos horas. Se determinó la absorbancia a 492 nm y se calculó la viabilidad celular. Se calculó la viabilidad celular fijando la absorbancia a 492 nm, determinada tras la incubación bajo las condiciones anteriormente indicadas sin adición de la composición de administración de ácidos nucleicos, a 100%.

La figura 1 muestra los resultados. Tal como se muestra en la figura 1, se puso de manifiesto que todas las composiciones de administración de ácidos nucleicos preparadas mediante liposomalización y el método Lipoplex presentaban una citotoxicidad reducida y eran altamente seguros. Particularmente se confirmó que las composiciones de administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2 preparadas mediante liposomalización mostraban un nivel significativamente elevado de seguridad.

Ejemplos de ensayo 4

Ensayo de evaluación de la eficiencia de administración de ARNip en las células

Se evaluó la eficiencia de introducción intracelular del ARNip mediante la medición de la intensidad de fluorescencia de ARNip marcado con FITC mediante citometría de flujo. En el presente ensayo, se utilizó una composición de 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 MEMD con SFB al 10% en volumen en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 24 horas. Tras enjuagar tres veces con SSEH, se añadieron 0,45 ml de MEMD que no contenía SFB. Se añadieron adicionalmente a cada pocillo 0,05 ml de la composición de administración de ácidos nucleicos del Ejemplo 2 (liposomalización: concentración de DSPC contenida=30 mg/ml) y el resultado se incubó a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 4 horas. A continuación, el sobrenadante de cultivo en los pocillos se cambió a DMEM con 10% en vol. de SFB y se incubó nuevamente a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas. Se enjuagó cada pocillo con SSEH una vez y se añadieron 0,2 ml de CellScrubBuffer (producido por Gene Therapy Systems, Inc.). La incubación se llevó a cabo a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 15 minutos. Los pocillos se enjuagaron nuevamente con SSEH dos veces y las células adheridas al fondo del pocillo se desengancharon utilizando tripsina y se recogieron mediante centrifugación. Las células resultantes se suspendieron en SSEH. La suspensión se filtró a través de una membrana con un diámetro de poro de 41 μ m. Se midió la intensidad de fluorescencia de las células mediante citometría de flujo 4 horas después de la adición de las composiciones de administración de ácidos nucleicos. A modo de control se midió la intensidad de fluorescencia de las células de la manera indicada anteriormente, utilizando una composición de administración de ácidos nucleicos de control obtenida mediante la mezcla de una solución de Lipofectamina 2000™ (producida por Invitrogen Corporation), que se utiliza con frecuencia como vector génico disponible comercialmente, diluido con medio OptiMEM a 0,1 mg/ml y una solución de ARNip en la que el ARNip se había diluido con tampón TE hasta una concentración de 2 μ M en una proporción de volúmenes de 1:1.

La figura 2 muestra los resultados. Se confirmó a partir de los resultados que, para la composición de administración de ácidos nucleicos preparada en el Ejemplo 2 (liposomalización), el ARNip se había introducido significativamente en las células.

[Listado de secuencias]

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

<120> Complejo de ácidos nucleicos y composición de administración de ácidos nucleicos

<130> P10-16
<150> JP2009-051312
<151> 2009-3-4
5 <160> 2
<170> PatentIn versión 3.4
10 <210> 1
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Hebra codificante de GL3-ARNip

<220>
<221> modified_base
20 <222> (19) .. (19)
<223> modificado con "dTdT"

<400> 1
25 cuuacgcuga guacuucga 19

<210> 2
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial
30 <220>
<223> Hebra no codificante de GL3-ARNip

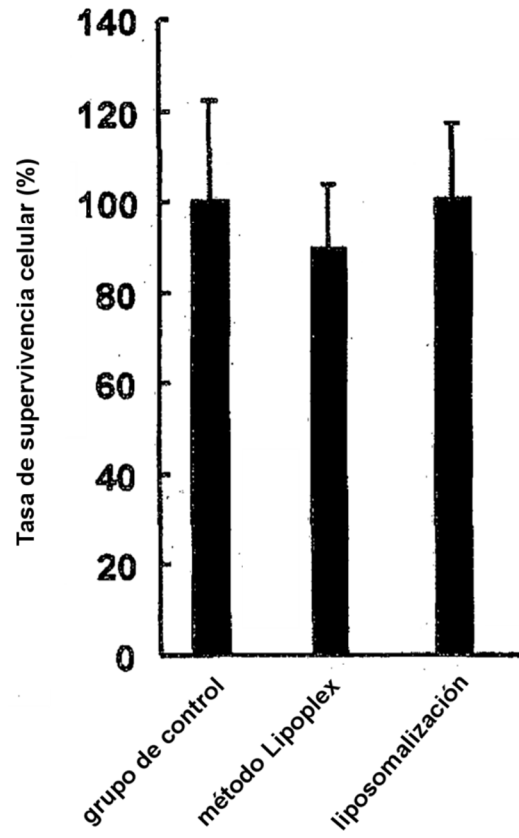
<220>
<221> modified_base
35 <222> (19) .. (19)
<223> modificado con "dTdT"

<400> 2
40 ucgaaguacu cagcguaag 19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejo de ácidos nucleicos que comprende por lo menos un compuesto de cicloamilosa seleccionado de entre el grupo que consiste en cicloamilosa y derivados de la misma, y una molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN o inhibir la traducción, en el que el compuesto de cicloamilosa presenta un grado de polimerización de 10 a 100.
- 10 2. Complejo de ácidos nucleicos según la reivindicación 1, en el que la cantidad del compuesto de cicloamilosa es de 1 a 4.000 partes en peso por parte en peso de la molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN o inhibir la traducción.
- 15 3. Complejo de ácidos nucleicos según la reivindicación 1, en el que la molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN o inhibir la traducción es ARNip.
- 20 4. Complejo de ácidos nucleicos según la reivindicación 1, que es un agregado obtenido mezclando una molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN o inhibir la traducción con un compuesto de cicloamilosa en una solución acuosa.
- 25 5. Composición de administración de ácidos nucleicos que comprende el complejo de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador de administración de ácidos nucleicos.
6. Composición de administración de ácidos nucleicos según la reivindicación 5, en la que el portador de administración de ácidos nucleicos es una composición que comprende: (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un elemento seleccionado de entre colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática.
- 30 7. Composición de administración de ácidos nucleicos según la reivindicación 6, en la que el componente (A) en el portador de administración de ácidos nucleicos es una diacilfosfatidilcolina en la que la fracción acilo presenta 4 a 23 átomos de carbono.
- 35 8. Composición de administración de ácidos nucleicos según la reivindicación 6, en la que el componente (B) en el portador de administración de ácidos nucleicos es el colesterol.
9. Composición de administración de ácidos nucleicos según la reivindicación 6, en la que el componente (C) en el portador de administración de ácidos nucleicos es una alquilamina que presenta 10 a 20 átomos de carbono.
- 40 10. Composición de administración de ácidos nucleicos según la reivindicación 6, en la que la proporción molar de componentes (A):(B):(C) es 5-9:1-5:1.
- 45 11. Composición de administración de ácidos nucleicos según la reivindicación 6, en la que el portador de administración de ácidos nucleicos es una preparación de liposomas en la que se forma una membrana liposómica a partir de los componentes (A) a (C).
- 50 12. Composición farmacéutica que comprende la composición de administración de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.
- 55 13. Utilización de por lo menos un compuesto de cicloamilosa seleccionado de entre el grupo que consiste en cicloamilosa y derivados de la misma, y una molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN o inhibir la traducción para producir un complejo de ácidos nucleicos en la que el compuesto de cicloamilosa presenta un grado de polimerización de 10 a 100.
- 60 14. Utilización del complejo de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador de administración de ácidos nucleicos para producir una composición de administración de ácidos nucleicos.
- 65 15. Utilización del complejo de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para producir un producto farmacéutico para administrar una molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN o inhibir la traducción en el interior de la célula.
16. Procedimiento para la administración de una molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN en el interior de la célula, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto por lo menos un compuesto de cicloamilosa seleccionado de entre el grupo que consiste en cicloamilosa y derivados de la misma, y una composición de ácidos nucleicos que contiene la molécula de ácidos nucleicos que puede interferir por ARN o inhibir la traducción, con una célula *in vitro* o *ex vivo*, en el que el compuesto de cicloamilosa presenta un grado de polimerización de 10 a 100.
17. Procedimiento según la reivindicación 16 en el que la composición de administración de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 se pone en contacto con la célula.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

