

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 812**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2009** **E 09803053 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016** **EP 2319519**

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

30 Prioridad:

01.08.2008 JP 2008200182

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

01.03.2016

73 Titular/es:

KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP

72 Inventor/es:

YAGI, NOBUHIRO y
ENOKIZONO, JUNICHI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 561 812 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para inhibir la expresión de un gen diana

5 **Campo técnico**

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

10 **Antecedentes de la técnica**

10 Como método para suprimir la expresión de un gen diana, por ejemplo, se conoce un método que utiliza la interferencia del ARN (denominado en lo sucesivo en el presente documento ARNi) y similares, y específicamente, un fenómeno donde un ARN bicatenario que tiene una secuencia idéntica a la de un gen diana se introduce en un nematodo, se ha notificado que la expresión del gen diana se ha suprimido específicamente (véase "Nature", Vol. 391, N.º 6669, pp. 806-811, 1998). Además, se ha descubierto que incluso cuando un ARN bicatenario que tiene una longitud de 21 a 23 bases se introduce en Drosophila, en lugar del ARN bicatenario largo, se suprime la expresión de un gen diana. Su nombre es ARN interferente pequeño (ARNip) (véase la publicación internacional N.º WO 01/75164).

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

30 La ARNi se ha verificado frecuentemente también en ensayos in vivo. Se ha notificado el efecto de ARNi mediante el uso de ARNip con una longitud de 50 pares de bases o menos en fetos de animales (véase documento de patente 1) y su efecto en ratones adultos (véase documento de patente 2). Además, cuando se administró ARNip por vía intravenosa a un feto de ratón, se descubrió un efecto de supresión de la expresión de un gen específico en varios órganos tales como riñón, bazo, pulmón, páncreas, e hígado (véase documento 1 no de patente). Adicionalmente, se ha notificado que cuando se administra ARNip directamente a células de cerebro, se suprime también la expresión de un gen específico (véase documento 2 no de patente).

40 Por otra parte, como forma de administrar un ácido nucleico a una célula, se conoce un método que utiliza liposomas catiónicos o polímeros catiónicos. Sin embargo, según el método, tras realizarse la administración intravenosa de liposomas catiónicos o polímeros catiónicos que contienen un ácido nucleico, el ácido nucleico se elimina rápidamente de la sangre, y cuando un tejido diana es diferente del de hígado o pulmón, por ejemplo, cuando es un sitio del tumor o similar, el ácido nucleico no se puede administrar al tejido diana y, por tanto, todavía no se ha conseguido la expresión de una acción suficiente. De acuerdo con ello, se ha notificado un liposoma encapsulador de ácido nucleico (un liposoma que encapsula un ácido nucleico en su interior) con el que se ha resuelto rápidamente el problema de la eliminación del ácido nucleico de la sangre (véase documentos 3 a 6 de patente, y documento 3 no de patente). En el documento 3 de patente, como método para producir liposomas encapsuladores de ácidos nucleicos o similares, por ejemplo, se notifica un método para producir un liposoma encapsulador de oligodesoxinucleótidos (ODN) disolviendo previamente un lípido catiónico en cloroformo, añadiendo una solución acuosa de ODN y metanol al anterior y centrifugando la mezcla de forma que se transfiere un complejo del lípido catiónico y ODN a la capa de cloroformo, y a continuación extrayendo la capa de cloroformo, añadiendo un fosfolípido glicolado con polietileno, un lípido neutro, y agua a la capa de cloroformo para formar una emulsión de agua en aceite (a/ac) y tratando la emulsión mediante el método de evaporación en fase inversa. En el documento 4 de patente y el documento 3 no de patente, se notifica un método de producción de un liposoma encapsulador de ODN disolviendo el ODN en una solución acuosa de ácido cítrico a pH 3,8, añadiendo un lípido (en etanol) a la solución, reduciendo la concentración de etanol al 20 % en v/v para preparar un liposoma encapsulador de ODN, filtrando para dimensionamiento, eliminando el exceso de etanol mediante diálisis, y a continuación realizando además diálisis de la muestra a pH 7,5 para eliminar el ODN adherido a la superficie del liposoma. En cada método, se produce un liposoma que encapsula un principio activo tal como un ácido nucleico.

60 Por otra parte, en los documentos 5 y 6 de patente, se ha notifica la producción de un liposoma que encapsula un principio activo tal como un ácido nucleico mediante un método de revestimiento de partículas finas con una membrana de bicapa lipídica en un líquido. En el método, las partículas finas se revisten con una membrana de bicapa lipídica en líquido reduciendo la concentración del disolvente orgánico polar en una solución acuosa que contiene un disolvente orgánico polar donde se dispersan partículas finas y se disuelve un lípido. En el método, por ejemplo, se produjeron de forma muy eficaz partículas finas revestidas con una membrana de bicapa lipídica

(partículas finas revestidas) que tenían un tamaño adecuado de las partículas finas para su inyección intravenosa y similares. Además, como ejemplo de las partículas finas a revestir, por ejemplo, un complejo que consiste en ODN o ARNip y un lípido catiónico y que se forma mediante una interacción electrostática se ilustra en los documentos 5 y 6 de patente. Se ha notificado que el diámetro de partículas de las partículas finas revestidas obtenidas mediante

5 revestimiento de las partículas finas es pequeño y adecuado para su uso en forma de inyección, y las partículas finas revestidas muestran una alta retención en la sangre y se acumulan en gran medida en el tejido tumoral cuando se administran por vía intravenosa.

Anteriormente se han descrito moléculas de ARNip modificadas y sus usos (documento WO 2007/ 051301). Además, se han descrito las propiedades inmunoestimuladoras y la actividad antivírica de los ARNip específicos del VHB (Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 364, pp. 436-442, 2007). Además, se han descrito dupletes de oligonucleótidos modificados en 2' que tienen una potencia y estabilidad in vitro aumentadas en comparación con el ARN interferente pequeños sin modificar (Journal of Medical Chemistry, Vol. 48, pp. 901-904. 2005). Además, se ha evaluado anteriormente la actividad in vivo de los ARNip resistentes a nucleasas (ARN. Vol. 10, pp. 766-771, 2004). Además, se ha descrito un análisis de modificación química dirigido a la función del ARNip en la interferencia de ARN (RNA, Vol. 9, pp. 1034-1048, 2003).

Documento 1 de patente: publicación de los Estados Unidos n.º US 2002-132788

Documento 2 de patente: publicación internacional n.º WO 03/10180

Documento 3 de patente: traducción al japonés de la solicitud internacional PCT n.º 2002-508765

20 Documento 4 de patente: traducción al japonés de la solicitud internacional PCT n.º 2002-501511

Documento 5 de patente: publicación internacional n.º WO 02/28367

Documento 6 de patente: publicación internacional n.º WO 2006/080118

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

25 Documento 2 no de patente: "Nature Biotechnology", Vol. 20, N.º 10, pp. 1006-1010, 2002

Documento 3 no de patente: "Biochimica et Biophysica Acta", Vol. 1510, pp. 152-166, 2001

Sumario de la invención

30 Problemas que va a resolver la invención

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

35 Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a los puntose (1) a (13) siguientes.

40 (1). Una composición que comprende un liposoma con ARN encapsulado para su uso en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria donde dicha composición se va a administrar dos veces con un intervalo de 7 días, donde el ARN contiene una secuencia que consiste en de 15 a 30 bases contiguas de un ARNm de un gen diana (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X) y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X' complementaria) complementaria de la secuencia X, estando del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X y siendo la secuencia X' complementaria ribosa sustituida por un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo y/o 2'-flúor en la posición 2' y donde el ARN puede suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi), y pudiendo el liposoma alcanzar un tejido o un órgano que contiene un sitio de expresión del gen diana y que muestra una elevada retención en la sangre, y donde el gen diana es un gen de uno cualquiera del factor de crecimiento endotelial vascular, un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, un factor análogo a Krüppel, un factor de transcripción de Ets, un factor nuclear, y un factor inducible por hipoxia.

55 (2). La composición para su uso de acuerdo con el punto (1), donde el liposoma es un liposoma que tiene un tamaño que permite su administración intravenosa.

(3). La composición para su uso de acuerdo con los puntos (1) o (2), donde el liposoma con ARN encapsulado incluye:

60 una partícula de complejo que contiene una partícula principal y el ARN como componentes constituyentes; y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles en un disolvente orgánico polar, y donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, y la partícula del complejo se pueden dispersar en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica.

65

(4). La composición para su uso de acuerdo con los puntos (1) o (2), donde el liposoma con ARN encapsulado es un liposoma que incluye: una partícula de complejo que contiene una partícula principal que comprende una sustancia catiónica y el ARN como componentes constituyentes; y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, donde la membrana de bicapa lipídica incluye, como componentes constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua.

(5). Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria donde dicho agente terapéutico se va a administrar dos veces con un intervalo de 7 días, comprendiendo el agente terapéutico un liposoma que puede alcanzar un tejido o un órgano que contiene un sitio de expresión del gen diana y que muestra una elevada retención en la sangre que incluye:

una partícula de complejo que contiene, como componentes constituyentes, una partícula principal y un ARN que contiene una secuencia que consiste de 15 a 30 bases contiguas de ARNm de un gen diana asociado con tumor o inflamación (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X1), y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X1' complementaria) que es complementaria de la secuencia X1, estando del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X1 y siendo la secuencia X1' complementaria ribosa sustituida por un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo y/o 2'-flúor en la posición 2' y donde el ARN puede suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi), donde dicho gen asociado con el tumor o inflamación es un gen de uno cualquiera de un factor endotelial vascular, un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento de hepatocitos, un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, un factor análogo a Krüppel, un factor de transcripción de Ets, un factor nuclear, y un factor inducible por hipoxia; y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles en un disolvente orgánico polar, y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, y la partícula del complejo se pueden dispersar en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica.

(6). La composición para su uso de acuerdo con el punto (3) o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con el punto 5, donde el disolvente orgánico polar es un alcohol.

(7). La composición para su uso de acuerdo con el punto (3) o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con el punto 5, donde el disolvente orgánico polar es etanol.

(8). La composición para su uso de acuerdo a uno cualquiera de los puntos (3), (6) y (7) o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (5) a (7), donde la partícula principal contiene una sustancia catiónica, y donde la membrana de bicapa lipídica incluye, como componentes constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua.

(9). Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria donde dicho agente terapéutico se va a administrar dos veces con un intervalo de 7 días, el agente terapéutico puede alcanzar un tejido o un órgano que contiene un sitio de expresión del gen diana y que muestra una elevada retención en la sangre que comprende:

una partícula de complejo que contiene, como componentes constituyentes, una partícula principal que contiene una sustancia catiónica, y un ARN que contiene una secuencia que consiste de 15 a 30 bases contiguas de ARNm de un gen diana asociado con tumor o inflamación (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X1), y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X1' complementaria) que es complementaria de la secuencia X1, estando del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X1 y siendo la secuencia X1' complementaria ribosa sustituida por un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo y/o 2'-flúor en la posición 2' y donde el ARN puede suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi), donde dicho gen asociado con el tumor o inflamación es un gen diana de uno cualquiera de un factor endotelial vascular, un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento de hepatocitos, un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, un factor análogo a Krüppel, un factor de transcripción de Ets, un factor nuclear, y un factor inducible por hipoxia; y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, donde la membrana de bicapa lipídica incluye, como componentes constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua.

(10). La composición para su uso de acuerdo con los puntos (4) u (8) o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con los puntos (8) o (9), donde la sustancia catiónica es uno o más compuestos seleccionados entre cloruro de N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N,N-trimetilamonio, N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N-dimetilamina, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio, bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio, y 3B-[N-(N',N'-dimetilaminoetil)carbamoil]colesterol.

(11). La composición para su uso de acuerdo a uno cualquiera de los puntos (4), (8) y (10) o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (8) a (10), donde el derivado de lípido, el derivado de ácido graso, o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua es polietilenglicol fosfatidil etanolamina.

(12). El agente terapéutico para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (5) a (11), donde el gen diana asociado con el tumor o la inflamación es un gen asociado con la angiogénesis.

(13). La composición para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (4), (6) a (8), (10) y (11) o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (5) a (12), donde el ARNm es tanto ARNm humano como ARNm de ratón.

Efectos de la invención

Mediante la administración de la composición de la presente invención que comprende un liposoma encapsulador de un ARN que contiene una secuencia consistente de 15 a 30 bases contiguas de un ARNm de un gen diana y una secuencia de bases complementarias con la secuencia de un mamífero o similar, se puede suprimir la expresión del gen diana.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las concentraciones de ARN en sangre en respuesta a la administración de una preparación obtenida en el Ejemplo 1; el eje horizontal representa el tiempo (horas) tras la administración de la preparación; el eje vertical representa la concentración de ARN en sangre ($\mu\text{mol/l}$).

La Fig. 2 muestra las concentraciones de ARN en sangre en respuesta a la administración de una preparación obtenida en el Ejemplo comparativo 1; el eje horizontal representa el tiempo (horas) tras la administración de la preparación; el eje vertical representa la concentración de ARN en sangre ($\mu\text{mol/l}$).

La Fig. 3 muestra las concentraciones de ARN en sangre en respuesta a la administración de una preparación obtenida en el Ejemplo 2; el eje horizontal representa el tiempo (horas) tras la administración de la preparación; el eje vertical representa la concentración de ARN en sangre ($\mu\text{mol/l}$).

La Fig. 4 muestra las concentraciones de ARN en sangre en respuesta a la administración de una preparación obtenida en el Ejemplo 3; el eje horizontal representa el tiempo (horas) tras la administración de la preparación; el eje vertical representa la concentración de ARN en sangre ($\mu\text{mol/l}$).

La Fig. 5 muestra las concentraciones de ARN en sangre en respuesta a la administración de una preparación obtenida en el Ejemplo comparativo 2; el eje horizontal representa el tiempo (horas) tras la administración de la preparación; el eje vertical representa la concentración de ARN en sangre ($\mu\text{mol/l}$).

La Fig. 6 muestra las concentraciones de ARN en sangre en respuesta a la administración de una preparación obtenida en el Ejemplo 4; el eje vertical representa la concentración de ARN en sangre ($\mu\text{mol/l}$).

La Fig. 7 muestra las concentraciones de ARN en sangre en respuesta a la administración de una preparación obtenida en el Ejemplo comparativo 3; el eje vertical representa la concentración de ARN en sangre ($\mu\text{mol/l}$).

Modo para realizar la invención

De acuerdo con la divulgación, el gen diana no está particularmente limitado, siempre que sea un gen que produzca y exprese el ARNm en mamíferos. Por ejemplo, el gen diana es preferentemente un gen asociado con el tumor o la inflamación, más preferentemente un gen asociado con la angiogénesis, y similares. De acuerdo con la presente invención, los genes diana son genes que codifican uno cualquiera de un factor de crecimiento endotelial vascular (en lo sucesivo en el presente documento, VEGF), un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (en lo sucesivo en el presente documento, VEGFR), un factor de crecimiento de fibroblastos, un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento de hepatocitos, un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, un factor análogo a Krüppel, (en lo sucesivo en el presente documento, KLF), un factor de transcripción de Ets, un factor nuclear, y un factor inducible por hipoxia. Los ejemplos específicos incluyen el gen VEGF, el gen VEGFR, el gen del factor de crecimiento de fibroblastos, el gen del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, el gen del factor de crecimiento derivado de plaquetas, el gen del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, el gen del factor de crecimiento de los hepatocitos, el gen del receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, el gen KLF, el gen del factor de crecimiento Ets, el gen del factor nuclear, el gen del factor inducible por hipoxia, y similares. El gen diana preferido es, por ejemplo, el gen VEGF, el gen VEGFR, y el gen KLF, más preferentemente el gen KLF, adicionalmente preferente el gen KLF5.

La familia KLF es una familia de factores de transcripción que se caracteriza por tener un motivo en dedo de cinc en su extremo C, y los ejemplos que se conocen del mismo incluyen KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF6, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF 16 y similares. Se ha notificado que, en mamíferos, la familia KLF tiene un importante papel en la diferenciación de diversos tipos de tejidos o células, tales como eritrocitos, células endoteliales vasculares, músculo liso, piel, y linfocitos, y también en la formación de las dolencias patológicas de diversos tipos de enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, cirrosis, enfermedades renales, y enfermedades inmunomediadas (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, N.º 37, pp. 34355-34358, 2001; Genome Biology, Vol. 4, N.º 2, p. 206, 2003).

Entre los miembros de la familia KLF, KLF5 también se denomina BTEB2 (proteína 2 de unión al elemento transcripcional básico) o IKLF (factor análogo a Krüppel enriquecido en el intestino). La expresión de KLF5 en el músculo liso vascular está controlada en su etapa de desarrollo. KLF5 está muy expresado en el músculo liso vascular del feto, mientras que su expresión no se encuentra en el músculo liso vascular de un adulto sano. Además, en el caso del músculo liso de la íntima de un vaso sanguíneo generado tras la denudación por un catéter de globo, KLF5 se expresa intensamente. Asimismo, en las lesiones del músculo liso debidas a arterioesclerosis o restenosis, KLF5 se expresa (Circulation, Vol. 102, N.º 20, pp. 2528-2534, 2000).

VEGF, descubierto por Ferrara y otros en 1983, es un factor de crecimiento específico de células endoteliales vasculares. En ese mismo año, Senger y Dvorak, junto con algunos otros, descubrieron un factor que tenía actividad de permeabilidad vascular, y denominaron a este factor VPF (factor de permeabilidad vascular). El análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas reveló que estos eran iguales. VEGF facilita el crecimiento mediante su unión a los receptores de las células endoteliales que revestían el interior de los vasos sanguíneos. VEGF tiene actividad no solamente en la formación de vasos sanguíneos durante el periodo fetal, sino también en la formación de vasos sanguíneos patológicos. Por ejemplo, cuando el cáncer crece hasta un determinado tamaño y se convierte en deficiente en oxígeno, la producción de VEGF y del receptor de VEGF aumenta e induce la angiogénesis. Además, el efecto de aumento de la permeabilidad vascular se considera también una causa de la ascitis cancerosa. VEGF juega también un papel en la formación de nuevos vasos sanguíneos en la retina durante la propagación de la diabetes mellitus. Específicamente, VEGF es una proteína que forma nuevos vasos sanguíneos. La expresión de VEGF inducida por un estado de una baja concentración de oxígeno tiene un importante papel en la angiogénesis. Además de su papel en la angiogénesis, la implicación del factor VEGF está fuertemente indicada en la explicación del mecanismo de edema que se observa en tumores o lesiones inflamatorias y similares.

Por otra parte, los VEGFR están presentes en células endoteliales vasculares o en las propias células cancerosas. Tras su unión con VEGF, los propios receptores se fosforilan (se activan), señalizando las células para, por ejemplo, crecer o migrar. Se sabe que la inhibición de la fosforilación del receptor inhibe la señalización de las células, y de esta manera inhibe la angiogénesis.

De acuerdo con la divulgación, los ejemplos de genes diana incluyen genes CLL de linfocitos B/linfoma (en lo sucesivo en el presente documento, bcl), y el gen diana preferido es, por ejemplo, el gen bcl2.

Bcl2 es una proteína de la membrana interna mitocondrial que inhibe la muerte celular apoptótica en algunos tipos de células. La inhibición de la apoptosis por una proteína Bcl-2 de alta expresión se considera una causa de enfermedades tales como cáncer y enfermedad hematológica maligna. De hecho, se encuentra una gran producción de proteína Bcl-2 en varios cánceres sólidos, incluyendo sarcoma linfático, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de recto, y similares (T. J. McDonnell et al., Cancer Research, 15 de diciembre de 1992, Vol. 52, N.º 24, p. 6940-6944). Se indica también la implicación de la expresión de Bcl-2 en apoptosis en la glándula del timo (Kanavaros et al., Histol. Histopathol. 16(4): 1005-12 (Oct. 2001)).

Debido al efecto supresor de la apoptosis, la muerte celular no se induce en células que producen altos niveles de proteína Bcl2 y, como resultado, se produce la resistencia al fármaco para diversos agentes anticancerosos. Por otra parte, se sabe que la supresión de la producción de Bcl-2 en células de cáncer de próstata suprime el crecimiento celular y ayuda a inducir la apoptosis (Shi et al., Cancer Biother. Radiopharm., 16(5): 421-9 (Oct. 2001)). De esta manera, un método que suprima la expresión de la proteína Bcl2 puede ser un método terapéutico o preventivo eficaz en enfermedades que requieren la promoción de la apoptosis para la cura, tales como cánceres sólidos y enfermedades hematológicas malignas.

Los ejemplos del ARN utilizado en la presente invención incluyen un ARN que contiene una secuencia (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X) consistente en de 15 a 30, preferentemente de 17 a 25, y más preferentemente de 19 a 23 bases contiguas del ARNm del gen diana anteriormente mencionado, y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X' complementaria) que es complementaria de la secuencia X. Por ejemplo, el ARN utilizado en la presente invención puede ser un ARN bicatenario que consiste en una secuencia de una hebra de sentido directo que contiene X, y una hebra de sentido contrario que contiene la secuencia X' complementaria, o un ARN de una estructura de horquilla donde la hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario se unen entre sí por un oligonucleótido separador.

65

La hebra de sentido directo que contiene la secuencia X puede ser un ARN cuyas bases sean únicamente la secuencia X (en lo sucesivo en el presente documento, hebra que contiene la secuencia X), o un ARN que contiene una hebra con la secuencia X que tiene de 1 a 6, preferentemente de 2 a 4 bases que son iguales o diferentes y se añaden al extremo 3' y/o al extremo 5' de la hebra que contiene la secuencia X.

5 La hebra de sentido contrario que contiene la secuencia X' complementaria puede ser, por ejemplo, un ARN cuyas bases son únicamente la secuencia X' complementaria (en lo sucesivo en el presente documento, la hebra que contiene la secuencia X' complementaria), o un ARN que incluye la hebra que contiene la secuencia X' complementaria que tiene de 1 a 6, preferentemente de 2 a 4 oligonucleótidos que son iguales o diferentes y se añaden al extremo 3' y/o al extremo 5' de la hebra que contiene la secuencia X' complementaria.

15 El oligonucleótido separador que se une a la hebra de sentido directo que contiene la secuencia X y a la hebra de sentido contrario que contiene la secuencia X' complementaria en el ARN de una estructura en horquilla contiene preferentemente nucleótidos de 6 a 12 bases, preferentemente con dos uracilos en el extremo 5' de la secuencia. Un ejemplo de dicho oligonucleótido separador es un oligonucleótido con la secuencia de bases UUCAAGAGA. Cualquiera de las dos porciones del ARN que se unen entre sí mediante el oligonucleótido separador puede ser adecuada como el ARN del extremo 5'. Preferentemente, la hebra de sentido directo que contiene la secuencia X representa el lado del extremo 5'.

20 Los nucleótidos y el oligonucleótido separador añadido a la hebra que contiene la secuencia X y la hebra que contiene la secuencia X' complementaria puede contener una o más bases seleccionadas entre guanina, adenina, citosina, timina, y uracilo, y el azúcar unido a cada base puede ser cualquiera de ribosa, desoxirribosa, y ribosa cuyo grupo hidroxilo en la posición 2' está sustituido por un grupo modificador. Más preferentemente, los nucleótidos añadidos son uno de dos de ácido uridílico (U) y ácido desoxitimidínico (dT). La secuencia de bases de los nucleótidos añadidos al extremo 3' de la hebra que contiene la secuencia X puede ser igual a la secuencia de bases de los nucleótidos que constituyen la secuencia X del ARNm del gen diana, y esta estructura es más preferible. De manera similar, la secuencia de bases de los nucleótidos añadidos al extremo 3' de la hebra que contiene la secuencia X' complementaria puede ser una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases de los nucleótidos que constituyen la secuencia X del ARNm del gen diana, y esta estructura es más preferible.

30 Los ejemplos más preferidos del ARN utilizado en la presente invención incluyen (a) un ARN bicatenario que tiene una hebra de sentido directo y una hebra de sentido contrario que contiene la secuencia X y la secuencia X' complementaria, respectivamente, siendo la secuencia X una secuencia que consiste en de 19 a 21 bases contiguas del ARNm del gen diana, consistiendo la hebra de sentido directo en la hebra que contiene la secuencia X y de 2 a 4 nucleótidos que son iguales o diferentes y se añaden al extremo 3' de la hebra que contiene la secuencia X, consistiendo la hebra de sentido contrario en la hebra que contiene la secuencia X' complementaria, y de 2 a 4 nucleótidos que son iguales o diferentes y se añaden al extremo 3' de la hebra que contiene la secuencia X' complementaria, (b) un ARN bicatenario que tiene una hebra de sentido directo y una hebra de sentido contrario que contienen la secuencia X y la secuencia X' complementaria, respectivamente, siendo la secuencia X una secuencia que consiste en de 23 a 25 bases contiguas del ARNm del gen diana, consistiendo la hebra de sentido directo en la hebra que contiene la secuencia X, consistiendo la hebra de sentido contrario en la hebra que contiene la secuencia X' complementaria, (c) un ARN bicatenario que tiene una hebra de sentido directo y una hebra de sentido contrario que contienen la secuencia X y la secuencia X' complementaria, respectivamente, siendo la secuencia X una secuencia que consiste en de 23 a 27 bases contiguas del ARNm del gen diana, consistiendo la hebra de sentido directo en la hebra que contiene la secuencia X y de 2 a 4 nucleótidos que son iguales o diferentes y se añaden al extremo 3' de la hebra que contiene la secuencia X, consistiendo la hebra de sentido contrario en la hebra que contiene la secuencia X' complementaria y de 2 a 4 nucleótidos que son iguales o diferentes y se añaden al extremo 3' de la hebra que contiene la secuencia X' complementaria, siendo la secuencia de bases de los nucleótidos añadidos al extremo 3' de la hebra que contiene la secuencia X' complementaria una secuencia de bases que es complementaria de la secuencia de bases de los nucleótidos que constituyen la secuencia X del ARNm del gen diana, y similares.

Además, el ARN utilizado en la presente invención es un ARN que tiene una acción de suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi).

55 Se describe a continuación dicho ARN supresor de la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi) tomando como ejemplo un ARN supresor de la expresión de un gen Bcl2. Los ARN que suprimen la expresión de otros genes se pueden obtener también utilizando procedimientos similares.

60 El ARN supresor de la expresión del gen bcl-2 se puede diseñar basándose en la secuencia de bases del ADN (SEC ID N° 29) que corresponde al ARNm de longitud completa de bcl-2 (N.º de registro en Genbank NM_000633). A partir de la secuencia de bases del ADN, se eliminan secuencias contiguas parciales de 15 a 30 bases, preferentemente de 17 a 27 bases, más preferentemente de 19 a 25 bases. Se calculó el contenido de GC en las secuencias eliminadas, y se seleccionaron las secuencias con un contenido de GC de 20 a 80 %, preferentemente de 30 % a 70 %, más preferentemente de 40 a 60 %. A continuación se obtuvo una secuencia de bases con una sustitución T por U como secuencia X. A continuación se obtuvo el ARN supresor de la expresión del gen bcl2 en

forma de un ARN bicatenario que tenía una hebra de sentido directo que contenía la secuencia X seleccionada, y una hebra de sentido contrario que contiene la secuencia X' complementaria, complementaria de la secuencia X, o en forma de un ARN de una estructura en horquilla que contiene la hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario unidas entre sí mediante un oligonucleótido separador.

5 En el ARN utilizado en la presente invención, del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X y la secuencia X' complementaria son ribosa sustituida por un grupo modificador en la posición 2'.

10 Tal como se usa en el presente documento, la sustitución por un grupo modificador en la posición 2' de la ribosa significa la sustitución del grupo hidroxilo por un grupo modificador en la posición 2'. El grupo modificador puede tener una configuración igual o diferente a la del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa, y preferentemente tiene la misma configuración que el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa.

15 Los azúcares unidos a las bases de la secuencia X y de la secuencia X' complementaria son ribosas o desoxirribosas, excepto la ribosa sustituida por un grupo modificador en la posición 2'. Preferentemente, todos los azúcares excepto la ribosa sustituida por un grupo modificador en la posición 2' son ribosa.

20 El ARN utilizado en la presente invención abarca derivados donde los átomos de oxígeno contenidos en el resto fosfato, resto éster, y similares en la estructura del ácido ribonucleico están sustituidos por otros átomos, por ejemplo, tales como un átomo de azufre.

25 El azúcar unido a la base en el extremo 5' del ARN utilizado en la presente invención puede ser aquel donde el grupo hidroxilo de la posición 5' está modificado con un grupo fosfato, un grupo modificador, o un grupo que se convierte en un grupo fosfato o un grupo modificador mediante la acción de una enzima nucleolítica o similar en el organismo. Preferentemente, el grupo hidroxilo en la posición 5' del azúcar unido a la base en el extremo 5' de la hebra de sentido directo está fosforilado.

30 El azúcar unido a la base en el extremo 3' del ARN utilizado en la presente invención puede ser aquel donde el grupo hidroxilo de la posición 3' está modificado con un grupo fosfato, un grupo modificador, o un grupo que se convierte en un grupo fosfato o un grupo modificador mediante la acción de una enzima nucleolítica o similar en el organismo.

35 Los ejemplos del grupo modificador en la presente divulgación incluyen 2'-ciano, 2'-alquilo, alquilo 2' sustituido, 2'-alquenilo, alquenilo 2' sustituido, 2'-halógeno, 2'-O-ciano, 2'-O-alquilo, 2'-O-alquilo sustituido, 2'-O-alquenilo, 2'-O-alquenilo sustituido, 2'-S-alquilo, 2'-S-alquilo sustituido, 2'-S-alquenilo, 2'-S-alquenilo sustituido, 2'-amino, 2'-NH-alquilo, 2'-NH-alquilo sustituido, 2'-NH-alquenilo, 2'-NH-alquenilo sustituido, 2'-SO-alquilo, 2'-SO-alquilo sustituido, 2'-carboxi, 2'-CO-alquilo, -CO-alquilo sustituido, -Se-alquilo, -Se-alquilo sustituido, -SiH₂-alquilo, -SiH₂-alquilo sustituido, 2'-ONO₂, 2'-NO₂, 2'-N₃, 2'-NH-alquilo, 2'-NH-alquilo sustituido, un resto 2'-aminoácido (aminoácido con el grupo hidroxilo eliminado del ácido carboxilo), y un resto 2'-O-aminoácido (que tiene la misma definición que anteriormente). La ribosa con la sustitución por un grupo modificador en la posición 2' de la presente divulgación abarca también los ácidos nucleicos en forma de puente (BNA) de una estructura donde el grupo modificador de la posición 2' está formando un puente con el átomo de carbono 4', específicamente, los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) donde el átomo de oxígeno de la posición 2' está formando un puente con el átomo de carbono 4' mediante ácidos nucleicos que forman un puente con metileno, etileno (ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175 (2004)], y similares.

Los grupos modificadores de la presente invención son 2'-O-metilo, 2'-O-etilo y/o, 2-flúor. 2'-O-metilo y 2'-O-etilo son los más preferibles.

50 De acuerdo con la divulgación, la gama de los grupos modificadores puede definirse basándose en su tamaño. Son preferibles los grupos modificadores de un tamaño correspondiente entre el tamaño del flúor al tamaño del -O-butilo, y son más preferibles los grupos modificadores de un tamaño correspondiente entre tamaño del -O-metilo al tamaño del O-etilo.

55 Los ejemplos del alquilo en el grupo modificador descrito en el presente documento incluyen alquilos lineales o ramificados que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, *terc*-pentilo, y hexilo. Los ejemplos preferidos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, neopentilo, *terc*-pentilo, y similares. Los ejemplos del alquenilo en el grupo modificador incluyen alquenos lineales o ramificados que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, tales como vinilo, alilo, e isopropenilo.

Los ejemplos del halógeno descritos en el presente documento incluyen un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, y un átomo de yodo.

65 Los ejemplos del aminoácido descrito en el presente documento incluyen aminoácidos alifáticos (específicamente, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, y similares), hidroxiaminoácidos (específicamente, serina, treonina, y

similares), aminoácidos ácidos (específicamente, ácido aspártico, ácido glutámico, y similares), amidas de aminoácidos ácidos (específicamente, asparagina, glutamina, y similares), aminoácidos básicos (específicamente, lisina, hidroxilisina, arginina, ornitina, y similares), aminoácidos que contienen azufre (específicamente, cisteína, cistina, metionina, y similares), iminoácidos (específicamente, prolina, 4-hidroxi prolina, y similares), y similares.

5 Los ejemplos de los sustituyentes del alquilo sustituido y del alqueno sustituido que se describen en el presente documento incluyen halógeno (que tiene la misma definición que anteriormente), hidroxilo, sulfanilo, amino, oxo, -O-
 10 alquilo (que tiene la misma definición que anteriormente), -S-alquilo (que tiene la misma definición que anteriormente), -NH-alquilo (que tiene la misma definición que anteriormente), dialquilaminoxilo (los dos alquilos pueden ser iguales o diferentes, y tienen la misma definición que anteriormente), dialquilamino (los dos alquilos pueden ser iguales o diferentes, y tienen la misma definición que anteriormente), dialquilaminoalqueno (los dos alquilos pueden ser iguales o diferentes, y tienen la misma definición que anteriormente); el alqueno significa un grupo donde el hidrógeno eliminado procede del alquilo anteriormente definido), y similares, y en número preferentemente de 1 a 3.

15 El ARN utilizado en la presente invención no depende de un método de producción, materia prima, y compuestos intermedios, y abarca también, por ejemplo, los ARN que utilizan ADN o desoxirribosa como la materia prima o compuesto intermedio, siempre que los productos finales tengan la misma fórmula estructural. Específicamente, la ribosa eliminada del átomo de oxígeno en la posición 2' de la presente invención abarca desoxirribosa, y la ribosa
 20 sustituida por un grupo modificador en la posición 2' abarca una desoxirribosa donde el hidrógeno de la posición 2' se sustituye con un grupo modificador como se define en las reivindicaciones.

25 En el ARN utilizado en la presente invención, es preferible que las ribosas sustituidas por un grupo modificador en la posición 2' se distribuyan de tal manera que se coloque de forma adyacente el número más pequeño posible de estas ribosas. Más preferentemente, las ribosas sustituidas por un grupo modificador en la posición 2' se combinan y distribuyen de tal manera que se colocan en posiciones alternas, o cada dos o tres posiciones, y no se colocan de forma adyacente. En particular, para las ribosas unidas a las bases de la secuencia X, es más preferible que del 30 al 55 % de las ribosas tengan una sustitución por un grupo modificador en la posición 2', y se coloquen en cada dos ribosas, y no se coloquen de forma adyacente.

30 Además, en los pares de bases complementarios de la secuencia X y de la secuencia X' complementaria, es preferible que las ribosas sustituidas por un grupo modificador en la posición 2' se coloquen solamente en una posición de ribosa de estas secuencias, en lugar de en ambas posiciones. Además, en esta estructura preferida, las ribosas sustituidas por un grupo modificador en la posición 2' se combinan y distribuyen más preferentemente de tal
 35 manera que se coloquen cada dos o tres o cuatro ribosas, y no se coloquen de forma adyacente.

40 El ARN utilizado en la presente invención puede producirse utilizando métodos de síntesis de ARN o ADN conocidos o bien métodos de modificación de ARN o ADN conocidos. Por ejemplo, el ARN puede obtenerse utilizando los servicios de síntesis química proporcionados por, por ejemplo, Hokkaido System Science Co., Ltd.

45 El liposoma de la composición de la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento, "liposoma A") es un liposoma que encapsula un ARN que contiene una secuencia que consiste de 15 a 30 bases contiguas del ARNm de un gen diana y una secuencia de bases complementaria de la secuencia. El liposoma A no está particularmente limitado, siempre que pueda alcanzar un tejido o un órgano que contiene un sitio de expresión del gen diana. Sin embargo, el liposoma A debe seleccionarse de manera adecuada, ya que algunos liposomas alcanzan el tejido u órganos más fácilmente que otros.

50 Los ejemplos de liposoma A utilizados en la presente invención incluyen un liposoma producido mediante tratamiento de evaporación en fase inversa de una emulsión de tipo agua en aceite (A/Ac) formada añadiendo un lípido glicolado con polietileno, un lípido neutro, y agua a una dispersión de un complejo de lípido catiónico/ARN en una capa de disolvente orgánico hidrófobo (véase la traducción al japonés de la solicitud internacional PCT, N.º 2002-501511), un liposoma producido a partir de un liposoma con ARN encapsulado preparado disminuyendo la concentración de etanol tras añadir lípido (en etanol) a una solución de ARN disuelto en una solución acuosa de un electrolito ácido, donde dicho liposoma con ARN encapsulado se somete a continuación a diálisis a un pH de la muestra aumentado para eliminar el ARN adherido a la superficie del liposoma (véase la traducción de la solicitud internacional PCT, N.º 2002-501511, y *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, Vol. 1510, p.152-166), un liposoma que incluye una partícula de un complejo que incluye una partícula principal y el ARN, y una membrana de bicapa lipídica para encapsular las partículas de complejo (véanse los documentos WO02/28367, y WO2006/080118), y similares. El liposoma A es preferentemente un liposoma que incluye partículas de complejo que contienen una partícula principal y el ARN, y una membrana de bicapa lipídica para encapsular las partículas de complejo. Es más preferible que los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica sean solubles en un disolvente orgánico polar, y en que los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica y las partículas de complejo sean dispersables en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica. Es también preferible que el liposoma A sea un liposoma que incluya partículas complejas que contienen una sustancia catiónica que contiene partículas principales y el ARN como componentes constituyentes, y una membrana de bicapa lipídica para revestir las partículas de complejo, y donde la membrana de bicapa lipídica incluye, como componentes

constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua. Más preferentemente, los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles en un disolvente orgánico polar, y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica y las partículas de complejo se pueden dispersar en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica. Tal como se usa en el presente documento, los términos "dispersar" significan dispersar el material insoluble.

Se ha notificado que los liposomas ilustrados anteriormente pueden administrarse a tejidos u órganos que soportan un tumor o inflamación, específicamente, a tumores sólidos, cánceres sólidos, o sitios de inflamación en vasos sanguíneos o en la proximidad de vasos sanguíneos, y similares. Los anteriores liposomas pueden por tanto utilizarse preferentemente cuando el gen diana es un gen asociado a tumor o inflamación.

Además, se ha notificado que los liposomas ilustrados anteriormente tienen una alta retención en sangre. De esta manera, estos liposomas tienen muchas posibilidades de administrarse a cualquier tejido u órgano mediante la circulación sistémica, y de esta manera, un gen que se puede dirigir no está limitado.

La partícula principal de la presente invención es una partícula fina de, por ejemplo, un ensamblaje lipídico, liposoma, micela polimérica, y similares, preferentemente una partícula fina de liposoma. La partícula principal de la presente invención puede ser un complejo como una combinación de dos o más de un ensamblaje lipídico, un liposoma, una micela polimérica, y similares. Por ejemplo, la partícula principal puede ser una micela polimérica como un complejo que contiene los lípidos componentes constituyentes de un ensamblaje lipídico, un liposoma, y similares, o un ensamblaje lipídico, liposoma, y similares como un complejo que contiene el polímero componente constituyente de una micela polimérica.

El ensamblaje lipídico o el liposoma (en lo sucesivo en el presente documento, el liposoma B) ya que la partícula principal puede contener componentes, por ejemplo, tal como un lípido y/o un tensioactivo, preferentemente un lípido, o una combinación de un lípido y un tensioactivo. El lípido no está especialmente limitado, y puede ser cualquiera de un lípido sencillo, un lípido complejo y un lípido derivado, y sus ejemplos incluyen un fosfolípido, un gliceroglicolípido, un esfingoglicolípido, un esfingoide, un esteroil, un lípido catiónico, y similares. Los ejemplos preferidos incluyen un fosfolípido y un lípido catiónico. Además, los ejemplos de lípidos incluyen también tensioactivos (la misma definición que el tensioactivo descrito a continuación) o lípidos derivados de polímeros (la misma definición que el polímero descrito a continuación, específicamente dextrano, etc.), un derivado de polioxitileno (específicamente, polietilenglicol, etc.) o similares. Los ejemplos de tensioactivos incluyen un tensioactivo no iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo de ion híbrido, y similares.

Los ejemplos de fosfolípidos como lípidos constituyentes de la partícula principal incluyen fosfolípidos naturales y sintéticos tales como fosfatidilcolina (específicamente, fosfatidilcolina de soja, fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC), diestearoil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, dimiristoil fosfatidilcolina, dioleoil fosfatidilcolina, etc.), fosfatidiletanolamina (específicamente, diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina, dioleoil fosfatidiletanolamina, etc.), glicerofosfolípidos (específicamente, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina, etc.) esfingofosfolípidos (específicamente esfingomielina, ceramida fosfoetanolamina, ceramida fosfoglicerol, ceramida fosfoglicerofosfato, etc.), glicerofosfonolípidos, esfingofosfonolípidos, lecitina natural (específicamente, lecitina de yema de huevo, lecitina de soja, etc.), y fosfolípidos hidrogenados (específicamente fosfatidilcolina de soja hogenada, etc.).

Los ejemplos de gliceroglicolípidos como lípidos constituyentes de la partícula principal incluyen sulforibosil glicérido, diglicosil glicérido, digalactosil diglicérido, galactosil diglicérido, glicosil diglicéridos y similares.

Los ejemplos de esfingoglicolípidos como lípidos constituyentes de la partícula principal incluyen galactosil cerebrósidos, lactosil cerebrósidos, gangliósidos, y similares.

Los ejemplos de esfingoides como lípidos constituyentes de la partícula principal incluyen esfingano, icosaesfingano, esfingosina, uno de sus derivados, y similares. Los ejemplos de derivados de los mismos incluyen aquellos donde el $-NH_2$ del esfingano, icosaesfingano, esfingosina o similares están sustituidos con $-NHCO(CH_2)_xCH_3$ (en la fórmula, x representa un número entero de 0 a 18, en particular, 6, 12 o 18), y similares.

Los ejemplos de esteroides como lípidos constituyentes de la partícula principal incluyen colesterol, dihidrocolesterol, lanosterol, β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, ergocasterol, fucosterol, 3β -[N(N,N'-dimetilaminoetil)carbamoil]colesterol (DC-Chol), y similares.

Los ejemplos de lípidos catiónicos como lípidos constituyentes de la partícula principal incluyen cloruro de N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N-dimetilamina (DODAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-(esperminacarboxiamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio (DMRIE), bromuro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio (DORIE), y similares.

Los ejemplos de tensioactivos no iónicos formadores de la partícula principal incluyen monooleato de sorbitán polioxietilenado (específicamente, Polisorbato 80, etc.), polioxipropilenglicol polioxietilenado (específicamente, Pluronic F68, etc.), un éster de ácido graso de sorbitán (específicamente, monolaurato de sorbitán, monooleato de sorbitán, etc.), un derivado de polioxietileno (específicamente, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado 60, alcohol polioxietilén laurílico, etc.), un éster de ácido graso de glicerol, y similares.

Los ejemplos de tensioactivos aniónicos formadores de la partícula principal incluyen acilsarcosina, alquilsulfato de sodio, alquilbenceno sulfonatos, un ácido graso de sodio que tiene 7 a 22 átomos de carbono y similares. Los ejemplos específicos incluyen dodecil sulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, y similares.

Los ejemplos de tensioactivos catiónicos formadores de la partícula principal incluyen una sal de alquilamina, una sal de acilamina, una sal de amonio cuaternario, un derivado de amina, y similares. Los ejemplos específicos incluyen cloruro de benzalconio, una sal de acilaminoetildietilamina, una sal de *N*-alquilpolialquilpoliamina, una polietilénpoliamida de ácido graso, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, alquilpolioxietileneamina, *N*-alquilaminopropilamina, un éster de ácido graso de trietanolamina, y similares.

Los ejemplos de iones híbridos formadores de la partícula principal incluyen 3[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato, *N*-tetradecil-*N,N*-dimetil-3-amonio-1-propano sulfonato, y similares.

En el liposoma B, estos lípidos y tensioactivos se usan solos o en combinaciones de dos o más, y preferentemente se usan en combinaciones de dos o más. Como combinación en el caso donde se usen en combinaciones de dos o más, por ejemplo, se pueden ilustrar una combinación de dos o más componentes seleccionados a partir de una fosfatidilcolina de soja hidrogenada, un fosfolípido glicolado con polietileno, y colesterol, una combinación de dos o más componentes seleccionados entre diestearoil fosfatidilcolina, un fosfolípido glicolado con polietileno, y colesterol, una combinación de EPC y DOTAP, una combinación de EPC, DOTAP, y un fosfolípido glicolado con polietileno, una combinación de EPC, DOTAP, colesterol, y un fosfolípido glicolado con polietileno, y similares.

Además, el liposoma B puede contener un estabilizador de membrana tal como un esteroide incluyendo colesterol, un antioxidante tal como tocoferol o similar, según sea necesario. Los estabilizadores pueden utilizarse tanto solos como en combinaciones de dos o más.

Los ejemplos de ensamblajes lipídicos incluyen micelas esféricas, micelas esféricas inversas, micelas con forma de salchicha, micelas inversa con forma de salchicha, micelas con forma de placa, micelas inversas con forma de placa, hexagonal I, hexagonal II y un producto asociado de dos o más moléculas lipídicas, y partículas en emulsión (por ejemplo, partículas en emulsión de aceite en agua (ac/a) tales como una emulsión grasa, una emulsión de un tensioactivo no iónico y aceite de soja, una emulsión lipídica, y una nanosfera de lípidos, partículas en emulsión de agua en aceite en agua (a/ac/a), y similares).

La micela de polímero puede ser una o más micelas seleccionadas entre, por ejemplo, proteína, albúmina, dextrano, polyfect, quitosán, sulfato de dextrano; y polímeros, por ejemplo, tales como poli-L-lisina, polietilénimina, ácido poliaspártico, un copolímero de estireno y ácido maleico, un copolímero de isopropilacrilamida y acrilpirrolidina, dendrímero modificado con polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y ácido poliláctico glicolado con polietileno, y una de sus sales.

Aquí, la sal del polímero incluye, por ejemplo, una sal metálica, una sal de amonio, una sal de adición de ácido, una sal de adición de amina orgánica, una sal de adición de aminoácidos, y similares. Los ejemplos de sales metálicas incluyen sales de metales alcalinos tales como una sal de litio, una sal de sodio y una sal de potasio, sal de sodio y sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como una sal de calcio y una sal de magnesio; una sal de aluminio; una sal de cinc, y similares. Los ejemplos de sales de amonio incluyen sales de amonio, tetrametilamonio, y similares. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen inorganatos tales como clorhidrato, un sulfato, un nitrato, y un fosfato, y organatos tales como un acetato, un maleato, un fumarato, y un citrato. Los ejemplos de sales orgánicas de adición de amina incluyen sales de adición de morfolina, piperidina, y similares, y los ejemplos de las sales de adición de aminoácidos incluyen sales de adición de glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, y similares.

Además, la partícula principal en la presente invención contiene preferentemente un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) seleccionadas entre, por ejemplo, azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua de un tensioactivo o similar. El derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) seleccionadas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o el tensioactivo se puede utilizar como componente constituyente de la partícula principal o se puede utilizar añadiendo este a la partícula principal.

Los ejemplos preferidos del derivado lipídico o del derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) seleccionadas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o del tensioactivo incluyen un glicolípido o un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua, y sus ejemplos más preferidos

incluyen un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua. El derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) seleccionadas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o el tensioactivo es preferentemente una sustancia que tiene un carácter doble donde una parte de la molécula tiene propiedades de unión a otro(s) componente(s) constituyente(s) de la partícula principal debido a, por ejemplo, afinidad hidrófoba, interacción electrostáticas o similar, y otra parte tiene la propiedad de unirse a un disolvente utilizado en la producción de la partícula principal debido a, por ejemplo, afinidad hidrófila, interacciones electrostáticas o similares.

Los ejemplos de derivados lipídicos del derivado de ácido graso de un azúcar, un péptido o un ácido nucleico incluyen aquellos que comprenden un azúcar tal como sacarosa, sorbitol o lactosa, un péptido tal como un péptido derivado de caseína, un péptido derivado de clara de huevo, un péptido derivado de soja o glutatión, un ácido nucleico tal como ADN, ARN, plásmido, ARNip u ODN, y cualquiera de los lípidos ilustrados en la definición anterior mencionada de la partícula principal o un ácido graso tal como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido mirístico o ácido láurico unidos entre sí y similares.

Los ejemplos de derivados lipídicos o el derivado de ácido graso de un azúcar incluyen los gliceroalcoholes y los esfingoglicolípidos ilustrados en la definición anteriormente mencionada de la partícula principal y similares.

Los ejemplos del derivado lipídico o del derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua incluyen aquellos que comprenden polietilenglicol, poliglicerol, polietilenimina, poli(alcohol vinílico), ácido poliacrílico, poli(acrilamida), oligosacárido, dextrina, una celulosa soluble en agua, dextrano, sulfato de condroitina, poliglicerol, quitosán, polivinilpirrolidona, poliaspartato amida, poli-L-lisina, manano, pululano, oligoglicerol o similares o uno de sus derivados y cualquiera de los lípidos ilustrados en la anterior definición mencionada de la partícula principal o un ácido graso tal como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido mirístico o ácido láurico unidos entre sí y similares. Más preferentemente, se pueden ilustrar un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un derivado de polietilenglicol o un derivado de poliglicerol, y además más preferentemente, se pueden ilustrar un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un derivado de polietilenglicol.

Los ejemplos del derivado lipídico o del derivado de ácido graso de un derivado de polietilenglicol incluyen un lípido glicolado con polietileno [específicamente, polietilenglicol fosfatidil etanolamina (más específicamente, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG-DSPE) y similares), aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 60, Cremophor EL y similares], ésteres de ácido graso de polietilenglicol sorbitán (específicamente, monooleato de polioxietileno sorbitán y similares), un éster de ácido graso de polietilenglicol y similares, y los ejemplos más preferidos incluyen un lípido glicolado con polietileno.

Los ejemplos del derivado lipídico o del derivado de ácido graso de un derivado de poliglicerol incluyen un lípido poliglicerolado (específicamente, poliglicerol fosfatidil etanolamina y similares), un éster de ácido graso de poliglicerol y similares, y los ejemplos más preferidos incluyen un lípido poliglicerolado.

Los ejemplos de tensioactivos incluyen los tensioactivos ilustrados en la definición anteriormente mencionada de la partícula principal, un polietilenglicol alquil éter y similares, y sus ejemplos preferidos incluyen polipropilenglicol polioxietileno, un éster de ácido graso de glicerol, un polietilenglicol alquil éter y similares.

La partícula principal tiene preferentemente una carga eléctrica positiva. La "carga eléctrica positiva" tal como se usa en el presente documento incluye una carga eléctrica, polarización superficial y similares que genera atracción electrostática por una carga eléctrica en el ARN anteriormente mencionado, polarización molecular y similares. Para que la partícula principal tenga una carga eléctrica positiva, la partícula principal contiene preferentemente una sustancia catiónica, más preferentemente contiene un lípido catiónico.

La sustancia catiónica que se va a incluir en la partícula principal es una sustancia que presenta una naturaleza catiónica, sin embargo, incluso si es una sustancia anfótera que un grupo catiónico y un grupo aniónico, la electronegatividad relativa varía dependiendo del pH, uniéndose a otra sustancia o similar, por tanto, la sustancia anfótera puede clasificarse en una sustancia catiónica como puede ser el caso. Estas sustancias catiónicas se pueden utilizar como un componente constituyente de la partícula principal o se puede utilizar añadiendo este a la partícula principal.

Los ejemplos de sustancias catiónicas incluyen las sustancias catiónicas entre las ilustradas en la definición anteriormente mencionada de las partículas principales (específicamente, un lípido catiónico, tensioactivos catiónicos (la misma definición que anteriormente), un polímero catiónico y similares), una proteína o un péptido que muestra naturaleza catiónica a un pH igual a o menor que el punto isoeléctrico, y similares. Más preferentemente, se pueden ilustrar una o más sustancias seleccionadas entre cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-*N,N,N*-trimetilamonio, *N*-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-*N,N*-dimetilamina, cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-*N,N,N*-trimetilamonio, bromuro de *N*-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-*N,N*-dimetil-*N*-hidroxietilamonio y 3β -[*N*-(*N,N'*-dimetilaminoetil)carbamoil]colesterol.

Los ejemplos de sustancias catiónicas en lípidos incluyen DOTAP, DODAP, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DORIE, DCChol y similares.

Los ejemplos de polímeros catiónicos incluyen poli-L-lisina, polietilenimina, polyfect, quitosán y similares.

La proteína o el péptido que muestra naturaleza catiónica a un pH igual o menor que el punto isoeléctrico no está particularmente limitada siempre que esta sea una proteína o un péptido que muestre naturaleza catiónica a un pH
5 igual a o menor que el punto isoeléctrico de la sustancia. Sus ejemplos incluyen albúmina, orosomucoide, globulina, fibrinógeno, pepsina, ribonucleasa T1 y similares.

La partícula principal de la presente invención puede producirse mediante o de acuerdo con un método de
10 producción conocido o un método similar a este, y la partícula principal producida se puede usar mediante cualquier método de producción. Por ejemplo, liposoma B, que es un tipo de partícula principal, se puede aplicar un método de preparación de liposomas conocido. Como método de preparación de liposomas conocido, por ejemplo, el método de preparación de liposomas de Bangham, et al.

Véase "Journal of Molecular Biology" (J. Mol. Biol.), Vol. 13, pp. 238-252 (1965)], un método de inyección de etanol
15 [véase "Journal of Cell Biology" (J. Cell Biol.), Vol. 66, pp. 621-634 (1975)], un método mediante prensa francesa [véanse "FEBS Letters" (FEBS Lett.), Vol. 99, pp. 210-214 (1979)], un método de congelación descongelación [véanse "Archives of Biochemistry and Biophysics" (Arch. Biochem. Biophys.), Vol. 212, pp. 186-194 (1981)], un método de evaporación en fase inversa [véanse "Proceedings of the National Academy of Science United States of America" (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), Vol. 75, pp. 4194-4198 (1978)], un método de gradiente de pH (véase, por
20 ejemplo, patente japonesa N.º 2.572.554, patente japonesa N.º 2.659.136, etc.) y similares. Como solución para dispersar liposomas B en la producción del liposoma B, por ejemplo, agua, un ácido, un álcali, y diversos tampones, una solución salina fisiológica, una infusión de aminoácidos o similares. Además, en la producción de liposomas B, es también posible añadir un antioxidante tal como ácidos cítricos, ácido ascórbico, cisteína o ácido etilendiamina tetracético (EDTA), un agente isotónico tal como glicerol, glucosa, cloruro de sodio o similares. Además, el liposoma
25 puede también producirse disolviendo un lípido o similar en, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como etanol, eliminando mediante destilación el disolvente, añadiendo una solución salina fisiológica o similar y removiendo la mezcla mediante agitación, formando por tanto el liposoma B.

Además, se puede llevar a cabo opcionalmente la mejora de la superficie del liposoma utilizando, por ejemplo,
30 tensioactivos no iónicos (la misma definición que anteriormente), tensioactivos catiónicos (la misma definición que anteriormente), tensioactivos aniónicos (la misma definición que anteriormente), un polímero, un derivado de polioxietileno o similar, y dicho liposoma mejorador de la superficie se usa también como componente constituyente de las partículas principales tales como el liposoma B en la presente invención [véase "Stealth Liposomes", editado por D. D. Lasic y F. Martin, CRC Press Inc., USA, pp. 93-102 (1995)]. Los ejemplos del polímero que se va a usar
35 para la mejora superficial incluyen dextrano, pululano, manano, amilopectina, hidroxietilalmidón y similares. Los ejemplos de derivados de polioxietileno incluyen Polisorbato 80, Pluronic F68, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 60, alcohol polioxietilenoaurílico, PEG-DSPE y similares. La mejora superficial de las partículas principales tales como liposomas B se puede llevar a cabo mediante los métodos de incorporación de derivados lipídicos o un derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) seleccionadas entre azúcares, péptidos, ácidos
40 nucleicos y polímeros solubles en agua de un tensioactivo en las partículas principales.

Puede seleccionarse libremente a demanda un diámetro de partículas promedio del liposoma B. Es preferible ajustar un diámetro de partículas promedio al diámetro de la partícula principal que se muestra a continuación. Los ejemplos
45 de métodos para ajustar el diámetro de partículas promedio incluye un método de extrusión y un método donde una gran vesícula liposómica multilamelar (MLV) se pulveriza mecánicamente (usando específicamente un microfluidizador Manton gaulin, o similar) (véase "Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs", editado por R. H. Muller, S. Benita y B. Bohm, Scientific Publishers, Stuttgart, Alemania, pp. 267-294, 1998) y similar.

Además, el método de producir un complejo obtenido combinando dos o más sustancias seleccionadas entre, por
50 ejemplo, un ensamblaje lipídico, liposoma B, una micela polimérica, y similares, que constituyen la partícula principal, puede ser, por ejemplo, un método de producción donde, por ejemplo, un lípido, un polímero o similar se mezclan solo en agua. En este momento, puede añadirse adicionalmente una etapa de granulación, una etapa de esterilización o similar según sea necesario. Además, es también posible llevar a cabo la formación del complejo en
55 cualquiera de diversos disolventes tales como acetona o éter.

Como en el caso del tamaño de la partícula principal en la presente invención, un diámetro de partículas promedio tiene preferentemente de varios nanómetros a algunas decenas de micrómetros, más preferentemente de
60 aproximadamente 10 nm a 1000 nm, aún más preferentemente de 50 nm a 300 nm.

Los ejemplos de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica para el revestimiento de las
65 partículas de complejo que contienen la partícula principal y el ARN en la presente invención incluyen los lípidos, los tensioactivos, y similares ilustrados en la definición anteriormente mencionada de la partícula principal, y sus ejemplos preferidos incluyen un lípido neutro entre los lípidos y tensioactivos. El lípido neutro tal como se usa en el presente documento significa un lípido que excluye la sustancia catiónica y el tensioactivo catiónico en los lípidos ilustrados en la sustancia catiónica en el caso en que la partícula principal tenga una carga eléctrica positiva como

se ha descrito anteriormente, y el lípido aniónico y el tensioactivo aniónico ilustrados en el agente competidor por la adhesión descrito más adelante entre los lípidos y tensioactivos, y los ejemplos preferidos del lípido neutro incluyen un fosfolípido, un gliceroglicolípido, un esfingoglicolípido, y similares. Sus ejemplos más preferidos incluyen un fosfolípido, y sus ejemplos aún más preferidos incluyen EPC. Estos lípidos o tensioactivos pueden utilizarse tanto

5

Además, los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica para el revestimiento de las partículas de complejo son preferentemente solubles en un disolvente orgánico polar, y preferentemente se pueden dispersar en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica. La concentración del disolvente polar en un líquido que contiene el disolvente polar en una concentración específica es preferentemente tal que los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son dispersables, y las partículas de complejo son también dispersables. Los ejemplos de disolventes orgánicos polares incluyen alcoholes tales como metanol, etanol, *n*-propanol, 2-propanol, *n*-butanol, 2-butanol, y *terc*-butanol, glicoles tales como glicerol, etilenglicol, y propilenglicol, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, y similares. Es preferible un alcohol, y es más preferible etanol.

10

15

Los ejemplos de disolventes diferentes del disolvente orgánico polar incluido en el líquido que contiene el disolvente orgánico polar de la presente invención incluyen agua, dióxido de carbono líquido, hidrocarburos líquidos, carbono halogenado, hidrocarburo halogenado, y similares, de los cuales es preferible el agua. Además, el disolvente puede incluir otros componentes, incluyendo iones y tampones. Se pueden utilizar uno o más disolventes. Cuando se utilizan dos o más disolventes, los disolventes combinados son preferentemente compatibles entre sí.

20

Además, los ejemplos preferidos del lípido que se va a usar en la membrana de bicapa lipídica para el revestimiento de las partículas de complejo incluyen un lípido sintético y similares. Los ejemplos del lípido sintético incluyen fosfatidilcolina fluorada, tensioactivos fluorados, bromuro de dialquilamonio, y similares. Estos se pueden usar solos o combinados con otro lípido o similar.

25

Además, la membrana de bicapa lipídica para el revestimiento de las partículas de complejo contiene preferentemente un derivado lipídico, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua, o el tensioactivo. Los ejemplos del derivado lipídico, el derivado de ácido graso, o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua incluyen el derivado lipídico anteriormente mencionado o el derivado de ácido graso de una o más sustancias seleccionadas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos, y polímeros solubles en agua, o el derivado de hidrocarburos alifáticos de una o más sustancias seleccionadas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos, y polímeros solubles en agua. El derivado de lípido, el derivado de ácido graso, o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua es más preferible un derivado de lípido o un derivado de ácido graso de los polímeros solubles en agua, preferentemente además un fosfolípido glicolado con polietileno, lo más preferente fosfatidil etanolamina glicolada con polietileno. Los ejemplos de derivados de hidrocarburos alifáticos de una sustancia soluble en agua en la presente invención comprenden aquellos que incluyen una sustancia soluble en agua unida a, por ejemplo, un resto alcohólico de un alcohol alifático de cadena larga, polioxiopropilnalquilo, un éster de ácido graso de glicerina, y similares.

30

35

40

Los ejemplos de derivados de hidrocarburos alifáticos de un azúcar, un péptido o un ácido nucleico incluyen un derivado de hidrocarburo alifático derivado de un azúcar tal como sacarosa, sorbitol o lactosa, un péptido tal como un péptido derivado de caseína, un péptido derivado de clara de huevo, un péptido derivado de soja o glutatión, un ácido nucleico tal como ADN, ARN, plásmido, ARNip u ODN.

45

Los ejemplos del derivado de hidrocarburo alifático de un polímero soluble en agua incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de polietilenglicol, poliglicerol, polietilenimina, poli(alcohol vinílico), ácido poliacrílico, poli(acrilamida), oligosacárido, dextrina, una celulosa soluble en agua, dextrano, sulfato de condroitina, poliglicerol, quitosán, polivinilpirrolidona, poliaspartato amida, poli-L-lisina, manano, pululano, oligoglicerol o similares o uno de sus derivados, y sus ejemplos más preferidos incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de un derivado de polietilenglicol o un derivado de poliglicerol, y sus ejemplos más preferidos incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de un derivado de polietilenglicol.

50

Cuando la partícula principal es una partícula fina que contiene el liposoma B como componente constituyente, una sustancia que contiene partículas de complejo que incluye el liposoma B y el ARN anteriormente mencionado como componentes constituyentes y una membrana de bicapa lipídica para el revestimiento de partículas de complejo se convierte en un liposoma A, que se clasifica como liposoma en un sentido estricto basándose en su estructura. Incluso si la partícula principal es diferente de una partícula fina que contiene el liposoma B como componente constituyente, la partícula principal está revestida con una membrana de bicapa lipídica, por tanto, la sustancia resultante se clasifica en liposoma en un sentido amplio. En la presente invención, se prefiere más que la partícula principal sea también una partícula fina que contiene el liposoma B.

55

60

Las partículas de complejo que contienen la partícula principal y el ARN como componentes constituyentes en la presente invención puede producirse adhiriendo o encapsulando el ARN a o en la partícula principal después o simultáneamente con la producción de la partícula principal. Además, el liposoma A puede producirse mediante

65

revestimiento de las partículas de complejo con la membrana de bicapa lipídica después o simultáneamente con la producción de las partículas de complejo. El liposoma A puede producirse mediante o de acuerdo con un método de producción conocido descrito en, por ejemplo, traducción al japonés de la solicitud internacional PCT n.º 2002-508765, traducción al japonés de la solicitud internacional PCT n.º 2002-501511, "Biochimica et Biophysica Acta", Vol. 1510, pp. 152-166 (2001), y en la publicación internacional n.º WO 02/28367, o se puede producir mediante un método de producción que incluye una etapa de dispersión de las partículas de complejo y los componentes de la capa de revestimiento en un líquido que contiene un disolvente orgánico polar donde los componentes de la capa de revestimiento son solubles a una concentración a la cual las partículas de complejo no se disuelven y los componentes de la capa de revestimiento están presentes en un estado disperso después que se producen las partículas de complejo adhiriéndose o encapsulándose al ARN o en la partícula principal, y una etapa de revestir las partículas de complejo con los componentes de la capa de revestimiento. Se prefiere que las partículas de complejo que contienen la partícula principal y el ARN como componentes constituyentes de la presente invención se produzcan después o simultáneamente de la producción de la partícula principal en agua, mezclando el ARN que se dispersa o disuelve en el líquido opcional con la partícula principal, adhiriendo o encapsulando a continuación en ARN a o en la partícula principal, o producido tras la producción de la partícula principal en agua, mezclando el ARN que se dispersa o disuelve en el agua con la partícula principal, adhiriendo a continuación el ARN a la partícula principal, y es más preferible que las partículas de complejo se produzcan tras la producción de la partícula principal en agua, mezclando el ARN que se dispersa o disuelve en el agua con la partícula principal, adhiriendo a continuación el ARN a la partícula principal.

Como método de producción preferido del liposoma A en la composición de la presente invención, puede ilustrarse el siguiente método de producción que incluye una etapa de producir partículas de complejo que contienen como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN (etapa 1) y una etapa de revestir las partículas de complejo con una membrana de bicapa lipídica (etapa 2 o etapa 3).

Etapa 1) Etapa de producir partículas de complejo que contienen como componentes constituyentes una partícula principal y el ARN

Las partículas principales se dispersan en un disolvente tal como agua, el ARN disperso o disuelto mezclando de forma que quede contenido en el líquido donde se dispersan las partículas principales, y el ARN se adhiere a las partículas principales. En la etapa 1, para suprimir la agregación de las partículas principales, las partículas principales son preferentemente partículas principales que contienen una sustancia supresora de la agregación, y más preferentemente, las partículas principales contienen como sustancia supresora de la agregación, el derivado lipídico mencionado anteriormente o el derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) seleccionadas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o el tensioactivo. Además, cuando las partículas principales tienen una carga eléctrica positiva, se permite que el ARN y el agente competidor por la adhesión coexistan en el líquido donde se dispersan las partículas cargadas, y el agente competidor por la adhesión puede adherirse a las partículas principales, así como al ARN. Además, también, cuando las partículas principales son partículas principales que contienen la sustancia supresora de la agregación, para suprimir adicionalmente la agregación de las partículas principales, se puede usar un agente competidor por la adhesión. En combinación con las partículas principales y el ARN, se prefiere seleccionar una combinación donde las partículas de complejo se puedan dispersar en el líquido que contiene un disolvente orgánico polar, y se prefiere más que la solubilidad de las partículas de complejo en el disolvente orgánico polar sea menor que la de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica que se va a usar en la etapa 2 o 3. Se prefiere además que una combinación donde se puede obtener el disolvente orgánico polar en un líquido a dicha concentración que la de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica sean dispersables y que las partículas de complejo que se seleccionan sean dispersables.

Los ejemplos de agentes competidores por la adhesión incluyen una sustancia aniónica y similares, y la sustancia aniónica incluye una sustancia electrostáticamente adherida a las partículas principales debido a la atracción electrostática por una carga eléctrica, la polarización intramolecular o similares en la molécula. La sustancia aniónica como el agente competidor por la adhesión es una sustancia que presenta una naturaleza aniónica, sin embargo, incluso si es una sustancia anfótera que un grupo catiónico y un grupo aniónico, la electronegatividad relativa varía dependiendo del pH, la unión con otra(s) sustancia(s) o similares, por tanto, la sustancia anfótera puede clasificarse en una sustancia aniónica como puede ser el caso.

Los ejemplos de sustancias aniónicas incluyen lípidos aniónicos, un tensioactivo aniónico (la misma definición que anteriormente), un polímero aniónico y similares, una proteína o un péptido o un ácido nucleico, que muestra naturaleza catiónica a un pH igual a o menor que el punto isoeléctrico, y similares. Sus ejemplos preferidos incluyen sulfato de dextrano, sulfato de sodio dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de sodio condroitina, ácido hialurónico, condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de heparán, heparina, sulfato de keratán, dextrano fluoresceína aniónica, y similares. Las sustancias aniónicas pueden usarse solas, o dos o más sustancias aniónicas pueden usarse en combinación.

Los ejemplos de lípidos aniónicos incluyen fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y similares.

Los ejemplos de polímeros aniónicos incluyen ácido poliaspártico, un copolímero de estireno y ácido maleico, un copolímero de isopropilacrilamida y acrilpirrolidona, dendrímero modificado con PEG, ácido poliláctico, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poliláctico glicolado con polietileno, sulfato de dextrano, sulfato de sodio dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de sodio condroitina, ácido hialurónico, condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de heparán, heparina, sulfato de keratán, dextrano fluoresceína aniónica y similares.

La proteína o el péptido que muestra naturaleza aniónica a un pH igual o mayor que el punto isoeléctrico no está particularmente limitada siempre que esta sea una proteína o un péptido que muestre naturaleza aniónica a un pH igual a o mayor que el punto isoeléctrico de la sustancia. Sus ejemplos incluyen albúmina, orosomucoide, globulina, fibrinógeno, histona, protamina, ribonucleasa, lisozima y similares.

Los ejemplos de ácidos nucleicos como sustancias aniónicas incluyen ADN, ARN, plásmido, ARNip, ODN y similares. Puede tener cualquier longitud y cualquier secuencia siempre que no presente una actividad fisiológica.

El agente competidor por la adhesión se adhiere preferentemente electrostáticamente a las partículas cargadas, y es preferentemente una sustancia con un tamaño que no permite la formación reticulada para agregar las partículas principales incluso si la sustancia se adhiere a las partículas principales, o una sustancia que tiene en su molécula, un resto que se adhiere a las partículas principales y un resto que repele la adhesión y suprime la agregación de las partículas principales.

Más específicamente, se puede llevar a cabo la etapa 1, por ejemplo, en un método de producción que incluye una etapa de producir un líquido donde se dispersan las partículas principales que contienen una sustancia supresora de la agregación, y una etapa de dispersar o disolver el ARN de tal manera que quede contenido en el líquido donde se dispersan las partículas principales, (por ejemplo, una etapa de añadir el ARN al líquido donde se dispersan las partículas principales y dispersar o disolver el ARN en el anterior, una etapa de añadir un líquido donde se dispersa o disuelve el ARN al líquido donde se dispersan las partículas principales o similares). Aquí, los ejemplos específicos de las partículas de complejo obtenidas mediante la etapa de dispersar o disolver el ARN de tal manera que quede contenido en el líquido donde se dispersan las partículas principales, contienen partículas de complejo formadas adhiriendo el ARN a partículas finas que contienen como componente constituyente, el liposoma B que contiene el lípido catiónico, partículas de complejo formadas adhiriendo el ARN a partículas finas que contienen como componente constituyente, un ensamblaje lipídico que contiene el lípido catiónico, y partículas de complejo formadas adhiriendo el ARN a partículas finas que contienen como componente constituyente, un polímero que contiene un polímero catiónico tal como poli-L-lisina. Además, la etapa de dispersar o disolver el ARN de tal manera que quede contenido en el líquido donde se dispersan las partículas principales es preferentemente una etapa de incorporar además el agente competidor por la adhesión en el líquido donde se dispersa o disuelve el ARN y añadir el líquido resultante al líquido donde se dispersan las partículas principales. En este caso, las partículas de complejo se producen adhiriendo el ARN y el agente competidor por la adhesión a las partículas principales, y la producción se puede llevar a cabo suprimiendo además la agregación de las partículas principales durante la producción de las partículas de complejo y la agregación de las partículas de complejo después de la producción.

La relación de las partículas principales al líquido donde se dispersan las partículas principales no está particularmente limitada siempre que se pueda adherir el ARN a las partículas principales, sin embargo, es preferentemente 1 µg/ml a 1 g/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1 a 500 mg/ml.

Etapa 2) Etapa de revestimiento de las partículas principales con la membrana de bicapa lipídica (1)

Se puede producir el liposoma A mediante, por ejemplo, un método de producción que incluye la etapa de preparar un líquido (líquido A) que contiene un disolvente orgánico polar donde se dispersan las partículas de complejo obtenidas en la etapa 1 y se disuelven los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, y la etapa de revestir las partículas de complejo con la membrana de bicapa lipídica reduciendo la relación del disolvente orgánico polar en el líquido A. En este caso, el liposoma A se obtiene en forma de una dispersión (líquido B). El disolvente del líquido A es un disolvente que contiene un disolvente orgánico polar a tal concentración que los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles y las partículas de complejo son dispersables. En el líquido B cuya relación del disolvente orgánico polar al líquido A está reducida, los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son dispersables y las partículas de complejo son también dispersables. Cuando el disolvente del líquido A es una mezcla líquida de un disolvente orgánico polar y un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar, por ejemplo, mediante la adición de un disolvente que contiene un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar que se puede mezclar con el disolvente orgánico polar (líquido C), y/o la eliminación selectiva del disolvente orgánico polar mediante destilación por evaporación, separación de membrana semipermeable, destilación fraccionada o similares, se puede reducir la relación del disolvente orgánico polar. Aquí, el líquido C es preferentemente un disolvente que contiene un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar, y puede contener también un disolvente orgánico polar siempre que la relación del disolvente orgánico polar en el líquido C sea menor que la del disolvente orgánico polar contenido en el líquido A.

Los ejemplos de disolventes diferentes de un disolvente orgánico polar en la etapa 2 incluyen agua, dióxido de carbono líquido, un hidrocarburo líquido, un carbono halogenado, un hidrocarburo halogenado y similares, y sus

ejemplos preferidos incluyen agua. Además, el líquido A y el líquido C pueden contener un ion, un componente tampón o similares. Estos se pueden usar solos, o se pueden usar dos o más en combinación.

5 La combinación de un disolvente orgánico polar con un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar es preferentemente una combinación de disolventes que se pueden mezclar, y se pueden seleccionar teniendo en cuenta la solubilidad de las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica en los disolventes en el líquido A y el líquido B, y el líquido C. Las partículas de complejo tienen preferentemente una solubilidad baja en cualquiera de los disolventes del líquido A y el líquido B, y el líquido C, y tienen también preferentemente una baja solubilidad en cualquiera de un disolvente orgánico polar y un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar. Los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica tienen preferentemente una baja solubilidad en el disolvente del líquido B, y el líquido C, y tienen preferentemente una alta solubilidad en el disolvente del líquido A, y tienen preferentemente una alta solubilidad en un disolvente orgánico polar y tienen preferentemente una baja solubilidad en un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar. Aquí, las partículas de complejo que tienen una baja solubilidad significan que la elución de cada componente contenido en las partículas de complejo tal como las partículas principales, el ARN y el agente competidor por la adhesión es baja, e incluso si las respectivas solubilidades de los componentes son altas, es suficiente que la elución de cada componente sea baja debido a la unión o similares entre los respectivos componentes. Por ejemplo, incluso cuando la solubilidad de cualquiera de los componentes contenidos en las partículas principales en el disolvente del líquido A sea alta, si las partículas principales tienen una carga eléctrica positiva, y se forman enlaces electrostáticos debido a una carga eléctrica, la polarización intramolecular o similares en el ARN, y la solubilidad del(de los) componente(s) en el disolvente del líquido A se vuelve baja, se suprime la elución de los componentes en las partículas de complejo, por lo cual se puede disminuir la solubilidad de las partículas de complejo en el disolvente del líquido A. Es decir, si las partículas principales tienen una carga eléctrica positiva, se suprime la elución de los componentes de las partículas de complejo en la producción del liposoma A, y se transmite un efecto de aumentar la productividad y el rendimiento.

La concentración del disolvente orgánico polar en el líquido A no está particularmente limitada siempre que sea una concentración a la cual los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica sean solubles y las partículas de complejo sean dispersables, y varía dependiendo del disolvente o de las partículas de complejo que se van a usar, el tipo de componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica o similares. Sin embargo, es preferentemente de aproximadamente un 30 % en v/v o más, más preferentemente de 60 a 90 % en v/v. Además, la concentración del disolvente orgánico polar en el líquido B no está particularmente limitada siempre que el líquido B contenga el disolvente orgánico polar a una concentración menor que el líquido A y esta sea una concentración a la cual los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica sean dispersables y las partículas de complejo sean también dispersables, sin embargo, es preferentemente aproximadamente un 50 % en v/v o menos.

La etapa de preparar el líquido A puede ser una etapa de preparar el líquido A mediante la adición del disolvente orgánico polar, las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, además, si fuera necesario, el disolvente diferente del disolvente orgánico polar. El disolvente orgánico polar, las partículas de complejo, los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica y el disolvente diferente del disolvente orgánico polar se pueden añadir en cualquier orden siempre que no se disuelvan las partículas de complejo. Preferentemente, se puede ilustrar la etapa de preparar el líquido A mediante la preparación de un líquido (líquido D) que contiene un disolvente orgánico polar donde se dispersan las partículas de complejo mediante la preparación de un líquido (líquido E) donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se disuelven en un disolvente que contiene un disolvente orgánico polar que es igual o diferente del disolvente orgánico polar del líquido D, y mezclar el líquido D y el líquido E. Cuando el líquido A se prepara mezclando el líquido D y el líquido E, se prefiere mezclarlos gradualmente.

50 Etapa 3) Etapa de revestimiento de las partículas principales con la membrana de bicapa lipídica (2)

Se puede producir el liposoma A mediante un método de producción que incluye una etapa de dispersar las partículas de complejo obtenidas en la etapa 1 y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica en un líquido (líquido F) que contiene un disolvente orgánico polar donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles a una concentración a la cual los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica están presentes en un estado disperso. En este caso, el liposoma A puede obtenerse en un estado de dispersión. Aunque los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles en un disolvente orgánico polar contenido en el líquido F, el líquido F contiene el disolvente orgánico polar, donde se puede obtener el disolvente orgánico polar en un líquido a tal concentración que los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica sean dispersables y que las partículas de complejo sean dispersables.

60 Como método para preparar el líquido F, se puede emplear cualquier realización. Por ejemplo, el líquido F puede prepararse preparando una dispersión de partículas de complejo y una solución o una dispersión de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica y mezclando ambos líquidos, o puede prepararse el líquido F preparando una cualquiera de las dispersiones de las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, y añadiendo y dispersando las otras partículas de complejo restantes o los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica en la forma de un sólido en la

dispersión resultante. Cuando se mezclan una dispersión de las partículas de complejo y una solución o una dispersión de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, un medio de dispersión de las partículas de complejo puede incluir por adelantado un disolvente orgánico polar, y un disolvente o un medio de dispersión de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica puede ser un líquido que contiene un disolvente orgánico polar o un líquido compuesto solo por un disolvente orgánico polar. Por otra parte, cuando se preparan dispersiones de una cualquiera de las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, y las otras partículas de complejo restantes o componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica en la forma de un sólido se añaden a la suspensión resultante, la dispersión resultante es preferentemente un líquido que contiene un disolvente orgánico polar. Incidentalmente, cuando las partículas de complejo no se disuelven y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se dispersan después de preparar el líquido F, se puede añadir un disolvente orgánico polar en un intervalo de concentración del disolvente orgánico polar donde las partículas de complejo no se disuelven y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se dispersan, o se puede eliminar el disolvente orgánico o se puede reducir su concentración. Por otra parte, cuando las partículas de complejo no se disuelven y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se disuelven después de preparar el líquido F, el disolvente orgánico polar puede eliminarse o reducirse su concentración a un intervalo de concentraciones del disolvente orgánico polar donde las partículas de complejo no se disuelven y se dispersan los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica. Como alternativa, las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se mezclan previamente en un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar, se puede añadir al anterior un disolvente orgánico polar en un intervalo de concentración del disolvente orgánico polar donde las partículas de complejo no se disuelven y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se dispersan. En este caso, las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se dispersan por separado en disolventes diferentes de un disolvente orgánico polar, y ambas dispersiones se mezclan, y después, se puede añadir a lo anterior un disolvente orgánico, o uno cualquiera de las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se dispersan en un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar, y las otras partículas de complejo restantes o componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica en la forma de un sólido se añaden a la suspensión resultante, y a continuación se puede añadir a la anterior un disolvente orgánico polar. Además, se prefiere incluir una etapa de dejar reposar o mezclar el líquido donde las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se dispersan y el disolvente orgánico polar está contenido, durante un tiempo suficiente para revestir las partículas de complejo con la membrana de bicapa lipídica. El tiempo para dejar reposar el líquido o mezclar el líquido después de que las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se dispersan en el líquido que contiene el disolvente orgánico polar no está limitado siempre que este no se complete inmediatamente después que las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se dispersen en el líquido que contiene el disolvente orgánico polar, sin embargo, puede ajustarse arbitrariamente dependiendo de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica o del tipo del líquido que contiene el disolvente orgánico polar, y se ajusta preferentemente a un tiempo donde se mantiene constante el rendimiento del liposoma A obtenido, por ejemplo, de 3 segundos a 30 minutos.

Los ejemplos de disolventes diferentes de un disolvente orgánico polar en el líquido F incluyen los ilustrados en el disolvente diferente de un disolvente orgánico polar en la etapa 2, y sus ejemplos preferidos contienen agua.

La concentración del disolvente orgánico polar en el líquido F no está particularmente limitada siempre que se cumpla solo el requerimiento de dispersarse de las partículas de complejo y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, y varía dependiendo del disolvente o de las partículas de complejo que se van a usar, el tipo de componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica o similares. Sin embargo, es preferentemente aproximadamente de 1 a 80 % en volumen, más preferentemente aproximadamente de 10 a 60 % en volumen, más preferentemente aproximadamente de 20 a 50 % en volumen, y lo más preferente aproximadamente de 30 a 40 % en volumen.

En la presente invención, la descripción de que los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles en un disolvente orgánico polar incluye un caso donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica tienen la propiedad de disolverse en un disolvente orgánico polar, un caso donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica tienen la propiedad de disolverse en un disolvente orgánico polar con la ayuda de un solubilizante o similar, un caso donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica tienen la propiedad de emulsionarse o formar una emulsión formando agregados, micelas o similares en un disolvente orgánico polar y similares. Además, la descripción de que los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son dispersables incluye un estado donde el total de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica forman agregados, micelas o similares y se emulsionan o forman una emulsión, un estado donde una parte de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica forman agregados, micelas o similares y se emulsionan o forman una emulsión, y el resto de los componentes se disuelven, un estado donde una parte de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica forman agregados, micelas o similares y se emulsionan o forman una emulsión, y el resto de los componentes se precipitan y similares. De forma incidental, la descripción de que los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica se disuelven no incluye un estado donde el total de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica forman agregados, micelas o similares y se emulsionan o forman

una emulsión.

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

La concentración de las partículas de complejo en la solución acuosa que contiene un disolvente orgánico polar que se va a usar en el método de producir el liposoma A de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitada, siempre que permita a las partículas de complejo revestirse con la membrana de bicapa lipídica, sin embargo, es preferentemente 1 µg/ml a 1 g/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1 a 500 mg/ml. Además, la concentración de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica que se va a usar no está particularmente limitada siempre que permita el revestimiento de las partículas de complejo, sin embargo, es preferentemente 1 µg/ml a 1 g/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1 a 400 mg/ml.

La relación de la membrana de bicapa lipídica al liposoma A de la presente invención es preferente mente de aproximadamente 1:0,1 a 1:1000, más preferentemente aproximadamente 1:1 a 1:10 en relación en peso.

Además, como en el caso del tamaño del liposoma A de la presente invención, un tamaño de partículas promedio es preferentemente aproximadamente 300 nm o menos, más preferentemente aproximadamente 200 nm o menos. Específicamente, por ejemplo, se prefiere un tamaño inyectable.

Además, el liposoma A obtenido anteriormente puede estar modificado con una sustancia tal como una proteína incluyendo un anticuerpo y similares, un sacárido, un glucolípido, un aminoácido, un ácido nucleico, o cualquiera de diversos compuestos y polímeros de bajo peso molecular, y dichas partículas de complejo revestidas obtenidas mediante modificación se incluyen en el liposoma A. Por ejemplo, para aplicar el direccionamiento, es posible que el liposoma A obtenido anteriormente se someta adicionalmente a una modificación superficial de la membrana de bicapa lipídica utilizando una proteína tal como un anticuerpo, un péptido, un ácido graso o similar [véase Stealth Liposomes, editado por D. D. Lasic y F. Martin, CRC Press Inc., USA, pp. 93-102, (1995)]. Además, puede llevarse también a cabo la mejora superficial del liposoma A utilizando, por ejemplo, un derivado lipídico, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua. El derivado de lípido, el derivado de ácido graso, y el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua que se va a usar en la modificación superficial tiene las mismas definiciones que el derivado lipídico, el derivado de ácido graso, y el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua como los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica.

Mediante la administración de la composición de la presente invención a un mamífero incluyendo seres humanos, el ARN puede administrarse a un sitio de expresión de un gen diana, y, por ejemplo, se puede introducir un ARN que puede suprimir la expresión del gen en una célula de mamífero in vivo, posibilitando suprimir la expresión del gen o similar. Por ejemplo, como el gen diana de la composición de la presente invención que se define en las reivindicaciones es un gen asociado con el tumor o la inflamación, la composición de la presente invención puede utilizarse como agente terapéutico o preventivo para el cáncer o enfermedades inflamatorias, preferentemente un agente terapéutico o preventivo para el cáncer sólido, o inflamación en vasos sanguíneos en la proximidad de vasos sanguíneos. Específicamente, por ejemplo, cuando el gen diana de la composición de la presente invención es un gen asociado con la angiogénesis o similar, se puede suprimir el crecimiento del músculo liso vascular, la angiogénesis, o similares, y se puede utilizar la composición de la presente invención, por ejemplo, como agente terapéutico o preventivo para el cáncer o las enfermedades inflamatorias que implican el crecimiento del músculo liso vascular o la angiogénesis.

En otras palabras, la presente divulgación proporciona también un método para tratar el cáncer o las enfermedades inflamatorias, por el cual la composición de la presente invención que se ha descrito anteriormente se administra a un mamífero. Preferentemente, el sujeto de la administración es un ser humano, preferentemente individuos humanos afectados por cáncer o enfermedades inflamatorias.

Además, la composición de la presente invención se puede usar también como herramienta para adquirir PoE (prueba de concepto) en un sistema de selección in vivo que se refiere a un agente terapéutico o preventivo para el cáncer o enfermedades inflamatorias.

La composición de la presente invención se puede utilizar como una preparación prevista para la estabilización del ARN en un componente de un organismo vivo tal como un componente de la sangre (por ejemplo, sangre, tracto gastrointestinal o similar), reducción de efectos secundarios, aumento de la acumulación de fármacos en tejidos u órganos que contiene el sitio de expresión del gen diana, y similares.

Como la composición de la presente invención se usa como agente terapéutico para el cáncer y la inflamación, se prefiere que la ruta de administración sea la más eficaz para el tratamiento que se va a usar. Los ejemplos de la ruta de administración incluyen rutas de administración parenterales tales como administración intraoral, administración traqueobronquial, administración intrarrectal, administración subcutánea, administración intramuscular, y administración intravenosa, y rutas de administración orales. Sus ejemplos preferidos incluyen la administración intravenosa y la administración intramuscular, y sus ejemplos más preferidos incluyen la administración intravenosa.

Las dosis pueden variar dependiendo de las dolencias y la edad del sujeto, la vía de administración, y similares. Por ejemplo, según se describe, se administra diariamente una dosis de aproximadamente 0,1 µg a 1000 mg en términos de ARN.

Como una preparación adecuada para la administración intravenosa o la administración intramuscular, por ejemplo, se puede ilustrar una inyección, y es también posible utilizar la dispersión del liposoma A preparada mediante el método anteriormente mencionado que está en la forma de, por ejemplo, una inyección o similar. Sin embargo, puede utilizarse tras eliminar el disolvente de la dispersión mediante, por ejemplo, filtración, centrifugación o similar, o tras liofilizar la dispersión o la dispersión suplementada con un excipiente tal como manitol, lactosa, trehalosa, maltosa o glicina.

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

Entre las composiciones de la presente invención descritas anteriormente, el agente terapéutico para el cáncer o enfermedades inflamatorias de la presente invención puede ser una composición que incluye:

un ARN que contiene una secuencia que consiste en de 15 a 30 bases contiguas de ARNm de un gen diana asociado con tumor o inflamación como se define en las reivindicaciones (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X_1), y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X_1') complementaria de la secuencia X_1 , estando del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X_1 y la secuencia complementaria X_1' ribosa que tiene una sustitución por un grupo modificador como se define en las reivindicaciones en la posición 2' y que puede suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi); y

el liposoma A que puede ser bien un liposoma que incluye una partícula de complejo que contiene una partícula principal que contiene una sustancia catiónica y el ARN como componentes constituyentes, y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, siendo los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica solubles en un disolvente orgánico polar, y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica y las partículas de complejo se pueden dispersar en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica, o un liposoma que incluye una partícula de complejo que contiene una partícula principal que comprende una sustancia catiónica y el ARN como componentes constituyentes, y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, conteniendo la membrana de bicapa lipídica, como componentes constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua. En el agente terapéutico para el cáncer o enfermedades inflamatorias de la presente invención, el cáncer es preferentemente un cáncer sólido, y la enfermedad inflamatoria es preferentemente una inflamación en vasos sanguíneos o en la proximidad de vasos sanguíneos.

Además, la presente invención proporciona el uso de la composición de la presente invención descrita anteriormente en la fabricación de un agente terapéutico para el cáncer o la enfermedad inflamatoria, preferentemente un agente terapéutico para el cáncer sólido, o la inflamación en vasos sanguíneos en la proximidad de vasos sanguíneos. La composición puede ser una composición que incluye:

un ARN que contiene una secuencia que consiste en de 15 a 30 bases contiguas de ARNm de un gen diana asociado con tumor o inflamación como se define en las reivindicaciones (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X_1), y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X_1') complementaria de la secuencia X_1 , estando del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X_1 y la secuencia complementaria X_1' ribosa que tiene una sustitución por un grupo modificador como se define en las reivindicaciones en la posición 2' y que puede suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi); y

el liposoma A que puede ser bien un liposoma que incluye una partícula de complejo que contiene una partícula principal que contiene una sustancia catiónica y el ARN como componentes constituyentes, y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, siendo los componentes constituyentes de la membrana de

bicapa lipídica solubles en un disolvente orgánico polar, y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica y las partículas de complejo se pueden dispersar en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica, o un liposoma que incluye una partícula de complejo que contiene una partícula principal que comprende una sustancia catiónica y el ARN como componentes constituyentes, y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, conteniendo la membrana de bicapa lipídica, como componentes constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua.

La presente invención se describirá específicamente a continuación con referencia a los Ejemplos y Ejemplos de ensayo. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos Ejemplos y Ejemplos de ensayo.

Ejemplo 1

El ARN utilizado en el Ejemplo 1 es un ARN bicatenario que contiene una secuencia que consiste en 19 bases contiguas del ARNm de un gen BCI2 (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X₂) y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X₂') complementaria a la secuencia X₂ [sentido directo: 5'-GmUG mAAMG UmCA mAcmA UmGC mCUMG CdTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidos por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a, y 18^a precedidas por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 1); sentido contrario: 5'-mGCmA GmGC mAUmG UmUG mAcmU UmCA mCdTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidos por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, 11^a, 13^a, 15^a, 17^a, y 19^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 2)] (en lo sucesivo en el presente documento, 2'-OMe BCI2sARNip Exp. 1). El cincuenta por ciento de todas las ribosas unidas a las bases de la secuencia X₂ y la secuencia X₂' complementaria son ribosas sustituidas con un grupo 2'-O-metilo. Se obtuvieron la hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario de Eurogentec (Bélgica), que se hibridaron para preparar el ARN bicatenario.

DOTAP (fabricado por Avanti Polar lipids Inc.), PEG-DSPE (fabricado por NOF Corporation) y agua destilada (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) se mezclaron de tal manera que la relación de DOTAP/PEG-DSPE/agua destilada era de 40 mg/16 mg/1 ml, y la mezcla se removió agitando con un mezclador de tipo vórtice. La suspensión obtenida se pasó, a 70°C, a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,4 µm (fabricado por Costar) 10 veces y a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,2 µm (fabricado por Whatman) 3 veces y a continuación a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,1 µm (fabricado por Corning) 10 veces y un filtro de membrana de policarbonato de 0,05 µm (fabricado por Whatman) 20 veces. La partícula principal tiene un diámetro de partículas promedio de 73,01 nm medida con dispersión dinámica de luz (DIS).

Por separado, se mezclaron EPC (NOF Corporation)/PEG-DSPE (NOF Corporation)/etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)/agua (15 mg/3,125 mg/0,625 ml/0,375 ml), y se preparó una solución que contenía los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica.

La dispersión de partículas cargadas obtenida (0,875 ml) se mezcló con una solución acuosa (0,2917 ml) obtenida mezclando 2'-OMe BCI2ARNip Exp. 1 en agua en una proporción de 24 mg/1 ml, a fin de preparar las partículas de complejo. La dispersión de partículas de complejo obtenida se añadió a la solución de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica (4,667 ml), y se añadieron 1,459 ml de agua destilada. Después, tras añadir la solución de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica (0,4667 ml), se añadió gradualmente agua destilada (54,31 ml) para ajustar la concentración de etanol a 5 % o menos. La suspensión de liposomas obtenida se sometió a ultracentrifugación (80 min, 110.000 x g, 25°C), y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en aproximadamente 5 ml de suero salino fisiológico (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

El liposoma tiene un diámetro de partículas promedio de 92,89 nm medido con DIS. La cuantificación de 2'-OMe BCI2siRNA Exp. 1 en el liposoma encontró que la concentración era 1,2460 mg/ml, y que el porcentaje de recuperación con respecto a la cantidad cargada de 2'-OMe BCI2ARNip Exp. 1 era de 88,02 %. Finalmente, se obtuvo una preparación ajustando la concentración de 2'-OMe BCI2ARNip Exp. 1 a 0,75 mg/ml con adición de suero salino fisiológico (3,270 ml).

Ejemplo comparativo 1

El ARN utilizado en el Ejemplo comparativo 1 es un ARN bicatenario que contiene la secuencia X₂ y la secuencia complementaria X₂' [sentido directo: 5'-GUG AAG UCA ACA UGC CUG CdTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 3); sentido contrario: 5'-GCA GGC AUG UUG ACU UCA CdTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 4)] (en lo sucesivo en el presente documento, BCI2siRNA Com. 1). Se obtuvieron la hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario de Eurogentec (Bélgica), que se hibridaron para preparar el ARN bicatenario.

Se prepararon las partículas mezclando 24 mg/ml de una solución acuosa de BCI2ARNip Com. 1 (0,1667 ml) con una dispersión de partículas principales (0,5 ml) obtenida de la misma manera que en el Ejemplo 1. La dispersión de partículas de complejo obtenida se añadió a una solución de los componentes constituyentes de la membrana de

bicapa lipídica (2,667 ml), y se añadió agua destilada (0,8334 ml). Después, tras añadir la solución del componente constituyente de la membrana de bicapa lipídica (0,2667 ml), se añadió gradualmente agua destilada (31,03 ml) para ajustar la concentración de etanol a 5 % o menos. La suspensión de liposomas obtenida se sometió a ultracentrifugación (80 min, 110.000 x g, 25 °C), y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en aproximadamente 2 ml de suero salino fisiológico (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

El liposoma tiene un diámetro de partículas promedio de 88,31 nm medido con DIS. La cuantificación de BC12ARNip Com. 1 en el liposoma encontró que la concentración era de 1,7332mg/ml, y que el porcentaje de recuperación con respecto a la cantidad cargada de BC12ARNip Com. 1 era del 90,09 %. Finalmente, se obtuvo una preparación ajustando una concentración BC12ARNip Com. 1 a 1,5 mg/ml con adición de suero salino fisiológico (0,3232 ml).

Ejemplo de ensayo 1

Soluciones de fármacos (concentración de ARNip, 750 µg/ml; 200 µl) que contenían las preparaciones obtenidas en el Ejemplo 1 y el Ejemplo comparativo 1 se administraron dos veces a ratones Balb/c macho (6 semanas de edad, CIEA Japan, Inc.) a través de la vena de la cola en el intervalo de 7 días (dosis, 150 µg/ratón). Tras la segunda administración, se recogió sangre (10 µl) de la arteria de la cola en cada punto temporal tras 0,5, 3, 7, y 24 horas, y se mezcló con 90 µl de una solución desnaturalizante (4 mol/l de tiocianato de guanidina, 25 mmol/l de sodio, 0,1 % en v/v de 2-mercaptoetanol, 0,5 % en p/v *N*-lauroil sarcosina de sodio; en lo sucesivo en el presente documento, solución D). Como resultado, se obtuvo 10 % en v/v de sangre.

El 10 % en v/v (10 µl) del grupo del cual se obtuvo la preparación en el Ejemplo 1 se mezcló con 10 µl de una solución acuosa de dietilpirocarbonato (un 0,1 % en v/v de una mezcla de dietilpirocarbonato en agua ultrapura), 10 µl de solución I.S. (0,3 µmol/l de la solución acuosa de dietilpirocarbonato como I.S.), 100 µl de solución D, 10 µl de acetato de sodio 2 mmol/l (pH 4,0), y 150 µl de una solución de fenol/cloroformo saturada con TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) (se usó la capa inferior de una mezcla de relación 1:1 en volumen de fenol y cloroformo saturada con TE). A continuación se centrifugó la mezcla a 132.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se mezcló el sobrenadante (65 µl) con 15 µl de una solución GenTIE (vehículo de precipitación GenTIE (Takara Bio Inc.) diluido 15 veces con la solución acuosa de dietilpirocarbonato), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante al menos 10 min después de la edición de etanol (200 µl). Tras 10 min de centrifugación (132.000 x g) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y se añadió al precipitado etanol al 75 % en v/v (200 µl). Tras 15 min de centrifugación (132.000 x g) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se secó al aire y se disolvió en 100 µl de una solución de redisolución (en una relación 0,1/0,4/30/1.000 en volumen de dietilpirocarbonato/trietilamina/hexafluoroisopropanol/agua). La mezcla se centrifugó a 132.000 x g durante 10 min a 4 °C, y se cuantificó el sobrenadante como muestra de análisis utilizando HPLC. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

Equipo

Equipo de HPLC: ACQUITY UPIC System (Waters)
Espectrómetro de masas: API4000 Q TRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex)
Programa informático de análisis: Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex)

Condiciones de HPLC

Sustancia patrón interna (P.I.)

5'-GmUG mAAMG UmCA mACmA UmGC mCUmG CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a, y 18^a precedidas por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 5)

5'-mGCmA GmGC mAUmG UmUG mACmU UmCA mCdT-3' (el azúcar unido a la base precedida por d es desoxirribosa, y los azúcares unidos a las bases 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, 11^a, 13^a, 15^a, 17^a, y 19^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 6)

Columna: Xbridge C18 (3,5 µm, 2,1 mm D.I. x 50 mm, Waters)
Prefiltro: Cartucho para precolumna Xbridge (3,5 µm, 2,1 mm D.I. x 10 mm, Waters)
Temperatura de la columna: 65°C

Fase móvil: trietilamina/hexafluoroisopropanol/agua (0,4/30/1000):metanol = 93,7 a 75,25

Cantidad de inyección: 25 µl

Detección: Espectroscopía de masas (método de ionización; ionización por electropulverización, negativa, temperatura de la fuente de iones: 500°C)

El 10 % en v/v (10 µl) del grupo del cual se obtuvo la preparación del Ejemplo comparativo 1 se mezcló con 10 µl de una solución acuosa de dietilpirocarbonato (un 0,1 % en v/v de una mezcla de dietilpirocarbonato en agua ultrapura), 10 µl de solución I.S. (0,3 µmol/l de la solución acuosa de dietilpirocarbonato como I.S.), 100 µl de solución D, 10 µl de acetato de sodio 2 mmol/l (pH 4,0), y 150 µl de una solución ácida saturada de fenol/cloroformo (se usó la capa

inferior de una mezcla de relación 1:1 en volumen de fenol y cloroformo saturada ácida). A continuación se centrifugó la mezcla a 132.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se mezcló el sobrenadante (65 µl) con 15 µl de una solución GentIE (vehículo de precipitación GentIE (Takara Bio Inc.) diluido 15 veces con la solución acuosa de dietilpirocarbonato), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante al menos 10 min después de la edición de etanol (200 µl). Tras 10 min de centrifugación (132.000 x g) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y se añadió al precipitado etanol al 75 % en v/v (200 µl). Tras 15 min de centrifugación (132.000 x g) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se secó al aire y se disolvió en 100 µl de una solución de redisolución (en una relación 0,1/0,4/30/1.000 en volumen de dietilpirocarbonato/trietilamina/hexafluoroisopropanol/agua). La mezcla se centrifugó a 132.000 x g durante 10 min a 4 °C, y se cuantificó el sobrenadante como muestra de análisis utilizando HPLC. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

Equipo

Equipo de HPLC: ACQUITY UPLC System (Waters)
 15 Espectrómetro de masas: API4000 Q TRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex)
 Programa informático de análisis: Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex)

Condiciones de HPLC

20 Sustancia patrón interna (P.I.)

5'-GUG AAG UCA ACA UGC CUG dTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 7)

25 5'-CAG GCA UGU UGA CUU CAC dTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 8)

Columna: Xbridge C18 (3,5 µm, 2,1 mm D.I. x 50 mm, Waters)

Prefiltro: Cartucho para precolumna Xbridge (3,5 µm, 2,1 mm D.I. x 10 mm, Waters)

Temperatura de la columna: 65°C

30 Fase móvil: trietilamina/hexafluoroisopropanol/agua (0,4/30/1000):metanol = 93,7 a 75,25

Cantidad de inyección: 25 µl

Detección: Espectroscopía de masas (método de ionización; ionización por electropulverización, negativa, temperatura de la fuente de iones: 500°C)

35 La presente invención proporciona también un método fácil y fiable para medir una concentración de ARNip en sangre. El método para medir la concentración del ARNip en sangre de la presente invención puede ser un método donde, como se ha descrito específicamente en el Ejemplo de ensayo 1, el ARNip de una solución de ensayo, preferentemente en presencia del ácido nucleico IS que tiene diferentes números de bases de las que se midieron en el ARNip, se formó en un complejo eléctricamente neutro mediante la adición de un reactivo, por ejemplo, solución GentLE, que forma un complejo con el ácido nucleico, y donde se separa el complejo, disuelto a continuación en una solución de redisolución, y la solución resultante se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento para medir la concentración del ARNip.

45 Señalar que la medida de la concentración del ARNip en sangre no está limitada al método para medir la concentración del ARNip en sangre de la presente invención, y la concentración del ARNip en sangre puede medirse de acuerdo con un método convencional.

50 Las Figs. 1 y 2 muestran que la transición de la concentración de ARN en sangre es mayor en ratones a los cuales se administró la preparación del Ejemplo 1 que en ratones a los cuales se administró la preparación del Ejemplo comparativo 1. Específicamente, se encontró que la composición de la presente invención donde de 1 al 90 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X y la secuencia X' complementaria son ribosas sustituidas por un grupo modificador en la posición 2' tiene una retención mejorada en la sangre, efectos secundarios reducidos, o aumento de la acumulación de fármacos en tejidos u órganos que contienen el sitio de expresión del gen diana.

Ejemplo 2

55 El ARN utilizado en el Ejemplo 2 es un ARN bicatenario que contiene una secuencia que consiste en 19 bases contiguas del ARNm de un gen BCL2 (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X₃), y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X₃' complementaria) complementaria de la secuencia X₃ [sentido directo: 5'-GmAA mGUmG AmCA mUCmU UmCA mGCmA AdTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a, y 18^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 9); sentido contrario: 5'-mUUmG CmUG mAAmG AmUG mUCmA CmUU mCdTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidos por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, 11^a, 13^a, 15^a, 17^a, y 19^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 10)] (en lo sucesivo en el presente documento, 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 2). El cincuenta por ciento de todas las ribosas unidas a las bases de la secuencia X₃ y la secuencia X₃' complementaria son ribosas sustituidas con un grupo 2'-O-metilo.

La hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario se obtuvieron de Hokkaido System Science Co., Ltd., que se hibridaron para preparar el ARN bicatenario.

5 DOTAP (fabricado por Avanti Polar Lipids Inc.), PEG-DSPE (fabricado por NOF Corporation) y agua destilada (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) se mezclaron de tal manera que la relación de DOTAP/PEG-DSPE/agua destilada era de 40 mg/16 mg/1 ml, y la mezcla se removió agitando con un mezclador de tipo vórtice. La suspensión obtenida se pasó, a 70°C, a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,4 µm (fabricado por Costar) 10 veces y a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,2 µm (fabricado por Whatman) 3 veces y a continuación a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,1 µm (fabricado por Corning) 10 veces y un
10 filtro de membrana de policarbonato de 0,05 µm (fabricado por Whatman) 20 veces. La partícula principal tenía un diámetro de partículas promedio de 70,71 nm como se ha medido mediante dispersión dinámica de luz (DIS).

15 Por separado, se mezclaron EPC (NOF Corporation)/PEG-DSPE (NOF Corporation)/etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)/agua (15 mg/3,125 mg/0,625 ml/0,375 ml), y se preparó una solución que contenía los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica.

20 La dispersión de partículas principales obtenida (0,225 ml) se mezcló con una solución acuosa (0,075 ml) obtenida mezclando 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 2 en agua en una proporción de 24 mg/1 ml, a fin de preparar las partículas de complejo. La dispersión obtenida de partículas de complejo se añadió a continuación a la solución de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica (1,2 ml), y se añadieron 0,375 ml de agua destilada. Después, tras añadir 0,12 ml de una solución de EPC/PEG-DSPE (62,5 mg/62,5 mg/ml) en etanol al 40 % en volumen, se añadió gradualmente agua destilada (13,965 ml) para ajustar la concentración de etanol a 5 % o menos en volumen. La suspensión de liposomas obtenida se sometió a ultracentrifugación (80 min, 110.000 x g, 25°C), y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Co.,
25 Ltd.).

30 El liposoma tiene un diámetro de partículas promedio de 88,52 nm medido con DLS. La cuantificación de 2'-OMe BCL2siRNA Exp. 2 en el liposoma encontró que la concentración era 2,307 mg/ml, y que el porcentaje de recuperación con respecto a la cantidad cargada de 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 2 era de 87,2 %. Finalmente, se obtuvo una preparación ajustando la concentración ajustando la concentración de 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 2 a 1,5 mg/ml con adición de solución salina fisiológica (0,366 ml).

Ejemplo de referencia 3

35 El ARN utilizado en el Ejemplo 3 es un ARN bicatenario que contiene la secuencia X₃ y la secuencia X₃' complementaria [sentido directo: 5'-GmAA mGUmG AmCA mUCmU UmCA mGCmA AdTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidos por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a, y 18^a precedidas por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 11); sentido contrario: 5'-UUG CUG AAG AUG UCA CUU CdTdT-3' ' (los azúcares unidos a las bases precedidos por d son desoxirribosas)(SEC ID N°: 12)] (en lo sucesivo en el presente documento, 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 3). El
40 veinticuatro por ciento de todas las ribosas unidas a las bases de la secuencia X₃ y la secuencia X₃' complementaria son ribosas sustituidas con un grupo 2'-O-metilo. La hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario se obtuvieron de Hokkaido System Science Co., Ltd., que se hibridaron para preparar el ARN bicatenario.

45 Se obtuvo una preparación de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto que el 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 2 se sustituyó con 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 3.

El liposoma tiene un diámetro de partículas promedio de 91,42 nm medido con DLS.

50 Ejemplo comparativo 2

El ARN utilizado en el Ejemplo comparativo 2 es un ARN bicatenario que contiene la secuencia X₃ y la secuencia X₃' complementaria [sentido directo: 5'-GAA GUG ACA UCU UCA GCA AdTdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 13); sentido contrario: 5'-UUG CUG AAG AUG UCA CUU CdTdT-
55 3' ' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 14)] (en lo sucesivo en el presente documento, BCL2ARNip Com. 2). La hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario se obtuvieron de Hokkaido System Science Co., Ltd., que se hibridaron para preparar el ARN bicatenario.

60 Se obtuvo una preparación de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto que 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 2 se sustituyó con BCL2ARNip Com. 2.

El liposoma tiene un diámetro de partículas promedio de 96,52 nm medido con DLS.

Ejemplo de ensayo 2

Soluciones de fármacos (concentración de ARNip, 750 µg/ml; 200 µl) que contenían las preparaciones obtenidas en los Ejemplos 2 y 3 y el Ejemplo comparativo 2 se administraron dos veces a ratones Balb/c macho (6 semanas de edad, CLEA Japan, Inc.) a través de la vena de la cola en el intervalo de 7 días (dosis, 150 µg/ratón). Tras la segunda administración, se recogió sangre (10 µl) de la arteria de la cola en cada punto temporal tras 0,5, 3, 7, y 24 horas, y se mezcló con 90 µl de una solución desnaturalizante (4 mol/l de tiocianato de guanidina, 25 mmol/l de sodio, 1 mmol/l ditiotretol, 0,5 % en p/v *N*-lauroil sarcosina de sodio; en lo sucesivo en el presente documento, solución D). Como resultado, se obtuvo 10 % en v/v de sangre.

El 10 % en v/v de sangre (50 µl) de cada grupo a los que se administró la preparación se mezcló con 5 µl de una solución acuosa de dietilpirocarbonato (un 0,1 % en v/v de una mezcla de dietilpirocarbonato en agua ultrapura), 10 µl de solución I.S. (0,3 µmol/l de la solución acuosa de dietilpirocarbonato como I.S.), 50 µl de solución D, 10 µl de acetato de sodio 2 mmol/l (pH 4,0), y 150 µl de una solución ácida saturada de fenol/cloroformo (se usó la capa inferior de una mezcla de relación 1:1 en volumen de fenol y cloroformo saturada ácida). A continuación se centrifugó la mezcla a 132.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se mezcló el sobrenadante (65 µl) con 15 µl de una solución GentIE (vehículo de precipitación GentIE (Takara Bio Inc.) diluido 15 veces con la solución acuosa de dietilpirocarbonato), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante al menos 10 min después de la edición de etanol (200 µl). Tras 10 min de centrifugación (132.000 x g) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y se añadió al precipitado etanol al 75 % en v/v (200 µl). Tras 15 min de centrifugación (132.000 x g) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se secó al aire y se disolvió en 100 µl de una solución de redisolución (en una relación 0,1/0,4/30/1.000 en volumen de dietilpirocarbonato/trietilamina/hexafluoroisopropanol/agua). La mezcla se centrifugó a 132.000 x g durante 10 min a 4 °C, y se cuantificó el sobrenadante como muestra de análisis utilizando HPLC. Los resultados que se muestran en las Figs. 3 a 5.

Equipo

Equipo de HPLC: ACQUITY UPLC System (Waters)
Espectrómetro de masas: API4000 Q TRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex)
Programa informático de análisis: Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex)

Condiciones de HPLC

Ejemplo 2:

5'-GmUG mAAMG UmCA mACmA UmGC mCUMG CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a, y 18^a precedidas por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 15)

5'-mGCmA GmGC mAUMG UmUG mACmU UmCA mCdT-3' (el azúcar unido a la base precedida por d es desoxirribosa, y los azúcares unidos a las bases 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, 11^a, 13^a, 15^a, 17^a, y 19^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 16)

Ejemplo 3:

5'-GmUG mAAMG UmCA mACmA UmGC mCUMG CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a, y 18^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 17)

5'-GCA GGC AUG UUG ACU UCA CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidos por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 18)

Ejemplo comparativo 2:

5'-GUG AAG UCA ACA UGC CUG CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 19)

5'-GCA GGC AUG UUG ACU UCA CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 20)

Columna: Xbridge C18 (3,5 µm, 2,1 mm D.I. x 50 mm, Waters)

Prefiltro: Cartucho para precolumna Xbridge (3,5 µm, 2,1 mm D.I. x 10 mm, Waters)

Temperatura de la columna: 65°C

Fase móvil: trietilamina/hexafluoroisopropanol/agua (0,4/30/1000):metanol = 93,7 a 75,25

Cantidad de inyección: 25 µl

Detección: Espectroscopía de masas (método de ionización; ionización por electropulverización, negativa, temperatura de la fuente de iones: 500°C)

Las Figs. 3 y 5 muestran que la transición de la concentración de ARN en sangre es mayor en ratones a los cuales se administraron las preparaciones de los Ejemplos 2 y 3 que en ratones a los cuales se administró la preparación del Ejemplo comparativo 2. Específicamente, se encontró que la composición de la presente invención donde de 1 al 90 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X y la secuencia X' complementaria son ribosas sustituidas por un grupo modificador en la posición 2' tiene una retención mejorada en la sangre, efectos secundarios reducidos, o aumento de la acumulación de fármacos en tejidos u órganos que contienen el sitio de expresión del gen diana.

Ejemplo 4

El ARN utilizado en el Ejemplo 4 es un ARN bicatenario que contiene una secuencia que consiste en 23 bases contiguas del ARNm de un gen BCL2 (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X₄), y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X₄' complementaria), complementaria de la secuencia X₄. [sentido directo: 5'-GmAA mGUmG AmCA mUCmU UmCA mGCmA AmAU mAAdA dC-3' (los azúcares unidos a las bases precedidos por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a, 18th, 20th, y 22^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 21); sentido contrario: 5'-GUmU UmAU mUUmG CmUG mAAmG AmUG mUCmA CmUU mCmUmU-3' (los azúcares unidos a las bases 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, 11^a, 13^a, 15^a, 17^a, 19th, 21st, 23rd, y 25^a a 27^a bases precedidas por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metilo) (SEC ID N°: 22)] (en lo sucesivo en el presente documento, 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 4). El cincuenta por ciento de todas las ribosas unidas a las bases de la secuencia X₄ y la secuencia X₄' complementaria son ribosas sustituidas con un grupo 2'-O-metilo. La hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario se obtuvieron de Hokkaido System Science Co., Ltd., que se hibridaron para preparar el ARN bicatenario.

DOTAP (fabricado por Avanti Polar Lipids Inc.), PEG-DSPE (fabricado por NOF Corporation) y agua destilada (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) se mezclaron de tal manera que la relación de DOTAP/PEG-DSPE/agua destilada era de 40 mg/16 mg/1 ml, y la mezcla se removió agitando con un mezclador de tipo vórtice. La suspensión obtenida de esta manera se pasó, a 70°C, a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,4 µm (fabricado por Costar) 10 veces y a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,2 µm (fabricado por Whatman) 5 veces y a continuación a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,1 µm (fabricado por Corning) 10 veces y un filtro de membrana de policarbonato de 0,05 µm (fabricado por Whatman) 20 veces. La partícula principal tenía un diámetro de partículas promedio de 72,93 nm como se ha medido mediante dispersión dinámica de luz (DIS).

Por separado, se mezclaron EPC (NOF Corporation)/PEG-DSPE (NOF Corporation)/etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)/agua (15 mg/3,125 mg/0,625 ml/0,375 ml), y se preparó una solución que contenía los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica.

La dispersión de partículas principales obtenida (0,0125 ml) como anteriormente se mezcló con una solución acuosa (0,00417 ml) obtenida mezclando 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 4 en agua en una proporción de 24 mg/1 ml, a fin de preparar las partículas de complejo. La dispersión de partículas de complejo se añadió a continuación a la solución de los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica (0,06667 ml), y se añadieron 0,02083 ml de agua destilada. Tras añadir 0,00667 ml de una solución de EPC/PEG-DSPE (62,5 mg/62,5 mg/ml) en etanol al 40 % en volumen, se añadió gradualmente agua destilada (0,7758 ml) para ajustar la concentración de etanol a 5 % o menos en volumen. La suspensión de liposomas resultante se volvió isotónica con salmuera. Se obtuvo una preparación ajustando 1 ml del volumen final de líquido con solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), y ajustando de esta manera la concentración de 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 4 a 0,1 mg/ml.

El liposoma tiene un diámetro de partículas promedio de 87,50 nm medido con DLS.

Ejemplo comparativo 3

El ARN utilizado en el Ejemplo comparativo 3 es un ARN bicatenario que contiene la secuencia X₄ y la secuencia X₄' complementaria [sentido directo: 5'-GAA GUG ACA UCU UCA GCA AAU AAdA dC-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 23); sentido contrario: 5'-GUU UAU UUG CUG AAG AUG UCA CUU CUU-3' (SEC ID N°: 24)] (en lo sucesivo en el presente documento, BCL2ARNip Com. 3). La hebra de sentido directo y la hebra de sentido contrario se obtuvieron de Hokkaido System Science Co., Ltd., que se hibridaron para preparar el ARN bicatenario.

Se obtuvo una preparación de la misma manera que en el Ejemplo 4, excepto que 2'-OMe BCL2ARNip Exp. 4 se sustituyó con BCL2ARNip Com. 3.

El liposoma tiene un diámetro de partículas promedio de 94,32 nm medido con DLS.

Ejemplo de ensayo 3

Soluciones de fármacos (concentración de ARNip, 50 µg/ml; 100 µl) que contenían las preparaciones obtenidas en el Ejemplo 4 y el Ejemplo comparativo 3 se administraron dos veces a ratones Balb/c macho (6 semanas de edad, CLEA Japan, Inc.) a través de la vena de la cola en el intervalo de 7 días (dosis, 5 µg/ratón). Tras la segunda administración, se recogió sangre (10 µl) de la arteria de la cola en cada punto temporal tras 3 horas, y se mezcló con 90 µl de una solución desnaturalizante (4 mol/l de tiocianato de guanidina, 25 mmol/l de sodio, 1 mmol/l ditiotreitól, 0,5 % en p/v *N*-lauroil sarcosina de sodio; en lo sucesivo en el presente documento, solución D). Como resultado, se obtuvo 10 % en v/v de sangre.

El 10 % en v/v de sangre (100 µl) de cada grupo a los que se administró la preparación se mezcló con 10 µl de una solución acuosa de dietilpirocarbonato (un 0,1 % en v/v de una mezcla de dietilpirocarbonato en agua ultrapura), 10 µl de solución I.S. (0,3 µmol/l de la solución acuosa de dietilpirocarbonato como I.S.), 10 µl de acetato de sodio 2 mmol/l (pH 4,0), y 150 µl de una solución ácida saturada de fenol/cloroformo (se usó la capa inferior de una mezcla de relación 1:1 en volumen de fenol y cloroformo saturada ácida). A continuación se centrifugó la mezcla a 132.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se mezcló el sobrenadante (30 µl) con 10 µl de una solución GentIE (vehículo de precipitación GentIE (Takara Bio Inc.) diluido 15 veces con la solución acuosa de dietilpirocarbonato), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante al menos 10 min después de la edición de etanol (100 µl). Tras 10 min de centrifugación (132.000 x g) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y se añadió al precipitado etanol al 75 % en v/v (100 µl). Tras 15 min de centrifugación (132.000 x g) a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se secó al aire y se disolvió en 50 µl de una solución de redisolución (en una relación 0,1/0,4/30/1.000 en volumen de dietilpirocarbonato/trietilamina/hexafluoroisopropanol/agua). La mezcla se centrifugó a 132.000 x g durante 10 min a 4 °C, y se cuantificó el sobrenadante como muestra de análisis utilizando HPLC. Los resultados que se muestran en las Figs. 6 y 7.

Equipo

Equipo de HPLC: ACQUITY UPLC System (Waters)
Espectrómetro de masas: API4000 Q TRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex)
Programa informático de análisis: Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex)

Condiciones de HPLC

Sustancia patrón interna (P.I.)

Ejemplo 4:

5'-GmUG mAAmG UmCA mACmA UmGC mCUMG CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas, y los azúcares unidos a las bases 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 16^a, y 18^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metiló) (SEC ID N°: 25)

5'-mGCmA GmGC mAUmG UmUG mACmU UmCA mCdT-3' (el azúcar unido a la base precedida por d es desoxirribosa, y los azúcares unidos a las bases 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, 11^a, 13^a, 15^a, 17^a, y 19^a precedidos por m con respecto al extremo 5' son ribosas sustituidas con 2'-O-metiló) (SEC ID N°: 26)

Ejemplo comparativo 3:

5'-GUG AAG UCA ACA UGC CUG CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 27)

5'-GCA GGC AUG UUG ACU UCA CdT-3' (los azúcares unidos a las bases precedidas por d son desoxirribosas) (SEC ID N°: 28)

Columna: Xbridge C18 (3,5 µm, 2,1 mm D.I. x 50 mm, Waters)

Prefiltro: Cartucho para precolumna Xbridge (3,5 µm, 2,1 mm D.I. x 10 mm, Waters)

Temperatura de la columna: 65°C

Fase móvil: trietilamina/hexafluoroisopropanol/agua (0,4/30/1000):metanol = 93,7 a 75,25

Cantidad de inyección: 25 µl

Detección: Espectroscopía de masas (método de ionización; ionización por electropulverización, negativa, temperatura de la fuente de iones: 500°C)

Las Figs. 6 y 7 muestran que la transición de la concentración de ARN en sangre es mayor en ratones a los cuales se administró la preparación del Ejemplo 4 que en ratones a los cuales se administró la preparación del Ejemplo comparativo 3. Específicamente, se encontró que la composición de la presente invención donde de 1 al 90 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X y la secuencia X' complementaria son ribosas sustituidas por un grupo modificador en la posición 2' tiene una retención mejorada en la sangre, efectos secundarios reducidos, o aumento de la acumulación de fármacos en tejidos u órganos que contienen el sitio de expresión del gen diana.

Aplicabilidad industrial

5 Mediante la administración de la composición de la presente invención que comprende un liposoma encapsulador de un ARN que contiene una secuencia consistente de 15 a 30 bases contiguas de un ARNm de un gen diana y una secuencia de bases complementarias con la secuencia de un mamífero o similar, se puede suprimir la expresión del gen diana.

Texto libre del listado de secuencias

- 10 SEC ID N°: 1 ARNip de sentido directo del exp. 1
- SEC ID N°: 2 ARNip de sentido contrario del exp. 1
- SEC ID N°: 3 ARNip de sentido directo del com. 1
- SEC ID N°: 4 ARNip de sentido contrario del com. 1
- SEC ID N°: 5 IS de ARNip de sentido directo del exp. 1
- 15 SEC ID N°: 6 IS de ARNip de sentido contrario del exp. 1
- SEC ID N°: 7 IS de ARNip de sentido directo del com. 1
- SEC ID N°: 8 IS de ARNip de sentido contrario del com. 1
- SEC ID N°: 9 ARNip de sentido directo del exp. 2
- SEC ID N°: 10 ARNip de sentido contrario del exp. 2
- 20 SEC ID N°: 11 ARNip de sentido directo del exp. 3
- SEC ID N°: 12 ARNip de sentido contrario del exp. 3
- SEC ID N°: 13 ARNip de sentido directo del com. 2
- SEC ID N°: 14 ARNip de sentido contrario del com. 2
- SEC ID N°: 15 IS de ARNip de sentido directo del exp. 2
- 25 SEC ID N°: 16 IS de ARNip de sentido contrario del exp. 2
- SEC ID N°: 17 IS de ARNip de sentido directo del exp. 3
- SEC ID N°: 18 IS de ARNip de sentido contrario del exp. 3
- SEC ID N°: 19 IS de ARNip de sentido directo del com. 2
- SEC ID N°: 20 IS de ARNip de sentido contrario del com. 2
- 30 SEC ID N°: 21 ARNip de sentido directo del exp. 4
- SEC ID N°: 22 ARNip de sentido contrario del exp. 4
- SEC ID N°: 23 ARNip de sentido directo del com. 3
- SEC ID N°: 24 ARNip de sentido contrario del com. 3
- SEC ID N°: 25 IS de ARNip de sentido directo del exp. 4
- 35 SEC ID N°: 26 IS de ARNip de sentido contrario del exp. 4
- SEC ID N°: 27 IS de ARNip de sentido directo del com. 3
- SEC ID N°: 28 IS de ARNip de sentido contrario del com. 3
- SEC ID N°: 29 ARNm de bcl2

40 [LISTADO DE SECUENCIAS]

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.
- <120> Preparación que inhibe la expresión génica
- <130> 1000P12027
- 50 <150> JP2008-200182
- <151> 01-08-2008
- <160> 29
- 55 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> ARNip con sentido de exp. 1
- 65 <220>
- <221> misc_feature

- <222> (1)..(19)
 <223> ARN
- 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo
- 10
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> um
- 15
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> am
- 20
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> gm
- 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo
- 30
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> cm
- 35
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> am
- 40
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> am
- 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo
- 50
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> gm
- 55
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> cm
- 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo
- 65
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)

<223> gm
 <400> 1
 5 gngaagncaa cangccngct t 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> ARNip antisentido de exp. 1
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN
 20
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> gm
 25
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> am
 30
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> gm
 35
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> am
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n = uracilo
 45
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> gm
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = uracilo
 60
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> um
 65
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (13)..(13)

<223> am
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (15)..(15)
 <223> n = uracilo
 <220>
 <221> base modificada
 10 <222> (15)..(15)
 <223> um
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (16)..(16)
 <223> n = uracilo
 <220>
 <221> base modificada
 20 <222> (17)..(17)
 <223> cm
 <220>
 <221> base modificada
 25 <222> (19)..(19)
 <223> cm
 <400> 2
 30 gcaggcangn ngacnncact t 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> ARNip con sentido de com. 1
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(19)
 <223> ARN
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo
 <400> 3
 65 gngaagncaa cangccngct t 21

<210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> ARNip antisentido de com. 1
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n = uracilo
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = uracilo
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n = uracilo
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n = uracilo
 40
 <400> 4
 gcaggcangn ngacnncact t 21
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> IS para ARNip con sentido de exp. 1
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo
 60
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> um
 65
 <220>
 <221> base modificada

<222> (4)..(4)
 <223> am

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> gm

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo

15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> cm

20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> am

25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> am

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> gm

40 <220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> cm

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo

50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> gm

55 <400> 5
 gngaagncaa cangccngct 20

60 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> IS para ARNip antisentido de exp. 1

<222> (1)..(19)
 <223> ARN

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> gm

10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> am

15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> gm

20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> am

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n = uracilo

30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> gm

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = uracilo

45 <220>
 <221> base modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> um

50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> am

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n = uracilo

60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> um

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)

<223> n = uracilo
 <220>
 <221> base modificada
 5 <222> (17)..(17)
 <223> cm
 <220>
 <221> base modificada
 10 <222> (19)..(19)
 <223> cm
 <400> 6
 15 gcaggcangn ngacnncact 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> IS para ARNip con sentido de com. 1
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo
 <400> 7
 50 gngaagncaa cangccngtt 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IS para ARNip antisentido de com. 1
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN
 <220>
 65 <221> misc_feature

<222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = uracilo

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n = uracilo

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n = uracilo

25 <400> 8
 caggcangnn gacnncactt 20

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNip con sentido de exp.2

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

40 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> am

45 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> gm

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = uracilo

55 <220>
 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> gm

60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> cm

65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> um

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n = uracilo

15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> um

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> cm

30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> gm

35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> am

40 <400> 9
 gaagngacan cncagcaat t 21

45 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> ARNip antisentido de exp.2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n = uracilo

60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> um

65 <220>
 <221> misc_feature

	<222> (2)..(2) <223> n = uracilo
5	<220> <221> base modificada <222> (3)..(3) <223> gm
10	<220> <221> misc_feature <222> (5)..(5) <223> n = uracilo
15	<220> <221> base modificada <222> (5)..(5) <223> um
20	<220> <221> base modificada <222> (7)..(7) <223> am
25	<220> <221> base modificada <222> (9)..(9) <223> gm
30	<220> <221> misc_feature <222> (11)..(11) <223> n = uracilo
35	<220> <221> base modificada <222> (11)..(11) <223> um
40	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(13) <223> n = uracilo
45	<220> <221> base modificada <222> (13)..(13) <223> um
50	<220> <221> base modificada <222> (15)..(15) <223> am
55	<220> <221> misc_feature <222> (17)..(17) <223> n = uracilo
60	<220> <221> base modificada <222> (17)..(17) <223> um
65	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(18)

<223> n = uracilo
 <220>
 <221> base modificada
 5 <222> (19)..(19)
 <223> cm
 <400> 10
 10 nngcngaaga ngncacnct t 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip con sentido de exp.3
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> am
 <220>
 30 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> gm
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = uracilo
 <220>
 40 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> gm
 <220>
 45 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> cm
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo
 <220>
 55 <221> base modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> um
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n = uracilo
 <220>
 65 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)

<223> um
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo
 <220>
 <221> base modificada
 10 <222> (14)..(14)
 <223> cm
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (16)..(16)
 <223> gm
 <220>
 <221> base modificada
 20 <222> (18)..(18)
 <223> am
 <400> 11
 25 gaagngacan cncagcaat t 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> ARNip antisentido de exp.3
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n = uracilo
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = uracilo
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = uracilo
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)

<223> n = uracilo
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (18)..(18)
 <223> n = uracilo
 <400> 12
 10 nngcngaaga ngncacnct t 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> ARNip con sentido de com.2
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = uracilo
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n = uracilo
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo
 <400> 13
 45 gaagngacan cncagcaat t 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip antisentido de com.2
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n = uracilo
 <220>
 65 <221> misc_feature

<222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = uracilo

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = uracilo

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n = uracilo

30 <400> 14
 nngcngaaga ngncacnctt 21

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IS para ARNip con sentido de exp.2

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo

50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> um

55 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> am

60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> gm

65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> cm

10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> am

15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> am

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> gm

30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> cm

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo

40 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> gm

45 <400> 15
 gngaagncaa cangccngct 20

50 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> IS para ARNip antisentido de exp.2

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

65 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> gm

<222> (3)..(3)
 <223> am

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> gm

10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> am

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n = uracilo

20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> gm

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = uracilo

35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> um

40 <220>
 <221> base modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> am

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n = uracilo

50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> um

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n = uracilo

60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> cm

65 <220>
 <221> base modificada
 <222> (19)..(19)

	<223> cm	
	<400> 16	
5	gcaggcangn ngacnncact	20
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> IS para ARNip con sentido de exp.3	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(2)	
	<223> n = uracilo	
	<220>	
25	<221> base modificada	
	<222> (2)..(2)	
	<223> um	
	<220>	
30	<221> base modificada	
	<222> (4)..(4)	
	<223> am	
	<220>	
35	<221> base modificada	
	<222> (6)..(6)	
	<223> gm	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (7)..(7)	
	<223> n = uracilo	
	<220>	
45	<221> base modificada	
	<222> (8)..(8)	
	<223> cm	
	<220>	
50	<221> base modificada	
	<222> (10)..(10)	
	<223> am	
	<220>	
55	<221> base modificada	
	<222> (12)..(12)	
	<223> am	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> n = uracilo	
	<220>	
65	<221> base modificada	
	<222> (14)..(14)	

<223> gm
 <220>
 <221> base modificada
 5 <222> (16)..(16)
 <223> cm
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (18)..(18)
 <223> gm
 <400> 17
 20 gngaagncaa cangccngct 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> IS para ARNip antisentido de exp.3
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = uracilo
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n = uracilo
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n = uracilo
 <400> 18
 60 caggcangnn gacnncactt 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IS para ARNip con sentido de com.2

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo

30 <400> 19
 gngaagncaa cangccngtt 20

35 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = uracilo

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n = uracilo

65 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 561 812 T3

	<222> (15)..(15)	
	<223> n = uracilo	
5	<400> 20 caggcangnn gacnncact	20
	<210> 21	
	<211> 25	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip con sentido de exp.4	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(23)	
	<223> ARN	
20	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (2)..(2)	
	<223> am	
25	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (4)..(4)	
	<223> gm	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(5)	
	<223> n = uracilo	
35	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (6)..(6)	
	<223> gm	
40	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (8)..(8)	
	<223> cm	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(10)	
	<223> n = uracilo	
50	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (10)..(10)	
	<223> um	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (12)..(12)	
	<223> n = uracilo	
60	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (12)..(12)	
	<223> um	
65	<220>	
	<221> misc_feature	

<222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> cm

10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> gm

15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> am

20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (20)..(20)
 <223> am

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n = uracilo

30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> am

35 <400> 21
 gaanggacan cncncagcaaa naaac 25

40 <210> 22
 <211> 27
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNip antisentido de exp.4

45 <220>
 <221> base modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> um

50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> am

55 <220>
 <221> base modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> um

60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> gm

65 <220>
 <221> base modificada

<222> (11)..(11)
 <223> um

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> am

10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> gm

15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> um

20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> um

25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> am

30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (23)..(23)
 <223> um

35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (25)..(25)
 <223> cm

40 <220>
 <221> base modificada
 <222> (26)..(26)
 <223> um

45 <220>
 <221> base modificada
 <222> (27)..(27)
 <223> um

50 <400> 22
 guuuuuugc ugaagaugc acuucuu 27

55 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNip con sentido de com.3

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> ARN

65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (5)..(5)
 <223> n = uracilo

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n = uracilo

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n = uracilo

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n = uracilo

25 <400> 23
 gaangacan cncagcaaa naaac 25

<210> 24
 <211> 27
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNip antisentido de com.4

35 <400> 24
 guuuuuugc ugaagaugc acuucuu 27

<210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IS para ARNip con sentido de exp.4

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo

55 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> um

60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> am

65 <220>

<221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> gm

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo

10

<220>
 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> cm

15

<220>
 <221> base modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> am

20

<220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> am

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

30

<220>
 <221> base modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> gm

35

<220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> cm

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n = uracilo

45

<220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> gm

50

<400> 25
 gngaagncaa cangccngct 20

<210> 26
 <211> 20

55

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IS para ARNip antisentido de exp.4

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

65

<220>

	<221> base modificada <222> (1)..(1) <223> gm
5	<220> <221> base modificada <222> (3)..(3) <223> am
10	<220> <221> base modificada <222> (5)..(5) <223> gm
15	<220> <221> base modificada <222> (7)..(7) <223> am
20	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> n = uracilo
25	<220> <221> base modificada <222> (9)..(9) <223> gm
30	<220> <221> misc_feature <222> (10)..(10) <223> n = uracilo
35	<220> <221> misc_feature <222> (11)..(11) <223> n = uracilo
40	<220> <221> base modificada <222> (11)..(11) <223> um
45	<220> <221> base modificada <222> (13)..(13) <223> am
50	<220> <221> misc_feature <222> (15)..(15) <223> n = uracilo
55	<220> <221> base modificada <222> (15)..(15) <223> um
60	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(16) <223> n = uracilo
65	<220> <221> base modificada

<222> (17)..(17)
 <223> cm

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> cm

10 <400> 26
 gcaggcangn ngacnncact 20

15 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> IS para ARNip con sentido de com.3

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = uracilo

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = uracilo

45 <400> 27
 gngaagncaa cangccngtt 20

50 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> IS para ARNip antisentido de com.3

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n = uracilo

<220>

ES 2 561 812 T3

tgccctttgtg gaactgtacg gccccagcat ggggacctctg tttgatttct cctggctgtc 1140
 tctgaagact ctgctcagtt tggccctggt gggagcttgc atcaccttg gtgcctatct 1200
 gggccacaag tgaagtcaac atgcctgccc caaacaata tgcaaaaggt tcaactaaagc 1260
 agtagaaata atatgcattg tcagtgatgt accatgaaac aaagctgcag gctgtttaag 1320
 aaaaaataac acacataata acatcacaca cacagacaga cacacacaca cacaacaatt 1380
 aacagtcttc aggcaaacg tcgaatcagc tatttactgc caaagggaaa tatcatttat 1440
 tttttacatt attaagaaaa aaagatttat ttatttaaga cagtcccatc aaaactcctg 1500
 tctttggaaa tccgaccact aattgccaaag caccgcttcg tgtggctcca cctggatggt 1560
 ctgtgcctgt aaacatagat tcgctttcca tgttgttggc cggatcacca tctgaagagc 1620
 agacggatgg aaaaaggacc tgatcattgg ggaagctggc tttctggctg ctggaggctg 1680
 gggagaaggt gttcattcac ttgcatttct ttgccctggg ggctgtgata ttaacagagg 1740
 gagggttcct gtggggggaa gtccatgcct ccctggcctg aagaagagac tctttgcata 1800
 tgactcacat gatgcatacc tgggtggagg aaaagagttg ggaacttcag atggacctag 1860
 taccactga gatttccacg ccgaaggaca gcgatgggaa aaatgccctt aaatcatagg 1920
 aaagtatttt ttttaagctac caattgtgcc gagaaaagca ttttagcaat ttatacaata 1980
 tcatccagta ccttaagccc tgattgtgta tattcatata ttttggatac gcacccccca 2040
 actcccaata ctggctctgt ctgagtaaga aacagaatcc tctggaactt gaggaagtga 2100
 acatttcggt gacttccgca tcaggaaggc tagagttacc cagagcatca ggccgccaca 2160
 agtgcctgct tttaggagac cgaagtccgc agaacctgcc tgtgtcccag cttggaggcc 2220
 tggctctgga actgagccgg ggccctcact ggctctctcc agggatgatc aacagggcag 2280
 tgtggtctcc gaatgtctgg aagctgatgg agctcagaat tccactgtca agaaagagca 2340
 gtagaggggt gtggctgggc ctgtcaccct ggggccctcc aggtaggccc gttttcacgt 2400
 ggagcatggg agccacgacc cttcttaaga catgtatcac tgtagaggga aggaacagag 2460
 gccctgggcc cttcctatca gaaggacatg gtgaaggctg ggaacgtgag gagaggcaat 2520
 ggccacggcc cattttggct gtagcacatg gcacgttggc tgtgtggcct tggcccacct 2580
 gtgagtttaa agcaaggctt taaatgactt tggagagggc cacaaatcct aaaagaagca 2640
 ttgaagtgag gtgtcatgga ttaattgacc cctgtctatg gaattacatg taaaacatta 2700
 tcttgtcact gtagtttggc tttatttgaa aacctgacaa aaaaaaagtt ccagggtgtgg 2760
 aatatggggg ttatctgtac atcctggggc attaaaaaaa aaatcaatgg tggggaacta 2820
 taaagaagta acaaaaagaag tgacatcttc agcaataaaa ctaggaaatt ttttttctt 2880
 ccagtttaga atcagccttg aaacattgat ggaataactc tgtggcatta ttgcattata 2940
 taccatttat ctgtattaac tttggaatgt actctgttca atgtttaatg ctgtgggtga 3000
 tatttcgaaa gctgctttaa aaaaatacat gcattctcagc gttttttgt ttttaattgt 3060
 attagttat ggcctataca ctatttgtga gcaaagggtga tcgttttctg tttgagattt 3120

ES 2 561 812 T3

ttatctcttg attcttcaaa agcattctga gaaggtgaga taagccctga gtctcagcta 3180
 cctaagaaaa acctggatgt cactggccac tgaggagctt tgtttcaacc aagtcagtg 3240
 catttccacg tcaacagaat tgtttattgt gacagttata tctgttgctc ctttgacctt 3300
 gtttcttgaa ggtttctctg tccctgggca attccgcatt taattcatgg tattcaggat 3360
 tacatgcatg tttggttaaa cccatgagat tcattcagtt aaaaatccag atggcaaatg 3420
 accagcagat tcaaatctat ggtggtttga cctttagaga gttgctttac gtggcctggt 3480
 tcaacacaga cccacccaga gccctctgc cctcctccg cgggggcttt ctcatggctg 3540
 tccttcaggg tcttctgaa atgcagtggt gcttacgctc caccaagaaa gcaggaaacc 3600
 tgtggtatga agccagacct ccccggcggg cctcagggaa cagaatgatc agaccttga 3660
 atgattctaa tttttaagca aaatattatt ttatgaaagg tttacattgt caaagtgatg 3720
 aatatggaat atccaatcct gtgctgctat cctgcacaaa tcattttaat ggagtcagtt 3780
 tgcagtatgc tccacgtggt aagatcctcc aagctgcttt agaagtaaca atgaagaacg 3840
 tggacgtttt taatataaag cctgttttgt cttttgttgt tgttcaaacg ggattcacag 3900
 agtatttgaa aaatgtatat atattaagag gtcacggggg ctaattgctg gctggctgcc 3960
 ttttgcctg gggttttgtt acctggtttt aataacagta aatgtgcca gcctcttggc 4020
 cccagaactg tacagtattg tggctgcact tgctctaaga gtagttgatg ttgcattttc 4080
 cttattgta aaaacatgtt agaagcaatg aatgtatata aaagcctcaa ctatgcattt 4140
 ttttctctc tctttttttt tcattatata taattatttt gcagttgggc aacagagaac 4200
 catccctatt ttgtattgaa gagggattca catctgcatc ttaactgctc tttatgaatg 4260
 aaaaaacagt cctctgtatg tactcctctt tacactggcc agggtcagag ttaaataagag 4320
 tatatgcact ttccaaattg gggacaaggg ctctaaaaaa agccccaaaa ggagaagaac 4380
 atctgagaac ctctcggcc ctcccagtc ctcgctgcac aaatactccg caagagaggc 4440
 cagaatgaca gctgacaggg tctatggcca tcgggtcgtc tccgaagatt tggcaggggc 4500
 agaaaactct ggcaggctta agatttggaa taaagtcaca gaattaagga agcacctcaa 4560
 tttagttcaa acaagacgcc aacattctct ccacagctca cttacctctc tgtgttcaga 4620
 tgtggccttc catttatatg tgatctttgt tttattagta aatgcttctc atctaaagat 4680
 gtagctctgg cccagtgagg aaaattagga agtgattata aatcgagagg agttataata 4740
 atcaagatta aatgtaaata atcagggcaa tcccaacaca tgtctagctt tcacctccag 4800
 gatctattga gtgaacagaa ttgcaaatag tctctatttg taattgaact tatcctaaaa 4860
 caaatagttt ataaatgtga acttaaacctc taattaattc caactgtact ttaaggcag 4920
 tggctgtttt tagactttct tatcacttat agttagtaat gtacacctac tctatcagag 4980
 aaaaacagga aaggctcgaa atacaagcca ttctaaggaa attagggagt cagttgaaat 5040
 tctattctga tcttattctg tgggtgcttt tgcagcccag acaaatgtgg ttacacactt 5100
 ttaagaat acaattctac attgtcaagc ttatgaaggt tccaatcaga tctttattgt 5160

ES 2 561 812 T3

tattcaattt ggatctttca gggatTTTTT ttttaaatta ttatgggaca aaggacattt 5220
gttggagggg tgggagggag gaagaatttt taaatgtaaa acattcccaa gtttggatca 5280
gggagttgga agttttcaga ataaccagaa ctaagggtat gaaggacctg tattggggtc 5340
gatgtgatgc ctctgcgaag aaccttgtgt gacaaatgag aaacattttg aagtttgtgg 5400
tacgaccttt agattccaga gacatcagca tggctcaaag tgcagctccg tttggcagtg 5460
caatggtata aatttcaagc tggatatgtc taatgggtat ttaaacaata aatgtgcagt 5520
tttaactaac aggatattta atgacaacct tctggttggg agggacatct gtttctaaat 5580
gtttattatg tacaatacag aaaaaattt tataaaatta agcaatgtga aactgaattg 5640
gagagtgata atacaagtcc tttagtctta cccagtgaat cattctgttc catgtctttg 5700
gacaaccatg accttggaca atcatgaaat atgcatctca ctggatgcaa agaaaatcag 5760
atggagcatg aatggactg taccggttca tctggactgc cccagaaaaa taacttcaag 5820
caaacatcct atcaacaaca aggttgttct gcataccaag ctgagcacag aagatgggaa 5880
cactggtgga ggatggaaag gctcgtcaa tcaagaaaat tctgagacta ttaataaata 5940
agactgtagt gtagatactg agtaaatacca tgcacctaaa ctttttggaa aatctgccgt 6000
gggccctcca gatagctcat ttcattaagt tttccctcc aaggtagaat ttgcaagagt 6060
gacagtggat tgcatttctt ttgggaagc tttcttttgg tggttttggt tattatacct 6120
tcttaagttt tcaaccaagg tttgcttttg ttttgagtta ctggggttat ttttgttta 6180
aataaaaata agtgtacaat aagtgtttt gtattgaaag cttttgttat caagattttc 6240
atacttttac cttccatggc tctttttaag attgatactt ttaagagggtg gctgatattc 6300
tgcaacactg tacacataaa aaatacggta aggatacttt acatggttaa ggtaaagtaa 6360
gtctccagtt ggccaccatt agctataatg gcactttggt tgtgtttgtg gaaaaagtca 6420
cattgccatt aaactttcct tgtctgtcta gttaatattg tgaagaaaaa taaagtacag 6480
tgtgagatac tg 6492

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un liposoma con ARN encapsulado para su uso en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria donde dicha composición se va a administrar dos veces con un intervalo de 7 días, donde el ARN contiene una secuencia que consiste en de 15 a 30 bases contiguas de un ARNm de un gen diana (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X) y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X' complementaria) complementaria de la secuencia X, estando del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X y siendo la secuencia X' complementaria ribosa sustituida por un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo y/o 2'-flúor en la posición 2' y donde el ARN puede suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi), y pudiendo el liposoma alcanzar un tejido o un órgano que contiene un sitio de expresión del gen diana y que muestra una elevada retención en la sangre, y donde el gen diana es un gen de uno cualquiera de un factor de crecimiento endotelial vascular, un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento de hepatocitos, un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, un factor análogo a Krüppel, un factor de transcripción de Ets, un factor nuclear, y un factor inducible por hipoxia.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el liposoma es un liposoma que tiene un tamaño que permite su administración intravenosa.
3. La composición para su uso de acuerdo con 1 o 2, donde el liposoma con ARN encapsulado incluye:
una partícula de complejo que contiene una partícula principal y el ARN como componentes constituyentes; y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles en un disolvente orgánico polar, y donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, y la partícula del complejo se pueden dispersar en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica.
4. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde el liposoma con ARN encapsulado es un liposoma que incluye: una partícula de complejo que contiene una partícula principal que comprende una sustancia catiónica y el ARN como componentes constituyentes; y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, donde la membrana de bicapa lipídica incluye, como componentes constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua.
5. Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria donde dicho agente terapéutico se va a administrar dos veces con un intervalo de 7 días, comprendiendo el agente terapéutico un liposoma que puede alcanzar un tejido o un órgano que contiene un sitio de expresión del gen diana y que muestra una elevada retención en la sangre que incluye:
una partícula de complejo que contiene, como componentes constituyentes, una partícula principal y un ARN que contiene una secuencia que consiste de 15 a 30 bases contiguas de ARNm de un gen diana asociado con tumor o inflamación (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X₁), y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia complementaria X₁') complementaria de la secuencia X₁, estando del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la secuencia X₁ y siendo la secuencia X₁' complementaria ribosa sustituida por 2'-O-metilo, 2'-O-etilo y/o 2'-flúor en la posición 2' y donde el ARN puede suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi), donde dicho gen diana asociado con el tumor o inflamación es un gen de uno cualquiera de un factor de crecimiento endotelial vascular, un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, un factor de crecimiento de hepatocitos, un factor análogo a Krüppel, un factor de transcripción de Ets, un factor nuclear, y un factor inducible por hipoxia; y una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, donde los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica son solubles en un disolvente orgánico polar, y los componentes constituyentes de la membrana de bicapa lipídica, y la partícula del complejo se pueden dispersar en un líquido que contiene el disolvente orgánico polar en una concentración específica.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el disolvente orgánico polar es un alcohol.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el disolvente orgánico polar es etanol.
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 6 y 7 o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la partícula principal contiene una

sustancia catiónica, y donde la membrana de bicapa lipídica incluye, como componentes constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua.

5 9. Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria donde dicho agente terapéutico se va a administrar dos veces con un intervalo de 7 días, pudiendo el agente terapéutico alcanzar un tejido o un órgano que contiene un sitio de expresión del gen diana y que muestra una elevada retención en la sangre que comprende:

10 una partícula de complejo que contiene, como componentes constituyentes, una partícula principal que contiene una sustancia catiónica, y un ARN que contiene una secuencia que consiste en de 15 a 30 bases contiguas de ARNm de un gen diana asociado con tumor o inflamación (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia X1), y una secuencia de bases (en lo sucesivo en el presente documento, secuencia complementaria X₁') complementaria de la secuencia X₁, estando del 30 al 55 % de todos los azúcares unidos a las bases de la
15 secuencia X₁ y siendo la secuencia X₁' complementaria ribosa sustituida por 2'-O-metilo, 2'-O-etilo y/o 2'-flúor en la posición 2' y donde el ARN puede suprimir la expresión del gen diana utilizando la interferencia de ARN (ARNi), donde dicho gen diana asociado con el tumor o inflamación es un gen diana de uno cualquiera de un factor de crecimiento endotelial vascular, un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento de hepatocitos, un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, un factor análogo a Krüppel, un factor de transcripción de Ets, un factor nuclear, y un factor inducible por hipoxia; y
20 una membrana de bicapa lipídica para revestir la partícula de complejo, donde la membrana de bicapa lipídica incluye, como componentes constituyentes, un lípido neutro, y un derivado de lípido, un derivado de ácido graso, o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua.
25

10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 u 8 o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, donde la sustancia catiónica es uno o más compuestos seleccionados entre
30 cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-*N,N,N*-trimetilamonio, *N*-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-*N,N*-dimetilamina, cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-*N,N,N*-trimetilamonio, bromuro de *N*-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-*N,N*-dimetil-*N*-hidroxietilamonio, y 3β-[*N*-(*N',N'*-dimetilaminoetil)carbamoil]colesterol.

11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 8 y 10 o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el derivado de lípido, el derivado de ácido graso, o el derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua es polietilenglicol fosfatidil etanolamina.
35

12. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, donde el gen diana asociado con el tumor o la inflamación es un gen asociado con la angiogénesis.
40

13. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a 8, 10 y 11 o el agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, donde el ARNm es tanto ARNm humano como ARNm de ratón.

Fig. 1

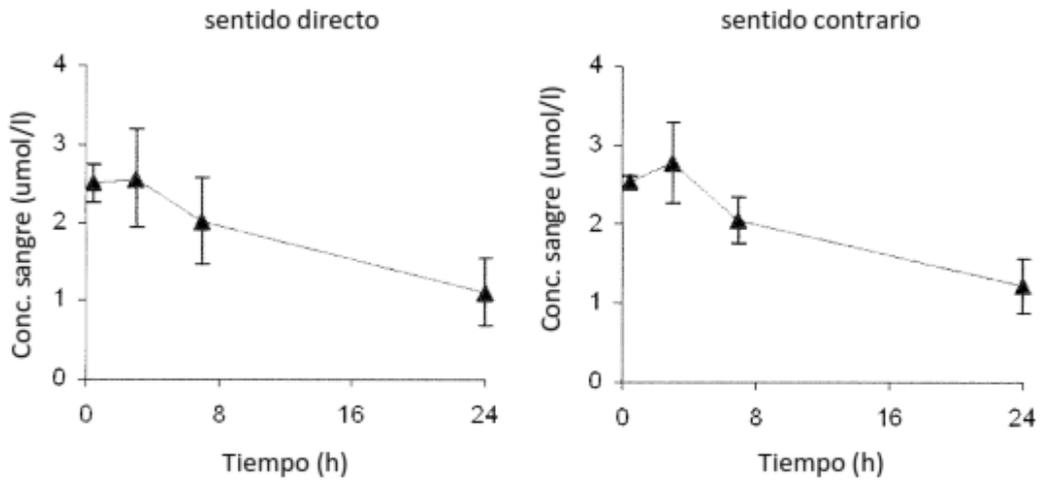


Fig. 2

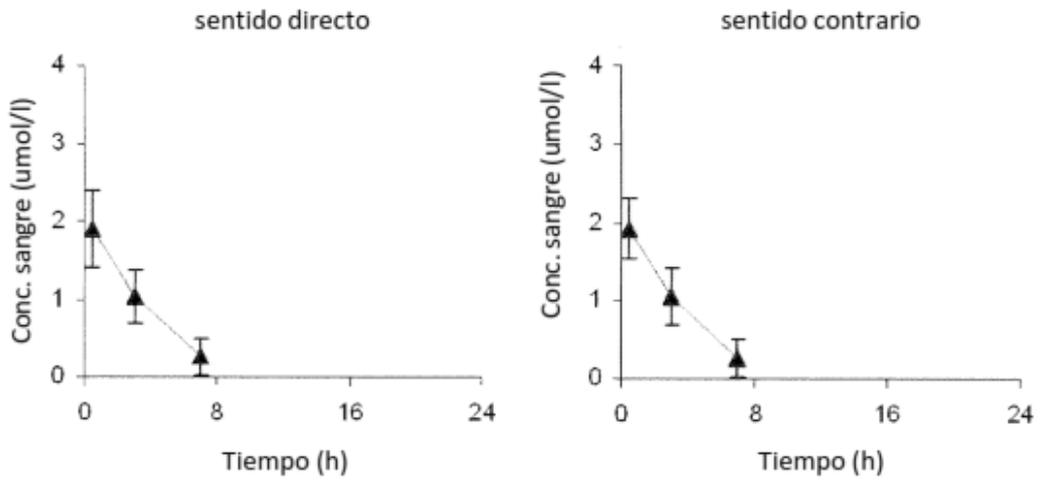


Fig. 3

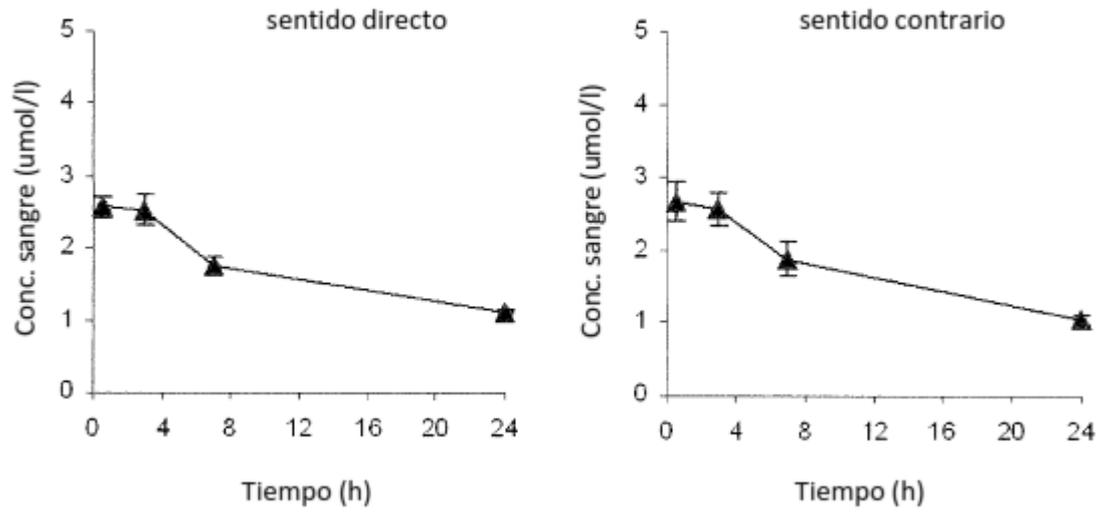


Fig. 4

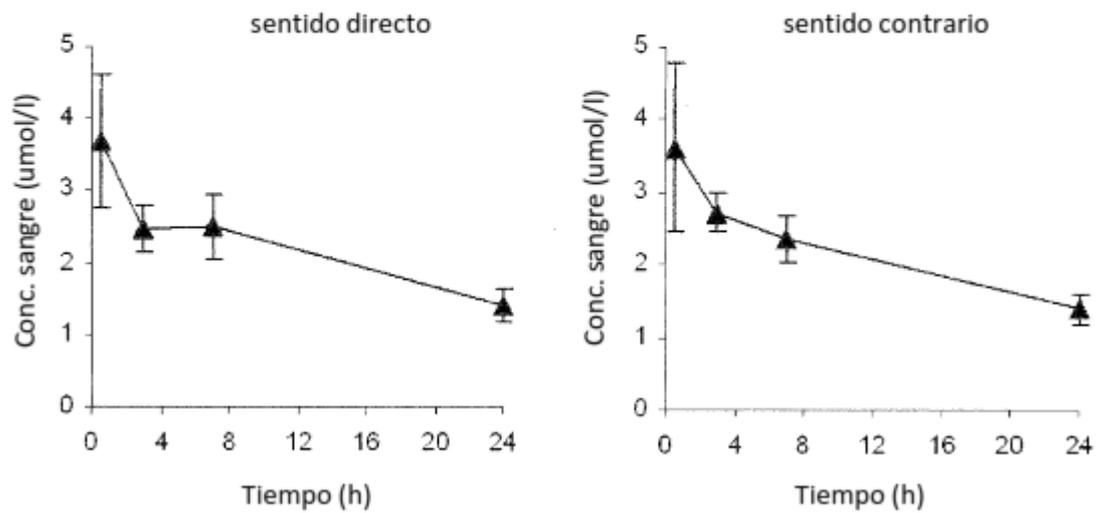


Fig. 5

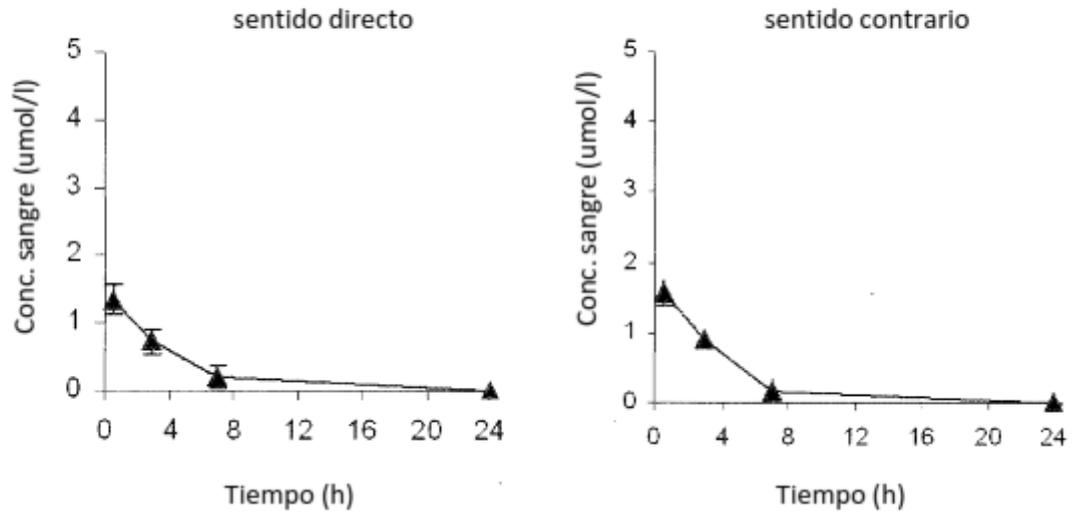


Fig. 6

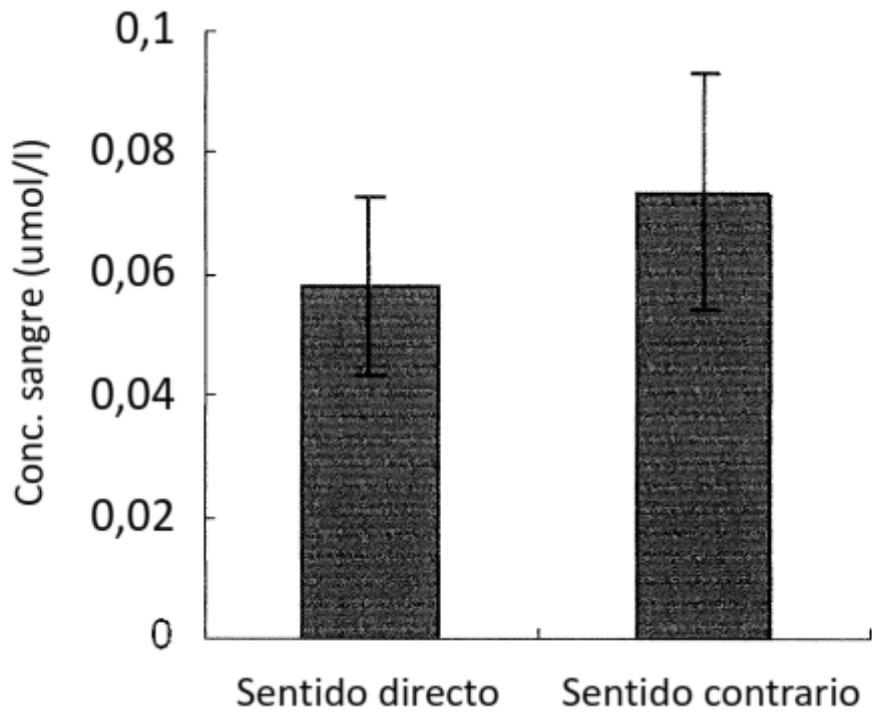


Fig. 7

