

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 403**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012 PCT/KR2012/009443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO2013070010**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12847217 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2776056**

54 Título: **Nueva composición para la administración de genes**

30 Prioridad:

10.11.2011 KR 20110117082

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

04.07.2017

73 Titular/es:

**CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP.
(100.0%)**

**8, Chungjeong-ro Seodaemun-gu
Seoul 120-756, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, YOUNG NAM;
HWANG, HO YOUNG;
NOH, SANG MYOUNG;
CHO, HEE-JEONG;
CHAE, AH-REUM;
LEE, JI HEE;
KI, MIN HYO y
LIM, JONG LAE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 621 403 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

Nueva composición para la administración de genes

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición de nanopartículas para la administración de genes usando el quitosano como un polímero catiónico.

10 Antecedentes de la técnica

Hasta la fecha, se han llevado a cabo investigaciones para la administración intracelular de genes. Además, se han hecho intentos para aplicar los resultados de la investigación al desarrollo de agentes terapéuticos disponibles en la práctica. Los genes son materiales genéticos que contienen nucleótidos y polinucleótidos, es decir, los ácidos nucleicos. Los genes tienen una fuerte carga negativa debido a la unidad de nucleótido. Los genes se degradan fácilmente por diversas enzimas que existen in vivo e in vitro y tienen una vida media corta dentro de las células o in vivo. En consecuencia, todos los agentes terapéuticos a base de genes basados en ácido nucleico deben estar acompañados con el desarrollo de agentes terapéuticos y tecnología de administración de los mismos.

20 La transfección es el proceso de introducción de un agente genético en las células eucariotas. Es la tecnología necesaria en la investigación de las ciencias básicas, incluida la citología, biología molecular, estudio de las funciones genéticas y las dianas de los fármacos, etc. Además, desempeña un papel central en el desarrollo de la medicina práctica en la investigación de las ciencias aplicadas, en particular en farmacología, desarrollo de fármacos, etc. Las técnicas para la administración de genes en las células en general se han estudiado generalmente utilizando vehículos virales y no virales.

Actualmente, se utilizan generalmente vectores de virus. La transferencia génica mediada por virus tiene una eficiencia de transferencia de genes muy elevada, pero la transferencia génica mediada por virus puede provocar una respuesta inmunitaria y por lo tanto es difícil de aplicar durante un largo período de tiempo. Además, no se puede excluir completamente la posibilidad de la replicación del virus patógeno. Por el contrario, los vehículos no víricos tienen la ventaja de la administración de los materiales genéticos sin el riesgo de vehículos virales (The AAPS Journal, 2010; 12: 492-503). Para superar el riesgo de los vehículos virales, para el método de administración no viral se usan lípidos catiónicos o polímeros que son asociables con genes aniónicos.

35 La patente US-7.361.640 divulga un complejo no covalente de gen/lípido/policación, que se forma mediante la adición de un gen a una solución que consiste en al menos un lípido catiónico y el policación. Sin embargo, las especies de lípidos catiónicos utilizadas en el complejo muestran citotoxicidad (Pharmaceutical Research 1994; 11: 1127-31).

40 Además, los lípidos catiónicos no son adecuados para la producción en masa ya que el material necesita síntesis y un alto grado de purificación y es difícil controlar su calidad. Además, es difícil la comercialización, ya que es inestable durante el almacenamiento y la distribución.

45 La Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2011/0038941 divulga un método para la preparación de nanopartículas de oligonucleótido-lípido que consisten en un oligonucleótido, un lípido y un agente de complejo, (1) mezclar un lípido, un agente complejante y un polímero catiónico en un disolvente orgánico miscible con agua, (2) disolver un oligonucleótido en un tampón acuoso, (3) inyectar la mezcla de la etapa (1) en la mezcla de la etapa (2) o mezclar la mezcla de la etapa (1) y la mezcla de la etapa (2) a presión, para formar una mezcla final y (4) eliminar el disolvente orgánico de la mezcla final para formar la nanopartícula de oligonucleótido-lípido. Este método de preparación es difícil de aplicar a la práctica industrial, ya que no garantiza la calidad, requiere instrumentos especiales y la producción en masa es difícil.

55 La Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2003/0068277 divulga un método para la preparación de la composición de complejo de un agente complejante policatiónico que comprende protamina, espermina, espermidina o quitosano y un fosfolípido, aunque el complejo está diseñado para la administración de proteínas al sistema pulmonar por inhalación.

60 En la preparación del complejo para la administración de genes, el quitosano es un material catiónico que puede ser producido a gran escala, que se encuentra abundantemente en la naturaleza y es de alta biocompatibilidad. El quitosano ha suscitado un interés considerable como candidato vehículo no viral para su uso en la administración de genes. En particular, cuando se administra al cuerpo, el quitosano se descompone por una lisozima en un aminoazúcar. Es un polímero natural que es altamente seguro para el cuerpo, ya que tiene una DL₅₀ de 16 g/kg en ratas (Trends in Food Science & Technology, 2007; 18: 117-131).

65 Aunque se considera como un potente candidato para un vehículo no viral que puede formar un complejo con un gen a través de enlaces iónicos y transferir el gen en las células, el quitosano es problemático en el sentido de su

densidad de carga positiva es baja al pH fisiológico (pH 7 ~ 7,4), lo que conduce a una mala afinidad de unión con los genes. Después de todo, el quitosano no mantiene una forma compleja con genes en la condición de pH fisiológico de manera que los genes se disocian del quitosano, dando lugar a una administración considerablemente deficiente a las células.

5 Theerasak Rojanarata et al. prepararon quitosano-pirofosfato de tiamina mediante el uso de exceso de pirofosfato de tiamina como agente ácido para disolver el quitosano, el cual es insoluble a pH fisiológico y sugirieron el pirofosfato de tiamina-quitosano como un vehículo del gen (Pharmaceutical Research 2008; 25: 2807-2814).

10 El nanocomplejo de quitosano y pirofosfato de tiamina, divulgado por Theerasak Rojanarata et al., se evaluó para la administración de genes a tasas elevadas in vitro, pero no in vivo. A diferencia de lo que sucede in vitro, in vivo existen varias proteínas del suero y exudados celulares in vivo. Por lo tanto, cuando se administra al cuerpo, las nanopartículas de quitosano se agregan con las proteínas del suero y los exudados celulares in vivo y finalmente precipitan con la pérdida concomitante de eficacia en cuanto a la administración de genes. Por esta razón, se sabe que supuestamente los complejos de quitosano convencionales presentan una eficacia deficiente en cuanto a la administración de genes in vivo y no se pueden comercializar como vehículos del gen (Expert Opinion on Drug Delivery, 2011; 8: 343-357).

[Referencia]

20 [Documento de patente]

Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2003/0212031 (13 de noviembre de 2003)
Solicitud de Patente coreana abierta a inspección pública N.º 10-2004-0058199 (3 de julio de 2004)

25 Divulgación de la invención

Problema técnico

30 La presente invención tiene como objetivo proporcionar una composición para la administración de genes, que sea altamente bioestable in vivo y presente una excelente eficiencia en la administración de genes. Un método para preparar la misma se describe en la presente memoria.

Solución al problema

35 Los inventores de la presente invención han estado investigando exhaustivamente para superar los problemas observados con la bioestabilidad in vivo, así como in vitro, una excelente administración de genes, la no toxicidad para el cuerpo y que la composición pueda ser comercializada en los productos farmacéuticos. Como resultado, sorprendentemente, una composición que comprende nanopartículas compuestas de un gen, un quitosano hidrosoluble, un pirofosfato de tiamina, una protamina y un fosfolípido neutro o aniónico son nanopartículas bioestables in vivo así como in vitro y, por lo tanto, pueden ejercer una función excelente en la administración de genes.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para la administración de genes, que comprende (i) un gen, (ii) un quitosano hidrosoluble, (iii) un pirofosfato de tiamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, (iv) una protamina o una sal de la misma farmacéuticamente aceptable y (v) un fosfolípido neutro o aniónico, en la que el gen se selecciona del grupo que consiste en ADN monocatenario o bicatenario, ARN monocatenario o bicatenario, un ADN de plásmido, un ARNip monocatenario o bicatenario, un oligonucleótido antisentido, una ribozima y un ARN catalítico o un nucleótido. También se describe un método para preparar la misma.

55 Con el fin de ser convertido en un producto comercial para la administración de genes, como se mencionó anteriormente, las nanopartículas de quitosano deben conservar al mismo tiempo una alta bioestabilidad en la sangre, así como la afinidad de unión con los genes. Si cualquiera de estas dos características no es la adecuada, la administración al cuerpo es imposible. Las nanopartículas de la presente invención carecen de los problemas de las nanopartículas de quitosano convencionales, es decir, no disminuyen la fuerza del enlace iónico con genes en la condición de pH fisiológico y se evita la agregación de proteínas del suero y los exudados celulares in vivo. De acuerdo con ello, las nanopartículas de la presente invención exhiben una alta estabilidad en la sangre. En ninguna parte de los estudios anteriores sobre la administración de genes con quitosano se mencionan estos sorprendentes efectos de las nanopartículas de la presente invención.

65 Aquí, la presente invención supera los problemas por los que el quitosano aún no ha sido comercializado como un vehículo del gen a pesar de ser un material natural, proporciona una nueva composición para la administración de genes que es superior en términos de bioestabilidad y eficacia en la administración de genes.

Constitución

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para la administración de genes, que comprende (i) un gen, (ii) un quitosano hidrosoluble, (iii) un pirofosfato de tiamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, (iv) una protamina o una sal de la misma farmacéuticamente aceptable y (v) un fosfolípido neutro o aniónico, en la que el gen se selecciona del grupo que consiste en ADN monocatenario o bicatenario, ARN monocatenario o bicatenario, un ADN de plásmido, un ARNip monocatenario o bicatenario, un oligonucleótido antisentido, una ribozima y un ARN catalítico o un nucleótido. También se describe un método para preparar la misma.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" es el material genético que contiene nucleótidos y polinucleótidos, es decir, ácidos nucleicos. Se pretende que abarque cualquier material genético que incluya un tramo de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que tiene una función o efecto de interés en el organismo cuando se introduce en las células. Los genes son al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un ADN (ácido desoxirribonucleico) monocatenario o bicatenario, un ARN monocatenario o bicatenario, un ADN de plásmido, un ARNip (ARN interferente pequeño) monocatenario o bicatenario, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un ARN enzimático y un nucleótido. Preferiblemente, el gen es al menos uno seleccionado de entre un ADN de plásmido, un ARNip monocatenario o bicatenario y un oligonucleótido antisentido. El gen puede ser un fármaco para terapia génica. En la presente memoria, con la expresión "fármaco para terapia génica" se entiende un gen que es útil para la terapia o prevención de una o más enfermedades.

El quitosano utilizado en la presente invención es un polisacárido natural catiónico que tiene (1-> 4) 2-amina-2-desoxi-β-D-glucano como unidad estructural y es muy seguro para el cuerpo. El quitosano se produce como un polímero con grupos amino libres por desacetilación de la quitina, que es el elemento estructural del exoesqueleto de los crustáceos. En la presente memoria, el quitosano varía en peso molecular de 1 a 500 kDa con un contenido de grupos amino libres de 50 % o más y preferiblemente con un peso molecular de 150 a 400 kDa con un contenido de grupos amino libres de 80 % o más, pero sin limitar la presente invención.

Con respecto a la solubilización del quitosano, en la presente invención se utiliza el quitosano hidrosoluble. El quitosano útil en la presente invención hidrosoluble puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en HCl de quitosano, acetato de quitosano, glutamato de quitosano y el lactato de quitosano. El quitosano hidrosoluble puede ser hidrosoluble cuando sus sales forman un grupo amina intramolecular con equivalentes de ácidos tales como HCl, ácido acético, ácido glutámico, ácido láctico, etc. Para su uso en inyecciones, el quitosano hidrosoluble se puede purificar eliminando del mismo las bacterias o impurezas.

Como se describe en la presente memoria, cuando la vitamina B1 se administra al cuerpo, se forma pirofosfato de tiamina. El pirofosfato de tiamina es una forma activa de la vitamina B1 que se produce in vivo y es un material estable. El pirofosfato de tiamina funciona como complemento a la unión débil entre el quitosano y el gen, ya que tiene cargas tanto negativas como positivas. El pirofosfato de tiamina en la presente invención incluye sales farmacéuticamente aceptables de pirofosfato de tiamina y el propio pirofosfato de tiamina.

Las protaminas utilizadas en la presente invención, son proteínas catiónicas naturales ricas en arginina que se encuentran abundantemente en espermatozoides de animales, en particular, en los núcleos de los espermatozoides de peces, como el salmón. Las protaminas funcionan como las histonas por asociación con y disociación de los genes. Generalmente, las protaminas extraídas de los núcleos de espermatozoides de peces tienen un peso molecular de aproximadamente 4.000 a 10.000 kDa, representando la arginina aproximadamente el 70 % de los aminoácidos constituyentes de la misma, aunque no limita la presente invención. Las protaminas de la presente invención incluyen las propias protaminas y sus sales farmacéuticamente aceptables. En detalle, las sales farmacéuticamente aceptables de las protaminas incluyen sales de adición de ácido tales como clorhidrato y sulfato.

Debido a que las propias protaminas, así como sus sales son solubles en agua, se puede usar cualquier forma de protaminas en la composición para la administración de genes de acuerdo con la presente invención.

Los fosfolípidos utilizados en la presente invención, contienen ésteres de alquilo estructurales para las colas no polares y un ácido fosfórico para la cabeza polar. Los fosfolípidos neutros y aniónicos son eléctricamente neutros y negativos en el resto de la cabeza, respectivamente. Los fosfolípidos catiónicos, aunque capaces de realizar la administración de genes, son tóxicos y por lo tanto difíciles de usar como un excipiente farmacéutico. En los fosfolípidos neutros o aniónicos útiles en la presente invención, el resto de la cola no polar puede ser un éster de alquilo saturado o insaturado de 4 a 30 átomos de carbono, mientras que el resto de la cabeza polar es un ácido fosfórico seleccionado entre fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidil-glicerina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina, fosfatidilcolina-N-metoxi polietilenglicol, fosfatidiletanolamina-N-metoxi polietilenglicol, fosfatidilserina-N-metoxi polietilenglicol, ácido fosfatídico-metoxi polietilenglicol y una mezcla de los mismos. Además, los fosfolípidos neutros o aniónicos pueden derivar de plantas tales como judías o de animales como de los huevos. Los ésteres de alquilo que representan las colas de los fosfolípidos neutros o aniónicos pueden ser ésteres de ácidos grasos saturados, tales como mono- y di-palmitoil, mono- y di-miristoil, mono- y di-lauril y mono- y di-estearil, ésteres de ácidos grasos insaturados, tales como mono- y di-linoleil, mono- y di-oleil, mono- y di-

palmitoil y mono- y di-miristoleil o una combinación de ésteres de ácidos grasos saturados e insaturados.

La composición para la administración de genes que comprende los elementos anteriores se puede preparar por el siguiente método ilustrativo, pero no limita la presente invención. Como ejemplo, la composición de la presente invención se puede preparar mediante el método siguiente; (1) mezclar un gen y una protamina en un disolvente adecuado, preferiblemente agua destilada estéril o solución salina, para formar un pre-complejo y (2) añadir quitosano, pirofosfato de tiamina y un fosfolípido neutro o aniónico al pre-complejo para formar una nanopartícula final. Como otro ejemplo, la composición de la presente invención se puede preparar mediante el método siguiente; (1) mezclar un gen, quitosano, y pirofosfato de tiamina en agua para formar un pre-complejo y (2) añadir una protamina y un fosfolípido neutro o aniónico al pre-complejo para formar una nanopartícula final. En la presente memoria, el disolvente se puede utilizar en una cantidad de aproximadamente 1 ml o menos por mg del gen. La nanopartícula puede ser de 10 ~ 500 nm de diámetro y preferiblemente de 10 ~ 300 nm de diámetro, con el fin de cumplir con el tamaño de la gota que se requiere para la introducción intracelular.

Con el fin de formar nanopartículas, la composición de la presente invención puede contener quitosano en una cantidad de 10 a 3.000 partes en peso, pirofosfato de tiamina en una cantidad de 1 a 1.000 partes en peso, una protamina en una cantidad de desde 10 a 1.000 partes en peso y un fosfolípido neutro o aniónico en una cantidad de 100 a 5.000 partes en peso basado en 100 partes en peso de un gen. Preferiblemente, el quitosano se utiliza en una cantidad de 40 a 2.000 partes en peso, el pirofosfato de tiamina en una cantidad de desde 20 a 500 partes en peso, una protamina en una cantidad de desde 10 a 700 partes en peso y un fosfolípido neutro o aniónico en una cantidad de desde 500 a 5.000 partes en peso, por 100 partes en peso de un gen.

La composición para la administración de un gen en forma de nanopartículas de acuerdo con la presente invención se puede utilizar tal cual o se puede formular junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para citar un ejemplo, la composición para la administración de genes de la presente invención puede formularse en diversas formas, tales como inyecciones, gotas, inhalantes, etc. Los vehículos farmacéuticamente aceptables y las formulaciones son conocidos por las personas que tienen experiencia ordinaria en la técnica.

Además, la composición para la administración de genes de la presente invención puede comprender además un azúcar con el fin de evitar que las nanopartículas se degraden o se deformen durante el almacenamiento o la distribución. Un ejemplo de azúcar es al menos uno seleccionado de manosa, glucosa, fructosa, arabinosa, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, maltosa, lactosa, celobiosa, isomaltosa, dextrano, dextrina, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, hidroxietil- β -ciclodextrina, dimetil- β -ciclodextrina, trimetil- β -ciclodextrina y sulfobutiléter β -ciclodextrina.

También, la composición para la administración de genes de la presente invención puede comprender además un aditivo farmacéuticamente aceptable tal como un estabilizador o un tampón, un conservante, un analgésico y un aditivo isotónico. En la presente memoria, el estabilizador incluye un antioxidante, un agente reductor y un agente quelante. El tampón tiene como objetivo ajustar el pH y contiene sales orgánicas o inorgánicas. Ejemplos del conservante incluyen éster metílico del ácido parahidroxibenzoico, éster etílico del ácido parahidroxibenzoico, éster propílico del ácido parahidroxibenzoico, éster butílico del ácido parahidroxibenzoico, clorobutanol, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, cresol, clorocresol y alcohol bencílico. El analgésico puede ser un anestésico local tal como alcohol bencílico y clorobutanol. El aditivo isotónico se utiliza para ajustar la ósmosis y puede contener azúcares y sales inorgánicas.

La composición para la administración de genes de la presente invención puede estar en una forma liofilizada bajo la protección del azúcar. Dada una forma liofilizada, la composición puede ser rehidratada en un tampón adecuado, por ejemplo, solución salina estéril, antes de su uso. Un vehículo adecuado para su uso en la reconstitución en una forma de farmacéutica para inyección intravenosa puede incluir solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), un espesante y un solubilizante, por ejemplo, glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

La composición para la administración de genes de la presente invención se puede administrar a mamíferos, incluidos los seres humanos a través de una vía adecuada, por ejemplo, por inyección, intrapulmonar, intranasal, oral, o rectal. Preferiblemente, puede inyectarse por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrauterina o intracranial. Si es necesario, la composición puede ser inyectada directamente en los tejidos, órganos y tumores de interés.

La dosis eficaz de la composición de acuerdo con la presente invención puede variar dependiendo de varios factores, incluyendo la forma farmacéutica, la vía de administración, el propósito de la administración, la edad y el peso del paciente, la gravedad de la enfermedad, etc. Generalmente, la composición para la administración de genes de acuerdo con la presente invención se puede administrar en una dosis diaria del principio activo que va desde 1 μ g hasta 200 mg/kg. La dosis puede variar con varios factores.

Debido a que todos sus componentes están libres de citotoxicidad y son inyectables, la composición es segura para el cuerpo y tiene la ventaja de permitir su comercialización en productos farmacéuticos.

Efectos ventajosos de la invención

La composición para la administración de genes de la presente invención puede introducir un gen en las células de forma segura y eficaz. Compuesta de componentes no tóxicos e inyectables, la composición es segura para el cuerpo y puede ser comercializada de forma ventajosa. En particular, la composición para la administración de genes de la presente invención puede administrar un gen con una alta eficiencia in vivo así como in vitro y es estable en la sangre.

Breve descripción de los dibujos

LA FIG. 1 muestra una composición para la administración de genes preparada en el Ejemplo 1 como se visualiza por microscopía por crioelectrón.
 LA FIG. 2 es un gráfico que muestra los diámetros de las nanopartículas en las composiciones para la administración de genes preparadas en los Ejemplos 1, 2, 3, 4, y 11.
 LA FIG. 3 es un gráfico que muestra las cargas superficiales de las nanopartículas en composiciones para la administración de genes preparadas en los Ejemplos 1, 3, y 11.
 LA FIG. 4 es un gráfico que muestra los niveles de expresión de una proteína diana como composiciones para la administración de un gen, las composiciones se preparan en los Ejemplos 1 y 11, y Ejemplos Comparativos 1, 2, y 7.
 LA FIG. 5 es un gráfico que muestra la estabilidad de las partículas preparadas en los Ejemplos 1, 3, y 11 y Ejemplos Comparativos 2, 3, 4, y 6 para la administración de genes en el suero.
 LA FIG. 6 es un gráfico que muestra los diámetros de las nanopartículas, cuando las nanopartículas se rehidratan después de la liofilización, preparadas en los Ejemplos 15, 16, y 17 para la administración de genes.
 LA FIG. 7 es un gráfico que muestra la eficacia en la administración de genes in vivo (actividad inhibitoria contra el crecimiento del tumor) de la composición preparada en el Ejemplo 1.

Modo para llevar a cabo la invención

Una mejor comprensión de la presente invención se puede obtener a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

Ejemplos

EJEMPLOS 1 A 4: Preparación de una composición para la administración de ARNip de survivina

Cuatro miligramos de HCl de quitosano 150-400 kDa (FMC CL214, FMC), 2 mg de pirofosfato de tiamina (Sigma Aldrich) y 0,5 mg de sulfato de protamina (Alps Pharmaceutical) se disolvieron independientemente en 1 ml de agua destilada estéril. Cada solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. El ARNip de survivina (Bioneer) se disolvió a una concentración final de 1 mg/ml en agua destilada estéril. Lipoid S-100 (Lipoid) como fosfolípido y diestearoil-glicero-fosfoetanolamina-metil-polietilenglicol-2000 (DSPE-mPEG2000) (Lipoid PE 18:0/18:0-PEG 2000, Lipoid) se disolvieron en las relaciones dadas en la Tabla 1 en 1 ml de etanol, siendo el peso de fosfolípido total 30 mg, seguido por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. La solución de ARNip de survivina se mezcló en las proporciones dadas en la Tabla 1 con la solución de protamina para formar pre-complejos y después se mezcló con la solución de quitosano hidrosoluble, la solución de pirofosfato de tiamina y la solución de fosfolípido para preparar composiciones que contienen nanopartículas. En la presente memoria se utilizó la secuencia de ARNip de survivina compuesta de la secuencia sentido: 5'-AAG GAG AUC AAC AUU UUC A(dTdT)-3' (SEQ ID NO:1) y antisentido: 5'-UGA AAA UGU UGA UCU CCU U(dTdT)-3' (SEQ ID NO:2).

En la Tabla 1, la unidad es el peso (µg).

[TABLA 1]

	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4
ARNip de survivina	1	1	1	1
HCl de quitosano	17,1	17,1	8,6	8,6
Pirofosfato de tiamina	2,9	2,9	2,9	2,9
Protamina	0,6	0,6	5	5
Lipoid S-100 ¹⁾	32	30,4	32	30,4
DSPE-mPEG2000	0	1,6	0	1,6

1) Lipoid S-100 está compuesto de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilcolina, ascendiendo el contenido de fosfatidilcolina a más de 94 %.

EJEMPLOS 5 A 8: Preparación de una composición para la administración de ARNip de VEGF.

Cuatro miligramos de HCl de quitosano 150~400 kDa, 2 mg de pirofosfato de tiamina y 0,5 mg de sulfato de protamina (Alps Pharmaceutical) se disolvieron independientemente en 1 ml de agua destilada estéril. Cada solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. El ARNip de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bioneer) se disolvió a una concentración final de 1 mg/ml en agua destilada estéril. Lipoid S-100 como fosfolípido y DSPE-mPEG2000 se disolvieron en las relaciones dadas en la Tabla 2 en 1 ml de etanol, siendo el peso de fosfolípido total 30 mg, seguido por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. La solución de ARNip de VEGF se mezcló en las proporciones dadas en la Tabla 2 con la solución de quitosano hidrosoluble y la solución de pirofosfato de tiamina para formar pre-complejos y después se mezcló con la solución de protamina y la solución de fosfolípido para preparar composiciones que contienen nanopartículas. En la presente memoria la secuencia de ARNip de VEG utilizada fue 5'-GGA GUA CCC UGA UGA GAU C(dTdT)-3' (SEQ ID NO: 3).

En la Tabla 2, la unidad es el peso (µg).

[TABLA 2]

	Ej. 5	Ej. 6	Ej. 7	Ej. 8
ARNip de VEGF	1	1	1	1
HCl de quitosano	17,1	17,1	8,6	8,6
Pirofosfato de tiamina	2,9	2,9	2,9	2,9
Protamina	0,6	0,6	5	5
Lipoid S-1001	32	30,4	32	30,4
DSPE-mPEG2000	0	1,6	0	1,6

EJEMPLOS 9 A 14: Preparación de una composición para la administración de gataparsen

Cuatro miligramos de HCl de quitosano 150~400 kDa, 2 mg de pirofosfato de tiamina y 0,5 mg de sulfato de protamina (Alps Pharmaceutical) se disolvieron independientemente en 1 ml de agua destilada estéril. Cada solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Se disolvió gataparsen (ARN antisentido contra survivina, Bioneer) a una concentración final de 1 mg/ml en agua destilada estéril. Lipoid S-100 y DSPE-mPEG2000 se disolvieron en las relaciones dadas en la Tabla 3 en 1 ml de etanol, siendo el peso de fosfolípido total 30 mg, seguido por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. La solución de gataparsen (ARN antisentido contra survivina) se mezcló en las proporciones dadas en la Tabla 1 con la solución de protamina para formar pre-complejos y después se mezcló con la solución de quitosano hidrosoluble, la solución de pirofosfato de tiamina y la solución de fosfolípido para preparar una composición que contiene nanopartículas. En la presente memoria, gataparsen tiene la secuencia de 3'-d(P-tio)([2'-O-(2-metoxietil)]m5rU-[2'-O-(2-metoxietil)]rG-[2'-O-(2-metoxietil)]m5rU-[2'-O-(2-metoxietil)]rG-m5C-T-A-T-T-m5C-T-G-T-G-[2'-O-(2-metoxietil)]rA-[2'-O-(2-metoxietil)]rA-[2'-O-(2-metoxietil)]m5rU-[2'-O-(2-metoxietil)]m5rU)-5' (SEQ ID NO:4).

En la Tabla 3, la unidad es el peso (µg).

[TABLA 3]

	Ej. 9	Ej. 10	Ej. 11	Ej. 12	Ej. 13	Ej. 14
Gataparsen	1	1	1	1	1	1
HCl de quitosano	17,1	17,1	1,7	1,7	0,43	0,43
Pirofosfato de tiamina	2,9	2,9	0,3	0,3	0,07	0,07
Protamina	0,6	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2
Lipoid S-100	32	30,4	12	11,4	6	5,7
DSPE-mPEG2000	0	1,6	0	0,6	0	0,3

EJEMPLOS 15 A 17: Preparación de una composición liofilizada para la administración de ARNip de survivina

Cuatro miligramos de HCl de quitosano 150-400 kDa, 2 mg de pirofosfato de tiamina y 0,5 mg de sulfato de protamina (Alps Pharmaceutical) se disolvieron independientemente en 1 ml de agua destilada estéril. Cada solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. El ARNip de survivina se disolvió a una concentración final de 1 mg/ml en agua destilada estéril. Lipoid S-100, 30 mg, se disolvió en 1 ml de etanol, seguido por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. La solución de ARNip de survivina se mezcló en las proporciones dadas en la Tabla 4 con la solución de protamina para formar pre-complejos y después se mezcló con la solución de quitosano hidrosoluble, la solución de pirofosfato de tiamina y la solución de fosfolípido para preparar composiciones que contienen nanopartículas. En la presente memoria, el ARNip de survivina tenía la misma secuencia que en los Ejemplos 1 a 4. A las composiciones se añadió una solución al 30 % de un excipiente de azúcar (trehalosa (Trehalose SG, Hayashibara), glucosa) en agua destilada estéril en las proporciones dadas en la Tabla 4. Las soluciones se liofilizaron a -70 °C para formar fases sólidas.

En la Tabla 4, la unidad es el peso (μg).

[TABLA 4]

	Ej. 15	Ej. 16	Ej. 17
ARNip de survivina	1	1	1
HCl de quitosano	17,1	17,1	17,1
Pirofosfato de tiamina	2,9	2,9	2,9
Protamina	0,6	0,6	0,6
Lipoid S-100	32	32	32
Trehalosa	600	300	300
Glucosa	0	150	300

5 EJEMPLOS COMPARATIVOS

EJEMPLO COMPARATIVO 1: Preparación de una composición que consiste en un gen, protamina, pirofosfato de tiamina y fosfolípido

10 Se preparó una composición que contenía nanopartículas de la misma manera que en el Ejemplo 1, con la excepción de que no se usó HCl de quitosano. Las cantidades de los componentes se dan en la Tabla 5 siguiente (unidad: μg). Esta composición se utilizó como control para la comparación con la composición de la presente invención (Ejemplo 1).

15

[TABLA 5]

	Ej. C. 1
ARNip de survivina	1
Pirofosfato de tiamina	2,9
Protamina	0,6
Lipoid S-100	32

EJEMPLO COMPARATIVO 2: Preparación de una composición que consiste en un gen, quitosano hidrosoluble, protamina y fosfolípido

20 Se preparó una composición que contenía nanopartículas de la misma manera que en el Ejemplo 1, con la excepción de que no se usó pirofosfato de tiamina. Las cantidades de los componentes se dan en la Tabla 6 siguiente (unidad: μg). Esta composición se utilizó como control para la comparación con la composición de la presente invención (Ejemplo 1).

25

[TABLA 6]

	Ej. C. 2
ARNip de survivina	1
HCl de quitosano	17,1
Protamina	0,6
Lipoid S-100	32

EJEMPLO COMPARATIVO 3: Preparación de una composición que consiste en un gen, quitosano hidrosoluble, pirofosfato de tiamina y fosfolípido

30 Se preparó una composición que contenía nanopartículas de la misma manera que en el Ejemplo 1, con la excepción de que no se usó protamina. Las cantidades de los componentes se dan en la Tabla 7 siguiente (unidad: μg). Esta composición se utilizó como control para la comparación con la composición de la presente invención (Ejemplo 1).

35

[TABLA 7]

	Ej. C. 3
ARNip de survivina	1
HCl de quitosano	17,1
Pirofosfato de tiamina	2,9
Lipoid S-100	32

EJEMPLO COMPARATIVO 4: Preparación de una composición que consiste en un gen, quitosano hidrosoluble, pirofosfato de tiamina y protamina

5 Se preparó una composición que contenía nanopartículas de la misma manera que en el Ejemplo 1, con la excepción de que no se usó fosfolípido. Las cantidades de los componentes se dan en la Tabla 8 siguiente (unidad: µg). Esta composición se utilizó como control para la comparación con la composición de la presente invención (Ejemplo 1).

[TABLA 8]

	Ej. C. 4
ARNip de survivina	1
HCl de quitosano	17,1
Pirofosfato de tiamina	2,9
Protamina	0,6

10 EJEMPLO COMPARATIVO 5: Preparación de una composición que consiste en un gen, quitosano hidrosoluble, pirofosfato de tiamina, protamina y fosfolípido

15 Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 para preparar una composición que contenía nanopartículas, con la excepción de que se utilizó un oligómero de ARNbc marcado con fluoresceína (ARNbc FL, Invitrogen), en lugar de ARNip de survivina con el fin de examinar la actividad inhibitoria contra el crecimiento tumoral. Las cantidades de los componentes se dan en la Tabla 9 siguiente (unidad: µg). En la presente memoria, el ARNbc FL tenía la secuencia de 5'-UUG UUU UGG AGC ACG GAA A (dTdT) -3 '(SEQ ID NO: 5).

[TABLA 9]

	Ej. C. 5
ARNbc FL	1
HCl de quitosano	17,1
Pirofosfato de tiamina	2,9
Protamina	0,6
Lipoid S-100	32

20 EJEMPLO COMPARATIVO 6: Preparación de una composición que consiste en un gen, quitosano hidrosoluble y pirofosfato de tiamina

25 Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 para preparar una composición que contiene nanopartículas, con la excepción de que no se utilizaron protamina y fosfolípido. Las cantidades de los componentes se dan en la Tabla 10 siguiente (unidad: µg). La composición se utilizó como control para la comparación con la composición de la invención (Ejemplo 1).

[TABLA 10]

	Ej. C. 6
ARNip de survivina	1
HCl de quitosano	17,1
Pirofosfato de tiamina	2,9

30 EJEMPLO COMPARATIVO 7: Preparación de una composición que consiste en un gen, quitosano hidrosoluble y fosfolípido

35 Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 para preparar una composición que contiene nanopartículas, con la excepción de que no se utilizaron pirofosfato de tiamina ni protamina. Las cantidades de los componentes se dan en la Tabla 11 siguiente (unidad: µg). La composición se utilizó como control para la comparación con la composición de la invención (Ejemplo 1).

[TABLA 11]

	Ej. C. 7
ARNip de survivina	1
HCl de quitosano	17,1
Lipoid S-100	32

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

EJEMPLO EXPERIMENTAL 1: Confirmación de la formación de nanopartículas en la composición para la administración de genes

Las nanopartículas formadas en la composición preparada en el Ejemplo 1 se observaron por microscopía con crioelectrón (microscopio electrónico Tecnai 12, Philips, Holanda). La composición del Ejemplo 1 se cargó en forma de una membrana delgada en una cuadrícula y se congeló a $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se observó la composición congelada en cuadrícula bajo un microscopio electrónico de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Fig. 1).

Como se puede ver en la FIG. 1, se observaron nanopartículas esféricas para ser formadas en la composición para la administración de genes que comprende un gen, un quitosano hidrosoluble, un pirofosfato de tiamina, una protamina y un fosfolípido de acuerdo con la presente invención.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 2: Medición del diámetro de las nanopartículas formadas en la composición para la administración de genes

El diámetro de las nanopartículas formadas en las composiciones preparadas en los Ejemplos 1 a 4 y 11 se mide mediante un analizador del tamaño de las partículas (espectrofotómetro de dispersión de la luz electroforética) (Otsuka, Japón) y el potenciómetro ELS-Z. El diámetro de las partículas de las composiciones preparadas en los Ejemplos 1 a 4 y 11 se midió utilizando una célula de tamaño de las partículas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FIG. 2).

Como se puede ver en la FIG. 2, todas las composiciones para la administración de genes que comprenden un gen, un quitosano hidrosoluble, un pirofosfato de tiamina, una protamina y un fosfolípido (Ejemplos 1-4) contenían nanopartículas que variaban en tamaño de las partículas de 200 a 300 nm con una la distribución de partículas constante. Este resultado indicó que las partículas son lo suficientemente pequeñas de tamaño como para penetrar en las células y, por lo tanto, son adecuadas para su uso en la administración de genes.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 3: Medición de la carga superficial de las nanopartículas en la composición para la administración de genes

Las composiciones preparadas en los Ejemplos 1, 3 y 11 se examinaron para determinar la carga superficial mediante un analizador del tamaño de las partículas ELS (espectrofotómetro de dispersión de la luz electroforética) y un potenciómetro (ELS-Z, Otsuka, Japón). Las cargas superficiales de la composición preparada en los Ejemplos 1, 3 y 11 se midieron usando una celda de potencial zeta de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FIG. 3).

Como se puede ver en la FIG. 3, se encontró que las nanopartículas en las composiciones para la administración de genes que comprenden un gen, un quitosano hidrosoluble, un pirofosfato de tiamina y un fosfolípido de la presente invención tienen una carga superficial positiva de 15 mV. Este resultado indica que la composición de la presente invención forma complejos iónicos con cargas superficiales positivas, lo que permite que los complejos iónicos penetren en las células y por lo tanto la administración de un gen a las células.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 4: Confirmación del ensayo in vitro de la actividad inhibidora de la composición frente a la expresión de la proteína diana

Se realizó un examen de la actividad inhibidora de las composiciones de los Ejemplos 1 y 11, Ejemplos Comparativos 1, 2 y 7 y el propio gen frente a la expresión del gen diana usando un kit de ELISA survivin (R & D Systems, N.º de catálogo SVE00) como sigue.

Se sembró una línea celular de cáncer de próstata humano (PC-3, ATCC) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 48 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un medio suplementado con FBS (suero bovino fetal) 10 % en una atmósfera de CO_2 al 5 %. Se estabilizaron las células en un medio fresco (pH 7,2) suplementado con FBS 10 % durante 2 horas antes de la aplicación del agente genético. A continuación, las células se incubaron durante 48 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con las composiciones de los Ejemplos 1 y 11, Ejemplos Comparativos 1, 2 y 7 y el gen individual, respectivamente, en unas condiciones de CO_2 5 %. En este momento, el medicamento de terapia génica se utilizó a una dosis de 2 μg /pocillo. Cuando se completó la incubación, el medio se retiró y las células de cada pocillo se lisaron con 500 μl de un tampón de lisis celular (Cell Signaling Technology). Después de la centrifugación de los lisados celulares a 12.000 rpm durante 20 min, se ensayó con 100 μl del sobrenadante separado de los restos celulares el nivel de expresión de survivina usando un kit ELISA de survivina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FIG. 4).

Como se puede ver en la FIG. 4, la composición para la administración de genes que comprende un gen, un quitosano hidrosoluble, un pirofosfato de tiamina, una protamina, y un fosfolípido de acuerdo con la presente invención (Ejemplos 1 y 11) suprimió significativamente la expresión de la proteína diana. Esto indica que la composición de la presente invención puede administrar un gen con una alta eficacia. Por el contrario, se vio que el

gen solo y la composición del Ejemplo Comparativo 1, que no contenía quitosano, no suprimía en absoluto la expresión de la proteína diana. Es decir, el quitosano juega un papel crítico en la administración de los genes y, por lo tanto, la composición de la presente invención no puede llevar a cabo en absoluto la administración de genes sin quitosano.

5 La composición del Ejemplo Comparativo 2, que carecía de pirofosfato de tiamina, permitió a la proteína diana expresarse a un nivel 60 % mayor que el control, lo que indica que la ausencia de pirofosfato de tiamina debilita la afinidad de unión entre el gen y el quitosano a pH fisiológico (pH 7-7,4), disminuyendo significativamente la eficacia en la administración de genes. Además, la composición del Ejemplo Comparativo 7, que carecía de pirofosfato de tiamina y protamina, expresaba la proteína diana a un nivel de 68 % y, por lo tanto, era significativamente inferior a la composición de la presente invención en términos de la administración de genes.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 5: Ensayo de estabilidad en suero de las partículas de la composición para la administración de genes

15 Cada una de las composiciones de los Ejemplos 1, 3 y 11 y los Ejemplos Comparativos 2, 3, 4, y 6 se mezclaron con un volumen igual de suero (Invitrogen). Después de la incubación durante 3 horas, los tamaños de las partículas se midieron mediante un analizador del tamaño de las partículas ELS (espectrofotómetro de dispersión de la luz electroforética) y un potenciómetro (ELS-Z, Otsuka, Japón). En este sentido, las celdas para la medición del tamaño de las partículas se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FIG. 5).

Como se puede ver en la FIG. 5, las nanopartículas de la composición de la presente invención (Ejemplos 1, 3, y 11) mantenían el mismo tamaño original de 200 a 300 nm, incluso en un suero como en agua destilada.

25 Por el contrario, como las partículas de la composición del Ejemplo Comparativo 3, que no contiene protamina, cuyo tamaño era de 1.500 nm o más, se observaron que se agregaban de forma significativa con las proteínas de suero y no se mantenían de forma estable. Además, se observó que las partículas del Ejemplo Comparativo 4, que no contenía fosfolípido, se agregaban aún más con las proteínas del suero y disminuía su estabilidad, ya que su tamaño era de 4.000 nm o más. Además, también se observó una fuerte agregación con las proteínas del suero y una disminución de la estabilidad de las partículas en la sangre con las partículas del Ejemplo Comparativo 6, que no contenían protamina ni fosfolípidos y cuyo tamaño era de 3.000 nm o más. Estos datos sugieren que todos los componentes de la composición de la presente invención son necesarios para prevenir la agregación con las proteínas del suero, así como para garantizar la estabilidad en el suero de la nanopartícula basada en quitosano.

35 Un tamaño de las partículas de 1.000 nm o más demostró que las partículas del Ejemplo Comparativo 2, que no contenían pirofosfato de tiamina, también eran inestables en la sangre. En este contexto, la falta de pirofosfato de tiamina, a pesar de contener un gen, un quitosano hidrosoluble, una protamina y un fosfolípido, hacía que los complejos se disociasen fácilmente, haciéndolos inestable.

40 En consecuencia, con el fin de aplicar el quitosano como un vehículo del gen para la aplicación *in vivo*, es necesaria la estabilidad de las partículas en el suero. Para este fin, todos los componentes de la composición de la presente invención son necesarios.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 6: Liofilización de la composición para la administración de genes y medición del tamaño de las partículas

45 Las composiciones liofilizadas para la administración de genes, preparadas en los Ejemplos 15, 16 y 17, se resuspendieron en agua purificada para formar una concentración de gen de 100 µg/ml y los tamaños de las partículas se midieron mediante un analizador del tamaño de las partículas ELS (espectrofotómetro de dispersión de la luz electroforética) y un potenciómetro (ELS-Z, Otsuka, Japón). En este sentido, las celdas para la medición del tamaño de las partículas se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FIG. 6).

50 Como se puede ver en la FIG. 6, las nanopartículas en las composiciones de los Ejemplos 15 a 17 mantenían un tamaño de las partículas de aproximadamente 300 nm a pesar de que se rehidrataban después de la liofilización. Es decir, las nanopartículas se pueden almacenar de forma estable en una forma liofilizada en presencia de azúcar durante la distribución y almacenamiento. También, se pueden aplicar *in vivo* simplemente resuspendiendo en agua.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 7: Ensayo *in vivo* de la actividad inhibidora del crecimiento tumoral de la composición

60 Para su uso en la evaluación de la eficacia en cuanto a la administración de genes *in vivo* de las composiciones del Ejemplo 1 y Ejemplos Comparativos 5 y 7, se construyeron modelos de ratones inmunodeficientes implantados con células de cáncer de próstata. En este contexto, se suspendió una línea celular de cáncer de próstata a una densidad de 2×10^6 células en 50 µl de RPMI y se mezcló con 50 µl de Matrigel (BD Biosciences) antes de la inyección subcutánea en ratones macho inmunodeficientes de 5 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer hasta un volumen de 100 mm³, después de lo cual se inyectaron las composiciones de los Ejemplos 1 y Ejemplos Comparativos 5 y 7 en una dosis de genes de 100 µg/ml en la vena de la cola de tres grupos de 8 ratones. A un

grupo control no se administró ninguna composición (no tratado). Cada uno de los medicamentos de terapia génica se inyectó a una dosis única de 40 µg seis veces en dos semanas. Los volúmenes tumorales se calcularon según la siguiente fórmula una vez medidos el eje largo y corto con calibradores (Biomaterials, 2011; 32: 9786-9795).

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = (\text{eje corto}^2 \times \text{eje largo}) / 2$$

5 Los resultados se muestran en la FIG. 7. Como se entiende a partir de los datos de la FIG. 7, se encontró que la composición para la administración de genes del Ejemplo 1 suprimía significativamente el crecimiento del tumor in vivo. En particular, se encontró que el grupo de ratones inmunodeficientes trasplantados con cáncer de próstata y a los que se les inyectó por vía intravenosa la composición del Ejemplo 1, mostraban una reducción en el volumen del tumor de aproximadamente un 77 % el día 14 y aproximadamente un 74 % el día 18, en comparación con el grupo no tratado. Por el contrario, el crecimiento del tumor no era suprimido, sino que seguía progresando en el grupo no tratado y en el grupo tratado con la composición del Ejemplo 5, que carecía de actividad supresora del tumor. La composición del Ejemplo Comparativo 7, que carecía de pirofosfato de tiamina y protamina, mostraba un efecto similar al de la composición del Ejemplo 1 durante una semana desde el primer día de la inyección, aunque el crecimiento del tumor se suprimía en apenas un 32 % en el día 18, lo que indica que la composición del Ejemplo Comparativo 7 es significativamente inferior en cuanto a la eficacia en la administración de genes respecto a la composición de la presente invención.

20 Además, los resultados mostraban que la composición de la presente invención podría tener una excelente eficacia en la administración de genes in vivo, incluso cuando se inyecta por vía intravenosa.

25 Los complejos basados en quitosano convencionales tienen la desventaja de tener una mala afinidad de unión con los genes y de ser inestables en la sangre y, por lo tanto, en la práctica no se pueden aplicar a los fármacos. Los presentes inventores concibieron una composición para la administración de genes que puede superar todos los problemas encontrados en la técnica anterior. Con el presente experimento, se demuestra que la composición de la presente invención tiene una excelente eficacia en la administración de genes, incluso cuando se administra sistémicamente in vivo.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> CHONG KUN DANG FARMACEUTICAL CORP.
 <120> NUEVA COMPOSICIÓN PARA LA ADMINISTRACIÓN DE GENES
 35 <130> P104816EP
 <140> 12847217.2
 <141> 09-11-2012
 40 <150> KR 2011-0117082
 <151> 10-11-2011
 <160> 5
 45 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sentido de ARNip de survivina
 <220>
 55 <221> base modificada
 <222> (20)..(21)
 <223> t es desoxi t (dT)
 <400> 1
 60 aaggagauca acauuucatt 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 621 403 T3

<220>
 <223> Secuencia antisentido de ARNip de survivina

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (20)..(21)
 <223> t es desoxi t (dT)

10 <400> 2
 ugaaaauguu gaucuccuut t 21

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de ARNip de VEGF

20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (20)..(21)
 <223> t es desoxi t (dT)

25 <400> 3
 ggaguaccu gaugagauctt 21

<210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de Gataparsen

35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> u es desoxi(fosforotioato) [2'-O-(2-metoxietil)]5-metil-ribonucleo-uridina (= d(P-tio)[2'-O-(2-
 40 metoxietil)]m5rU)

<220>
 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> g es [2'-O-(2-metoxietil)]ribonucleo-guanina (= [2'-O-(2-metoxietil)]rG)

45 <220>
 <221> base modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> u es [2'-O-(2-metoxietil)]5-metil-ribonucleo-uridina (= [2'-O-(2-metoxietil)]m5rU)

50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> g es [2'-O-(2-metoxietil)]ribonucleo-guanina (= [2'-O-(2-metoxietil)]rG)

55 <220>
 <221> base modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> c es 5-metilcitidina (= m5C)

60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> c es 5-metilcitidina (= m5C)

65

ES 2 621 403 T3

5
<220>
<221> base modificada
<222> (15)..(15)
<223> a es [2'-O-(2-metoxietil)]ribonucleo-adenina (= [2'-O-(2-metoxietil)]rA)

10
<220>
<221> base modificada
<222> (16)..(16)
<223> a es [2'-O-(2-metoxietil)]ribonucleo-adenina (= [2'-O-(2-metoxietil)]rA)

15
<220>
<221> base modificada
<222> (17)..(17)
<223> u es [2'-O-(2-metoxietil)]5-metil-ribonucleo-uridina (= [2'-O-(2-metoxietil)]m5rU)

20
<220>
<221> base modificada
<222> (18)..(18)
<223> u es [2'-O-(2-metoxietil)]5-metil-ribonucleo-uridina (= [2'-O-(2-metoxietil)]m5rU)

25
<400> 4
ugugctattc tgtgaau 18

30
<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35
<220>
<223> Secuencia de ARNbc marcada con fluoresceína

<220>
<221> base modificada
<222> (20)..(21)
<223> t es desoxi t (dT)

<400> 5
uuguuuugga gcacggaaat t 21

REIVINDICACIONES

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

- 5 (i) un gen;
(ii) un quitosano hidrosoluble;
(iii) un pirofosfato de tiamina o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable;
(iv) una protamina o una sal de la misma farmacéuticamente aceptable y
10 (v) un fosfolípido neutro o aniónico,

en la que el gen se selecciona del grupo que consiste en un ADN monocatenario o bicatenario, un ARN monocatenario o bicatenario, un ADN de plásmido, un ARN_ip monocatenario o bicatenario, un oligonucleótido antisentido, una ribozima y un ARN catalítico o un nucleótido.

15 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el quitosano hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en HCl de quitosano, acetato de quitosano, glutamato de quitosano o lactato de quitosano.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la sal farmacéuticamente aceptable de protamina es clorhidrato de protamina o sulfato de protamina.

20 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el fosfolípido neutro o aniónico comprende una cola no polar y una cabeza polar, teniendo dicha cola no polar un éster de alquilo saturado o insaturado de 4 a 30 átomos de carbono, teniendo dicha cabeza polar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina,
25 fosfatidilcolina-N-metoxi polietilenglicol, fosfatidiletanolamina-N-metoxi-polietilenglicol, fosfatidilserina-N-metoxi-polietilenglicol, ácido fosfatídico-metoxi-polietilenglicol y una combinación de los mismos.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición contiene complejos de nanopartículas cuyo diámetro varía de 10 a 500 nm, para la administración de genes.

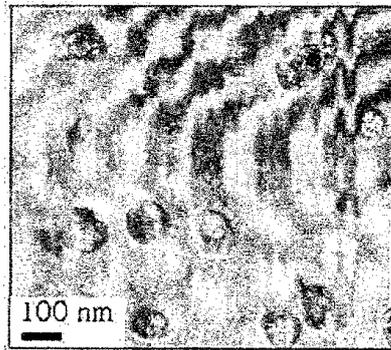
30 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición contiene el quitosano en una cantidad de 10 a 3.000 partes en peso, el pirofosfato de tiamina en una cantidad de 1 a 1.000 partes en peso, la protamina en una cantidad de 10 a 1.000 partes en peso y el fosfolípido neutro o aniónico en una cantidad de 100 a 5.000 partes en peso, basado en 100 partes en peso del gen.

35 7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además uno o más azúcares seleccionados del grupo que consiste en manosa, glucosa, fructosa, arabinosa, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, maltosa, lactosa, celobiosa, isomaltosa, dextrano, dextrina, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, hidroxietil- β -ciclodextrina, dimetil- β -ciclodextrina, trimetil- β -ciclodextrina y sulfobutiléter
40 β -ciclodextrina.

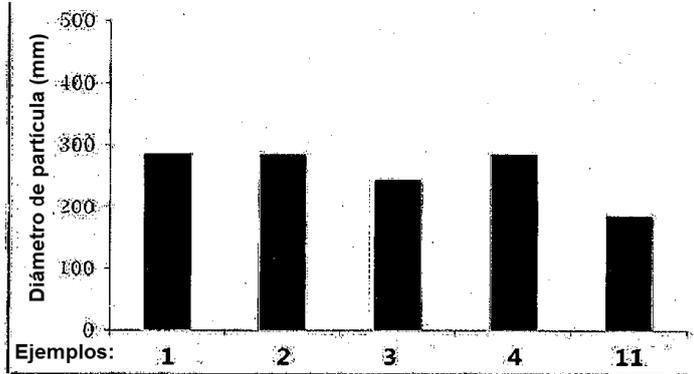
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en un estabilizador, un tampón, un conservante, un analgésico y un agente isotónico.

45 9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se formula en forma de una inyección, de una preparación por goteo, para inhalación o en forma liofilizada.

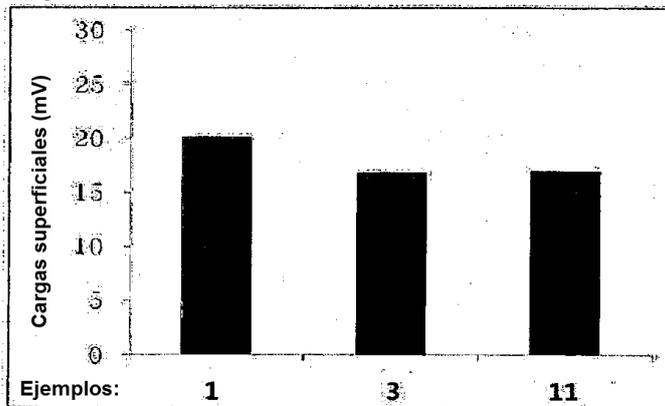
【 Figura 1 】



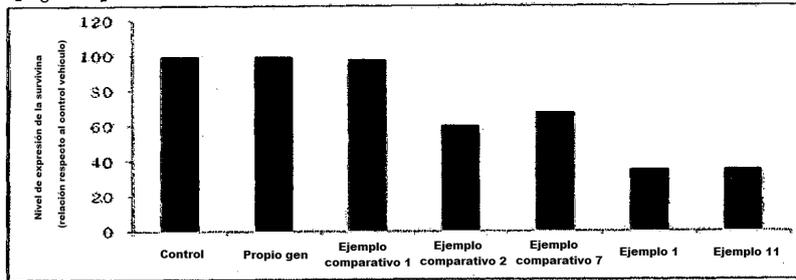
【 Figura 2 】



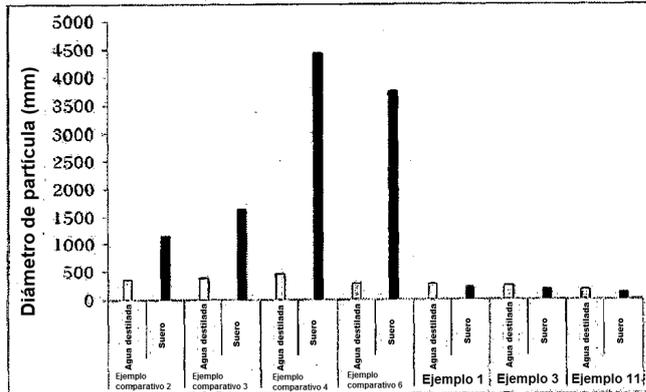
【 Figura 3 】



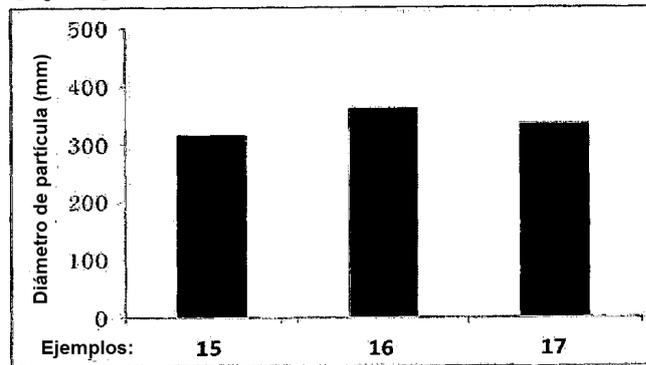
【Figura 4】



【Figura 5】



【Figura 6】



【Figura 7】

