

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 330**

51 Int. Cl.:

A61K 31/722 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014 PCT/KR2014/001656**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133351**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014 E 14756578 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2961414**

54 Título: **Composición para la inserción de genes que comprende quitosano y material de formación de cristales líquidos**

30 Prioridad:

28.02.2013 KR 20130022333

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.03.2019

73 Titular/es:

**CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP.
(100.0%)
8 Chungjeong-ro Seodaemun-gu
Seoul 120-756, KR**

72 Inventor/es:

**HWANG, HO YOUNG;
HWANG, JI HYEH;
LEE, YOUNG NAM;
NOH, SANG MYOUNG y
KI, MIN HYO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 705 330 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 la inserción de genes que comprende quitosano y material de formación de cristales líquidos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general a una composición para la inserción de genes que se forman en cristales líquidos en un fluido acuoso incluido quitosano y un material de formación de cristales líquidos.

10 Antecedentes de la técnica

La terapia génica que está centrada en el tratamiento de enfermedades se ha estudiado continuamente y la comercialización de los resultados de estudio de la terapia génica ha sido un esfuerzo continuado. Un gen es un material que incluye nucleótidos y ácidos nucleicos que son polímeros de nucleótidos y porta una fuerte carga negativa debido a los grupos fosfato portados sobre cada monómero de los ácidos nucleicos. La tecnología de terapia génica, en comparación con la tecnología de quimioterapia convencional, funciona a un nivel de ADN o ARN. Sin embargo, los genes pueden descomponerse fácilmente por las nucleasas y tienen un período relativamente corto de vida en las células u organismos vivos y, de este modo, el estudio de la tecnología con respecto a la "inserción de transfección de genes" es un prerrequisito.

20 La inserción de transfección de genes puede dividirse de acuerdo con el uso de virus, por ejemplo, un vector viral y un vector no viral, y cada uno tiene sus propias ventajas y desventajas.

25 El vector viral emplea una invasión celular intrínseca de un virus para provocar una inflamación en las células de ser humano y, de este modo, se ha considerado que proporciona un mecanismo de inserción de genes más eficaz en las células que el de un vector no viral. Sin embargo, el vector viral aún no ha resultado la dificultad en la administración a largo plazo debido a respuesta inmunes y no ha eliminado la posibilidad de la réplica del virus patogénico (ISRN Oncology, 2012, Artículo ID 616310, 14 páginas).

30 Para remediar los anteriores inconvenientes y el peligro de vectores virales, la investigación se ha centrado en el desarrollo de inserción de genes mediante un vector no viral. Sobre el vector viral, el vector no viral tiene ventajas de que no tiene riesgo de inflamación, no hay limitación en el tamaño de un gen para su inserción y resulta menos problemático en términos de inmunogenicidad en el organismo y es conveniente para múltiples dosis. El vector no viral puede dividirse en un lípido positivamente cargado y un polímero positivamente cargado. La unión entre un vector no viral y un gen negativamente cargado para su inserción se facilita mediante atracción electrostática. Por lo tanto, el vector no viral tiene la ventaja de que puede proporcionar fácilmente un compuesto mediante una mezcla física del gen negativamente cargado para su inserción y el vector positivamente cargado.

40 La publicación de solicitud de patente coreana n.º 10-2012-0078661 desvela un método de inserción de genes que usa un complejo en el cual un lípido catiónico sintético forma un enlace iónico con el gen. En particular, se refiere a la formación de una unión iónica no covalente mediante la adición de un gen a una solución que consiste en al menos un lípido catiónico y diversos tensioactivos. El lípido catiónico en el anterior método puede tener citotoxicidad y el lípido sintetizado del mismo es un material que requiere una purificación de alta pureza y, de este modo, provoca un problema para la producción a gran escala debido a la dificultad en el control de calidad. Adicionalmente, el método tiene la desventaja de que tiene una estabilidad relativamente baja durante su almacenamiento y distribución convirtiéndolo, de este modo, complicado en términos de comercialización. Por consiguiente, el método de la presente invención es distinto del anterior método en que proporciona un método para la inserción de genes con una alta estabilidad formando un cristal líquido mediante el uso de una mezcla de lípidos inyectables a diferencia del lípido catiónico sintetizado en la solicitud de patente coreana anterior.

50 La publicación de solicitud de patente de los EE.UU. n.º 2011-0038941 describe un método para la fabricación de una nanopartículas de oligonucleótido-lípido que consiste en un oligonucleótido, un lípido y un agente de complejación, que incluye 1) mezclar un lípido, un agente de complejación y un polímero catiónicos en un disolvente orgánico miscible en agua; 2) disolver el oligonucleótido en un tampón acuoso; y 3) inyectar la primera mezcla preparada en 1) en la segunda mezcla preparada en 2) o mezclar la primera mezcla preparada en 1) y la segunda mezcla preparada en 2) con presión para formar una tercera mezcla; y 4) retirar el disolvente orgánico de la tercera mezcla preparada en 3). El anterior método resulta desventajoso debido a la dificultad en el control de calidad y también porque requiere una máquina especial durante el proceso de fabricación. Además, debido a la dificultad en la producción a gran escala, el método resulta complicado de aplicar en la industria. Aunque el método desvela protamina y quitosano mientras que reivindica un amplio alcance de materiales no describe realizaciones ejemplares de las composiciones de la inserción de genes que incluyen quitosano o los efectos que se desea proteger. Además, el método se refiere a un método de fabricación de nanopartículas que requiere un proceso de mezcla bajo condiciones medioambientales específicas y retirar un disolvente orgánico y, de este modo, difiere del de la presente invención.

65 Un cristal líquido es un estado de la materia intermedio entre líquido y sólido. Aunque la configuración molecular del cristal líquido no es estrictamente regular como en el caso de un cristal sólido, forma un cristal en un estado

relativamente regular cuando hay una transición de fase desde un sólido, a diferencia del líquido normal que se vuelve amorfo. Por tanto, un cristal líquido se denomina materia meso-fase.

La publicación de solicitud de patente coreana n.º 10-2012-0013336 desvela un sistema de inserción de genes que comprende una nanopartícula de cristales líquidos compuesta de un lípido de diacilo que encierra una cavidad acuosa y un gen contenido dentro de la cavidad acuosa. Este sistema se describe para no producir productos de degradación de ácido láctico o ácido glicólico, de este modo, sin causar dolor ni inflamación en los sitios de inyección y permite la liberación prolongada de una sustancia farmacológicamente activo *in vivo* durante cuatro semanas. Sin embargo, el lípido de diacilo, el constituyente principal del material de preparación anterior, no se ha garantizado que sea seguro y, por lo tanto, suscita un problema de que no puede usarse en general como un excipiente de un fármaco farmacéutico. Adicionalmente, el sistema no es ventajoso puesto que requiere el uso de un disolvente orgánico que minimiza la actividad de unos pocos materiales farmacológicamente activos (H. Ljusberg-Wahre, F. S. Nielse, 298, 328-332 (2005); H. Sah, Y. Bahl, *Journal of Controlled Release* 106, 51-61(2005)).

En la fabricación de un complejo de inserción de genes, el quitosano puede ser un buen candidato para un vector de inserción no viral debido a que tiene una buena biocompatibilidad y es un material catiónico natural adecuado para la producción a gran escala. En particular, el quitosano puede descomponerse en un azúcar amino mediante lisozima cuando entra en un organismo vivo y es un material polimérico seguro cuyo LD50 en ratas se conoce que es 16 g/kg (Trends in Food Science & Technology, 2007; 18: 117-131).

El quitosano es un fuerte candidato para un vector no viral para la inserción de un gen en una célula puesto que puede formar una unión iónica con un gen. Sin embargo, su carga catiónica se debilita en un pH fisiológico (pH 7-7,4) y de este modo, su fuerza de unión con un gen se ve deteriorada. Como resultado de ello, el quitosano no puede mantener un complejo con un gen con la condición de pH fisiológico anterior y se libera, reduciendo drásticamente, de este modo, su efecto sobre la inserción de genes. Se ha demostrado un quitosano modificado como vector de inserción por Wen Guang Liu y col. en *Bioconjugate Chemistry*, 14 (2003) pág. 782-789.

Un nanocompuesto que consiste simplemente en quitosano, un gen y un pirofosfato de tiamina pueden mejorar la inserción de gene *in vitro*. Sin embargo, en una condición *in vivo* a diferencia de en una condición *in vitro*, un complejo de quitosano puede no tener un rendimiento de inserción de genes excelente debido a la presencia de diversas proteínas de suero y exudados de células. Esto se debe a que, el nanocompuesto de quitosano, una vez que se ha introducido en un organismo vivo, se precipita coagulándose con proteínas de suero *in vivo* y, por lo tanto, no realiza la inserción de genes. Por consiguiente, debido a su incompatibilidad *in vivo*, el compuesto de quitosano convencional no ha resultado exitoso en su comercialización como vector de inserción de genes (Expert Opinion on Drug Delivery, 2011; 8: 343-357).

Como tal, para que el quitosano sea aplicable en un organismo humano como vector de inserción de genes, es esencial que el nanocompuesto de quitosano tenga la capacidad de inserción de genes requerida a un pH fisiológico y que también mantenga la estabilidad como nanocompuesto sin provocar la coagulación incluso cuando se introduce en un organismo vivo.

No obstante, respecto a la inserción de genes usando quitosano, no se ha informado sobre el establecimiento de una tecnología segura que permite mantener la estabilidad del nanocompuesto dentro del suero sanguíneo sin mostrar ninguna toxicidad mientras que a la vez tenga un rendimiento eficaz de inserción de genes en un organismo vivo, necesitando, de este modo, la necesidad del desarrollo de un vector de inserción de genes mediante el uso de quitosano.

[Documentos de patente]

Patente coreana n.º 10-2012-0078661

Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2011-0038941

[Documentos de no patente]

Development of Safer Gene Delivery Systems to Minimize the Risk of Insertional Mutagenesis-Related Malignancies: A Critical Issue for the Field of Gene Therapy (ISRN Oncology, 2012, Article ID 616310, pág. 14)

Enzymatic characterization of lipid-based drug delivery systems (H. Ljusberg-Wahre, F. S. Nielse, *Int J Pharm.* 2005;298:328-332(2005))

Effects of aqueous phase composition upon protein destabilization at water/organic solvent interface (H. Sah, Y. Bahl, *Journal of Controlled Release* 106, 51-61(2005)).

Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview (K.V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan, *Trends in Food Science & Technology*, marzo de 2007, páginas 117-131)

Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems (Priya Prakash Karmalil & Dmitri Simberg, páginas 343-357)

Divulgación de la invención

5

Problema técnico

Por consiguiente, la presente invención se ha realizado teniendo en cuenta los anteriores problemas que aparecen en la técnica anterior, y un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la inserción de un gen incluido un material de formación de cristales líquidos y quitosano.

10

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un nanocompuesto que incluye un material de formación de cristales líquidos, quitosano y un gen.

15 Solución al problema

Para completar los objetivos anteriores, la presente invención proporciona una composición para la inserción de genes que se forman en cristales líquidos en un fluido acuoso incluido un material de formación de cristales líquidos, fosfolípido, un endurecedor de cristales líquidos y quitosano, tal como se define en la reivindicación 1.

20

La composición de la presente invención para la inserción de genes tiene una capacidad de inserción de genes de alta eficacia y una estabilidad excelente mediante la mejora considerable de la relativamente baja resistencia de unión entre quitosano y un gen y, mejorando drásticamente la estabilidad de los nanocompuestos de quitosano en suero sanguíneo, siendo útil, de este modo, como agente terapéutico de genes.

25

Más específicamente, el material de formación de cristales líquidos, fosfolípido y un endurecedor de cristales líquidos de la presente invención pueden formar cristales líquidos en presencia de una solución acuosa. Los cristales líquidos formados de este modo forman nanocompuestos estables junto con quitosano y genes, aumentando considerablemente, de este modo, la capacidad de inserción de genes y también debido a su estabilidad, los nanocompuestos pueden mantenerse en un estado uniforme durante un largo período de tiempo.

30

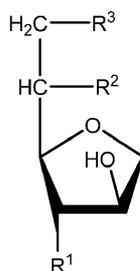
El "material de formación de cristales líquidos" de la presente invención es un material que forma cristales líquidos que tienen una estructura no laminar. Puede seleccionarse entre el grupo que consiste en éster de ácido graso insaturado de sorbitano, glicerol de monoácido, glicerol de diácido y una combinación de los mismos.

35

El material de formación de cristales líquidos es un éster de ácido graso insaturado de sorbitano que tiene al menos dos grupos hidroxilo (-OH) en el grupo de cabeza polar. El éster de ácido graso insaturado de sorbitano es un compuesto representado por la Fórmula 1 a continuación, en donde el monoéster de sorbitano es $R_1=R_2=OH$, $R_3=R$, y el diéster de sorbitano es $R_1=OH$, $R_2=R_3=R$, en donde R es un grupo éster de alquilo C4-C40 que tiene al menos un enlace doble.

40

[Fórmula 1]



45

Más específicamente, el éster de ácido graso insaturado de sorbitano de la presente invención se puede obtener a partir de aceites vegetales, grasas animales y aceites animales, aceite de ballena y aceites de pescado. Ejemplos preferentes de aceite vegetal incluyen manteca de cacao, aceite de borraja, aceite de salvado de arroz, aceite de té verde, aceite de soja, aceite de cáñamo, aceite de sésamo, aceite de semilla de cereza, aceite de semilla de colza, aceite de semilla de amapola, aceite de semilla de calabaza, aceite de semilla de uva, aceite de hueso de albaricoque, aceite de coco, aceite de camelia, aceite de onagra, aceite de colza, aceite de girasol, aceite de canola, aceite de piñón, aceite de nuez, aceite de avellana, aceite de aguacate, aceite de almendras, aceite de cacahuete, aceite de jojoba, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de borraja y aceite de onagra. Ejemplos preferentes de grasas y aceites animales pueden incluir, grasa de leche, sebo de vacuno, aceite de mamífero, aceite de reptil y aceite de ave y, preferentemente, al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en monoéster de sorbitano, sesquiéster de sorbitano, diéster de sorbitano y una combinación de los mismos, que puede obtenerse de aceite de ballena y aceite de pescado.

55

Preferentemente, el éster de ácido graso insaturado de sorbitano puede ser monooleato de sorbitano, monolinoleato de sorbitano, monopalmitoleato de sorbitano, monomiristoleato de sorbitano y una combinación de los mismos, en donde un grupo de ácido graso está unido por éster a sorbitano.

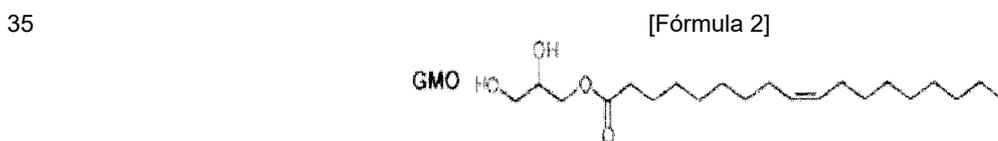
5 El sesquiéster de sorbitano puede ser al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en sesquioleato de sorbitano, sesquilineoleato de sorbitano, sesquipalmitoleato de sorbitano, sesquimiristoleato de sorbitano y una combinación de los mismos, en donde al menos 1,5 de grupos de ácido graso están unidos por éster a sorbitano.

10 El diéster de sorbitano puede ser al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en dioleato de sorbitano, dilinoleato de sorbitano, dipalmitoleato de sorbitano, dimiristoleato de sorbitano y una combinación de los mismos, en donde al menos 2 de grupos de ácido graso están unidos por éster a sorbitano.

Además, el glicerol de monoacilo, otra forma de un material de formación de cristales en la presente invención, es un compuesto en el que el éster de ácido graso está unido por éster a un grupo de cabeza polar que consiste en glicerina y el glicerol de diacilo es un compuesto en el que dos grupos de ácido graso, que puede ser igual o diferente, unido por éster a un grupo de cabeza polar que consiste en glicerina. Los grupos de ácido graso, que están unidos por éster a glicerol de monoacilo y glicerol de diacilo de la presente invención, tienen aproximadamente de 4 a aproximadamente 30 átomos de carbono, que pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente saturados o insaturados. Más específicamente, los grupos de ácido graso pueden ser al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido láurico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido enantico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido bebenico, ácido lignocérico, ácido cerótico, ácido linolénico, ácido alfa-linoleico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosa-hexaenoico (DHA), ácido linoleico (LA), ácido gama-linoleico (GLA), ácido dihomo gama-linoleico (DGLA), ácido araquidónico (AA), ácido oleico, ácido vaccénico, ácido elaídico, ácido eicosanoico, ácido erucídico, ácido nervónico y una combinación de los mismos.

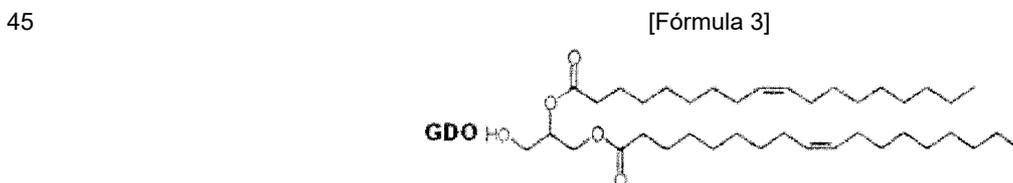
Más específicamente, el glicerol de monoacilo de la presente invención puede ser al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en monobutirato de glicerol, monobehenato de glicerol, monocaprilato de glicerol, monolaurato de glicerol, monometacrilato de glicerol, monopalmitato de glicerol, monoestearato de glicerol, monooleato de glicerol, monolinoleato de glicerol, monoarquidato de glicerol, monoarquidonato de glicerol, monoerucato de glicerol y una combinación de los mismos.

Preferentemente, puede usarse monooleato de glicerol (GMO) representado por la Fórmula 2 a continuación.



Adicionalmente, el glicerol de diacilo de la presente invención puede ser al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en dibehenato de glicerol, dialaurato de glicol, dimetilacrilato de glicerol, dipalmitato de glicerol, diestearato de glicerol, dioleato de glicerol, dilinoleato de glicerol, dierucato de glicerol, dimiristato de glicerol, diricinoleato de glicerol, dipalmitoleato de glicerol y una combinación de los mismos.

Preferentemente, se puede usar dioleato de glicerol (GDO) representado por la Fórmula 3 a continuación.



Los "fosfolípidos" de la presente invención son esenciales para la construcción de estructuras laminares, tales como liposomas, en técnicas convencionales, pero, no pueden formar una estructura de fase no laminar, tal como un cristal líquido, por sí mismos. Sin embargo, los fosfolípidos pueden participar en la formación impulsada por materiales de formación de cristales líquidos de estructuras de fase no laminar, sirviendo para estabilizar los cristales líquidos resultantes.

El fosfolípido útil en la presente invención deriva de planta o animales y, preferentemente, contiene un grupo éster de alquilo saturado o insaturado de 4 a 30 átomos de carbono con una cabeza polar. El fosfolípido se puede seleccionar de entre uno o más de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomiolina y combinación de los mismos según la estructura de la cabeza polar. El grupo de éster de alquilo a unir al fosfolípido puede ser un éster de ácido graso saturado tal como mono- y dipalmitoilo, mono- y

dimiristoílo, mono- y dialaurilo, mono- y diestearilo, etc., o un éster de ácido graso insaturado tal como mono- y dilinoleílo, mono- y dioleílo, mono- y dipalmitoleílo, mono- y dimiristoleílo, etc. y también, puede ser en una forma en la que tanto el éster de ácido graso como el éster de ácido graso insaturado pueden coexistir.

5 En una realización preferida de la presente invención, el fosfolípido puede proporcionarse como una composición para una inserción de genes seleccionados entre el grupo que consiste en fosfatidicolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina y una combinación de los mismos.

10 El "endurecedor de cristales líquidos" de la presente invención no puede formar una estructura no laminar, a diferencia del material de formación de cristales líquidos, ni una estructura laminar tal como un liposoma a diferencia de los fosfolípidos, por sí mismo. Sin embargo, el endurecedor de cristal líquido contribuye a la formación impulsada por material de cristales líquidos de estructuras de fase no laminar mediante el aumento de la curvatura de las estructuras no laminares para potenciar la coexistencia ordenada de aceite y agua. En interés de esta función, se requiere ventajosamente que el endurecedor de cristal líquido tenga un resto polar muy limitado y un resto no polar voluminoso dentro de su estructura molecular.

15 En la práctica, sin embargo, la sustancia biocompatible que se puede inyectar en el cuerpo se puede seleccionar como el endurecedor de cristal líquido de la presente invención solo por medio de experimentos directos y repetidos, especialmente. Como resultado de ello, los endurecedores de cristal líquido adecuados para la composición de la presente invención tienen unas estructuras moleculares que son diferentes entre sí y, por lo tanto, no se pueden dilucidar como que tiene solo una estructura molecular. La característica estructural común deducida a partir de la observación de todos los endurecedores de cristal líquido identificados es que estos se encuentran libres de grupos ionizables, tales como grupos carboxilo y amina y tienen restos hidrófobos que comprenden un grupo triacilo voluminoso con de 15 a 40 átomos de carbono o estructura de anillo de carbono.

20 Los ejemplos preferidos del endurecedor de cristal líquido de la presente invención se pueden encontrar libres de grupos ionizables, tales como grupos carboxilo y amina y tiene como máximo un grupo hidroxilo y éster como una cabeza polar débil, con restos hidrófobos que incluyen un grupo triacilo voluminoso con de 20 a 40 átomos de carbono o estructura de anillo de carbono. El endurecedor de cristal líquido de la presente invención es al menos uno seleccionado entre triglicérido, palmitato de retinilo, acetato de tocoferol, colesterol, benzoato de bencilo, ubiquinona y una combinación de los mismos.

25 El cristal líquido puede formarse mediante la adición de un tensioactivo además del material de formación de cristales líquidos, el fosfolípido y el endurecedor de cristal líquido. Preferentemente, los tensioactivos a añadir adicionalmente pueden ser polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, que son alcoholes alifáticos superiores de polioxietileno y más preferentemente polisorbato 80.

30 El "quitosano" de la presente invención es un polisacárido catiónico muy seguro que tiene una estructura de (1->4) 2-amino-2-desoxi-β-D-glucano presente en la naturaleza. El quitosano es una forma de un polímero que forma un grupo amina libre mediante desacetilación de quitina obtenida a partes de crustáceos naturales. En particular, el quitosano tiene un peso molecular de aproximadamente 1-500 kDa, tiene más del 50 % de grupos amina libres, preferentemente tiene un peso molecular de aproximadamente 150-400 kDa, tiene más del 80% de grupos amina libres, pero sin limitación a estos.

35 Los quitosanos solubles en agua es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en HCl de quitosano, acetato de quitosano, glutamato de quitosano y lactato de quitosano. El quitosano soluble en agua es soluble en agua puesto que los grupos amina en los quitosanos solubles en agua forman sales en un material ácido tal como HCl o ácido acético, ácido glutámico, ácido láctico, en una relación equivalente. El quitosano soluble en agua es ventajoso en que puede eliminar bacterias u otras impurezas durante el proceso de la preparación de inyección.

40 En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir además un gen.

45 El gen puede ser un nucleótido o un ácido nucleico que es un polímero de nucleótidos, al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ácido desoxirribonucleico (ADN) unicatenario o bicatenario, ácido ribonucleico (ARN) unicatenario o bicatenario, ADN plásmido (tipo), ARN pequeño de interferencia (ARNip) unicatenario o bicatenario, oligonucleótido antisentido, ribozima, ARN catalítico y nucleótidos. Preferentemente, el gen puede ser al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ADN plásmido (tipo), ARNip unicatenario o bicatenario y oligonucleótido antisentido. Aquí, el gen puede ser un fármaco genético y el fármaco genético se refiere a un gen que tiene eficacia para el tratamiento o prevención de al menos una enfermedad.

50 En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir además un dispersante.

55

"Dispersante" es un tipo de tensioactivo que tiene las propiedades opuesta de hidrofobicidad e hidrofiliidad dentro de una molécula, capaz de dispersar uniformemente micropartículas orgánicas e inorgánicas, que son complicadas de dispersar en un líquido y evitar la precipitación o aglutinación de partículas, manteniendo, de este modo, una composición estable.

5 El dispersante a usar en la presente invención puede estar en la forma de un oligómero superior a 15 unidades monoméricas o un polímero, preferentemente, uno seleccionado del grupo que consiste en poloxámero, alcohol polivinílico, succinato de polietilenglicol de D-alfa-tocoferol, polietilenglicol-gliceril monooleato, almidón hidrófobamente modificado y una combinación de los mismos, más preferentemente, uno seleccionado entre poloxámero, succinato de polietilenglicol de D-alfa-tocoferol y una combinación de los mismos.

En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir además pirofosfato de tiamina o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

15 El pirofosfato de tiamina es un material seguro presente en una forma activa de vitamina B1 que se forma en el organismo cuando se administra vitamina B1 en el organismo. Asimismo, tiene ambos cationes y aniones estructuralmente dentro del compuesto siendo capaz, de este modo, de compensar la unión relativamente débil entre quitosano y un gen.

20 En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir además protamina o las sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

La protamina es una proteína catiónica natural que tiene abundancia de arginina y se ha usado como excipiente de fármacos farmacéuticos. Asimismo, la protamina es un material predominantemente presente en los testículos animales, particularmente en el núcleo de esperma de peces tales como salmón y se conoce que está implicado en la expresión de información genética como en histona mediante la asociación o disociación con ADN. El peso molecular de la protamina es de aproximadamente 4.000-10.000, en donde al menos el 70 % de los constituyentes están presentes en la forma de arginina, pero sin limitación a estos. En particular, la sal de protamina de la presente invención puede incluir sales por un material ácido tal como clorhidrato o sulfato.

30 La protamina es soluble en agua incluso cuando no forma una sal y el tipo de sal también es soluble en agua. Por lo tanto, cualquier tipo de protamina puede usarse como componente de la composición para la inserción de genes de la presente invención.

35 En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir además lauril sulfato de sodio.

El lauril sulfato de sodio es un tensioactivo aniónico representativo que tiene una fórmula química de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$. Es un cristal de color blanco o amarillo claro y consiste en una mezcla de alquilsulfato de sodio. Adicionalmente, se usa para dispersar uniformemente sólidos o líquidos que no son miscibles entre sí en un líquido y puede evitar la precipitación o aglutinación de las partículas en la composición de la presente invención. En particular, el lauril sulfato de sodio puede servir para controlar el tipo de formulación de la composición para la inserción de genes de acuerdo con su contenido en la composición.

45 En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir además un sacárido, que puede ser al menos uno seleccionado entre el 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 sulfobutileter β -ciclodextrina.

50 En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir adicionalmente un aditivo farmacéutico seleccionado entre el grupo que consiste en un agente estabilizador, un tampón, un conservante, un agente analgésico y un agente de tonicidad.

55 El agente estabilizador puede incluir un antioxidante, un agente reductor y un quelante, etc. El tampón puede incluir una sal orgánica o inorgánica, etc., para el control de pH. El conservante puede incluir un componente antiséptico tal como p-Hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de etilo, p-hidroxibenzoato de propilo, p-hidroxibenzoato de butilo, clorobutanol, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, cresol, clorocresol y alcohol bencílico. El agente analgésico puede incluir un componente analgésico local tal como alcohol de bencilo o clorobutanol. El agente de tonicidad puede incluir sacáridos y sales inorgánicas, etc., para el control osmótico.

60 En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir además un nanocompuesto formado. El nanocompuesto puede formarse mezclando un cristal líquido que incluye material de formación de cristales líquidos, fosfolípido, un endurecedor de cristales líquidos y quitosano, un gen. El tamaño del nanocompuesto puede encontrarse en el intervalo de 10-500 nm, más preferentemente de 10-300 nm, lo más preferentemente de 50-300 nm, 100-300 nm, 150-300 nm y 200-300 nm. La estructura del nanocompuesto puede ser

tal que el quitosano está presente sobre la superficie, preferentemente una estructura en la que el quitosano está recubierto sobre la superficie.

5 En una realización ejemplar de la presente invención, la composición para la inserción de genes puede incluir una solución que contiene cristales líquidos y una solución que contiene quitosano o una sal del mismo.

Los cristales líquidos pueden incluir un material de formación de cristales líquidos, fosfolípido, un endurecedor de cristal líquido y dentro del alcance sin alejarse del objeto de la presente invención, puede incluir adicionalmente un material tal como un tensioactivo.

10 En una realización ilustrativa, la presente invención proporciona una preparación liofilizada de la composición para la inserción de genes, que incluye un material de formación de cristales líquidos, fosfolípido, un endurecedor de cristal líquido, quitosano o sus sales.

15 Preferentemente, la preparación liofilizada puede incluir adicionalmente un excipiente para la liofilización y, preferentemente, el excipiente para la liofilización puede ser un alcohol de azúcar o un sacárido, más preferentemente un ser sacárido.

20 Preferentemente, el alcohol de azúcar puede ser manitol, eritritol, inositol, sorbitol. Preferentemente, el sacárido puede ser al menos uno seleccionado entre el 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 sulfobutileter β -ciclodextrina, más preferentemente trehalosa o glucosa.

25 Ejemplos preferentes de la preparación liofilizada pueden incluir un ajustador del pH, un antioxidante, antiséptico, un ajustador de presión osmótica, etc.

30 Adicionalmente, la preparación liofilizada de la presente invención puede fabricarse usando un método de liofilización convencionales en la técnica relacionada y la rehidratación posterior después de la liofilización puede conseguir una característica apropiada para la reconstitución para conseguir el objeto de la inserción de genes. Es decir, la composición para la inserción de genes de la presente invención antes de la liofilización puede reconstruirse mediante una sencilla redisolución añadiendo aleatoriamente cualquier solución adecuada (una solución redisuelta). Ejemplos de la solución redisuelta pueden incluir agua para inyección, solución salina, otra solución de infusión general (por ejemplo, glucosa, solución de infusión de aminoácidos), etc., pero sin limitación a estos.

35 La solución rehidratada de la preparación liofilizada puede administrarse por vía parenteral mediante una inyección intravenosa, una inyección intramuscular, una inyección subcutánea, una inyección intrauterina, una inyección cerebrovascular, etc.

40 La composición de la presente invención que incluye los componentes anteriormente mencionados puede fabricarse del modo que se describe a continuación, pero sin limitación a estos.

45 El método de fabricación puede incluir: 1) preparar un pre-complejo mezclando un gen, lauril sulfato de sodio o pirofosfato de tiamina y protamina y quitosano soluble en agua; y 2) añadir una solución en la que los cristales líquidos se dispersan dentro de la misma y forman un nanocompuesto líquido final. El nanocompuesto formado dentro de la misma puede tener un tamaño de 10 a 500 nm para cumplir con el tamaño de partícula requerido para su introducción en una célula, preferentemente de 10 a 300 nm, más preferentemente de 50 a 300 nm, de 100 a 300 nm, de 150 a 300 nm y de 200 a 300 nm.

50 El pre-complejo de un gen de la presente invención puede prepararse mezclando un gen, lauril sulfato de sodio o pirofosfato de tiamina y protamina y quitosano soluble en agua y agitando la mezcla a continuación, preferentemente, mezclando el gen y el quitosano soluble en agua en una relación en peso de 1 : 0,3-20. Puede incluirse selectivamente lauril sulfato de sodio, pirofosfato de tiamina, protamina en el pre-complejo. Preferentemente, el gen y el lauril sulfato de sodio puede mezclarse en una relación de peso de 1:1, el gen y el pirofosfato de tiamina en una relación de peso de 1:1-6 y el gen y la protamina en una relación de peso de 1:0,6 y, a continuación, agitarse respectivamente.

60 En la presente invención, la solución en la que se dispersan los cristales líquidos puede formarse mezclando un material de formación de cristales líquidos, un fosfolípido y un endurecedor de cristal líquido y agitando la mezcla a continuación. Más específicamente, una solución de lípidos se puede formar agitando la mezcla de un material de formación de cristales líquidos, un fosfolípido y un endurecedor de cristal líquido a temperatura ambiente y puede prepararse uniformemente añadiendo un dispersando a la solución de lípidos preparada a partir de la misma. La solución en la que se dispersan los cristales líquidos se prepara mezclando el material de formación de cristales líquidos, un fosfolípido y el endurecedor de cristales líquidos en una relación de peso de 0,20-1 : 1-1.5 : 0,05-0.2.

En la presente invención, la solución en la que se dispersan los cristales del pre-complejo y líquido puede mezclarse y filtrarse para formar, de este modo, un nanocompuesto líquido final y el nanocompuesto preparado de este modo puede estar en una forma en la que el quitosano está revestido sobre el mismo.

5 La preparación liofilizada de la presente invención puede prepararse añadiendo un alcohol de azúcar o un sacárido, preferentemente sacárido, como excipiente, al nanocompuesto líquido finalmente preparado y mezclando entonces liofilizando la mezcla a continuación. El sacárido puede estar en forma de una solución del 20-40 %, preferentemente una solución del 30 % y puede solidificarse a entre -50 y -80 °C, preferentemente, a -70°C.

10 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un nanocompuesto que incluye la composición para la inserción genética.

El nanocompuesto puede usarse como un agente terapéutico genético, de modo que puede haber presente quitosano sobre la superficie del nanocompuesto y servir para recubrir los cristales líquidos y el gen. El agente terapéutico genético es una vía de administración adecuada para mamíferos incluidos seres humanos, por ejemplo, inyecciones, administración transpulmonar, nasal, oral y rectal. Preferentemente, puede administrarse por medio de inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrauterina, cerebrovascular y puede administrarse directamente sobre tejidos particulares y órganos y tejidos cancerosos según sea necesario.

20 En la presente invención, la dosificación diaria del agente terapéutico genético puede controlarse en el intervalo de 1 mg/kg-10 mg/kg. La dosificación óptima a administrar puede determinarse fácilmente mediante un experto en la técnica y puede ajustarse dependiendo del tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad; el contenido de principios activos y otros componentes, tipos de formulaciones; edad, peso corporal, condiciones de salud, sexo, edad y hábitos alimenticios del sujeto; duración de la administración, vía de administración, duración del tratamiento y la combinación de fármacos administrados.

Efectos ventajosos de la invención

30 La composición de la presente invención que incluye quitosano y un material de formación de cristales líquidos puede mejorar la relativamente baja resistencia de unión entre quitosano y un gen y, también, aumente considerablemente la estabilidad de un nanocompuesto de quitosano en suero sanguíneo, realizando, de este modo, una inserción de genes altamente eficaz y una estabilidad excelente, siendo útil, de este modo, como agente terapéutico de genes.

Breve descripción de los dibujos

35 La FIG. 1 muestra imágenes de las estructuras de cristales líquidos en un fluido acuoso preparado en los Ejemplos 2 y 6;
 La FIG. 2 muestra imágenes de las estructuras de cristales líquido en un fluido acuoso preparado en los Ejemplos 2, 4, 6 y 10, a través de una microscopía de electrónica de crió-transmisión (Crió-TEM).
 40 La FIG. 3 es un gráfico que muestra el tamaño de partículas de cristales líquidos en los Ejemplos 7, 10, 12, 13, 14, 17, 19 y el Ejemplos comparativo 1;
 La FIG. 4 es un gráfico que muestra los resultados de observación de la capacidad inhibitoria de los cristales líquidos preparados en los Ejemplos 7, 10, 12, 13, 14, 17, 19 y el Ejemplos comparativo 1 frente a proteínas diana;
 45 La FIG. 5 es un gráfico que muestra la estabilidad de partículas en suero sanguíneo de los cristales líquidos preparado en los Ejemplos 10, 17 18, 19 y los Ejemplos comparativos 2 y 3;
 La FIG. 6 es un gráfico que muestra el tamaño de partículas de los cristales líquidos preparados en los Ejemplos 23 y 24 después de la liofilización; y
 La FIG. 7 es un gráfico que muestra los resultados de observación de la capacidad inhibitoria de los cristales líquidos preparados en el Ejemplo 10 y el Ejemplo comparativo 4 frente al crecimiento tumoral.

Modo para la invención

A partir de ahora en el presente documento, las realizaciones ejemplares de la presente invención se describirán en lo sucesivo con detalle en relación con los dibujos adjuntos.

Ejemplos 1-6. Preparación de composiciones de lípidos que forman cristales líquidos

60 Se añadió fosfolípido, éster de ácido graso insaturado de sorbitán, un endurecedor de cristal líquido y etanol en la cantidad que se muestra en la Tabla 1 a continuación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente para obtener una solución de lípidos uniforme.

Se añadieron 0,15 ml de la solución de lípidos en 5 ml de solución acuosa de poloxámero 407 al 1,1 % y se homogeneizó a 20-75 °C usando un ultrasonificador o un homogeneizador (PowerGenmode1123, Fisher) a una velocidad de 1.000-3.000 RPM durante 5-10 minutos y se obtuvo una composición para cristales líquidos en una fase de solución. La Tabla 1 a continuación muestra las relaciones en peso para los componentes finales de las composiciones preparadas a partir de los mismos.

[Tabla 1]

Unidad (mg)	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4	Ej. 5	Ej. 6
Lipoide 5-100 ¹⁾	1,39	6,95	13,90	1,39	6,95	13,90
Monooleato de sorbitano	0,92	2,30	4,60	-	-	-
Sesquinooleato de sorbitano	-	-	-	0,92	2,30	4,60
Polisorbato 80	0,05	-	0,50	-	0,25	0,50
Acetato de tocoferol	0,18	0,45	0,90	0,18	0,45	0,90
Etanol	0,36	0,45	0,60	0,90	0,36	0,45
Poloxámero 407	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1

¹⁾Lipoide S-100 consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y lisofosfatidilcolina e incluye fosfatidilcolina superior al 94 % como componente principal.

Ejemplos 7-13. Preparación de compuestos con gen, quitosano, protamina, lauril sulfato de sodio y composición de lípidos formadora de cristales líquidos

- 5 Se añadió fosfolípido, éster de ácido graso insaturado de sorbitán, un endurecedor de cristal líquido y etanol en la cantidad que se muestra en la Tabla 2 a continuación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente para obtener una solución de lípidos uniforme.
- 10 Se añadieron 0,15 ml de la solución de lípidos en 5 ml de solución acuosa de poloxámero 407 al 1,1 % y se homogeneizó a 20-75 °C usando un ultrasonificador o un homogeneizador (Power Gen model 123, Fisher) a una velocidad de 1.000-3.000 RPM durante 5-10 minutos y se obtuvo una composición para cristales líquidos en una fase de solución.
- 15 Cuando se debe realizar la inserción de genes añadiendo adicionalmente lauril sulfato de sodio, ARNip de survivina, que debe suministrarse como material activo, se mezcló con lauril sulfato de sodio en una relación de peso de 1:1 (p/p) y la mezcla se preparó a la concentración de 20 mg/ml usando agua para inyección. HCl de quitosano que tiene un peso molecular de 150 kDa, protamina y poloxámero 407 se mezclaron en relaciones de peso que se muestran en la Tabla 2 a continuación y se prepararon a una concentración de 8 mg/ml usando agua para inyección y, a continuación,
- 20 se mezclaron con 20 mg/ml de la solución mezclada incluyendo ARNip de survivina y lauril sulfato de sodio, a una relación de volumen de 1:2,5 (v/v) y se agitó a continuación. La solución mezclada de ARNip de survivina que no incluye lauril sulfato de sodio se preparó del mismo modo que anteriormente excepto en la etapa de mezcla de lauril sulfato de sodio.
- 25 Por último, la composición de cristales líquidos preparada de este modo se añadió con solución mezclada de ARNip de survivina de acuerdo con las relaciones de peso que se muestran en la Tabla 2 a continuación para obtener compuestos y los compuestos resultantes se filtraron usando un filtro de 0,22 µm. El ARNip de survivina que se usó tenía una secuencia de sentido de 5'-AAG GAG AUC AAC AUU UUC A(dTdT)-3' y una secuencia antisentido de 5'-UGA AAA UGU UGA UCU CCU U(dTdT)-3'. La Tabla 2 a continuación muestra las relaciones en peso de los
- 30 componentes finales de las composiciones preparadas de este modo.

[Tabla 2]

Unidad (ug)	Ej. 7	Ej. 8	Ej. 9	Ej.10	Ej.11	Ej.12	Ej.13
Lipoide 5-100 ¹⁾	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39
Monooleato de sorbitano	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
Polisorbato 80	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Acetato de tocoferol	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Etanol	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Poloxámero 407	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20
ARNip de survivina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Lauril sulfato de sodio	-	1,00	-	1,00	1,00	1,00	1,00
Protamina	-	-	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60

Unidad (ug)	Ej. 7	Ej. 8	Ej. 9	Ej.10	Ej.11	Ej.12	Ej.13
HCl de quitosano	0,30	0,30	0,30	0,30	5,00	10,00	20,00

Ejemplos 14-19. Preparación de compuestos con gen, quitosano, protamina, pirofosfato de tiamina y composición de lípidos formadora de cristales líquidos

5 Se añadió fosfolípido, éster de ácido graso insaturado de sorbitán, un endurecedor de cristal líquido y etanol en la cantidad que se muestra en la Tabla 3 a continuación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente para obtener una solución de lípidos uniforme.

10 Se añadieron 0,15 ml de la solución de lípidos en 5 ml de solución acuosa de poloxámero 407 al 1,1 % y se homogeneizó a 20-75 °C usando un ultrasonificador o un homogeneizador (PowerGenmode1123, Fisher) a una velocidad de 1.000-3.000 RPM y se obtuvo una composición para cristales líquidos en una fase de solución.

15 Se disolvieron 20 mg de ARNip de survivina, el gen que debe suministrarse como material activo, 30 mg de HCl de quitosano que tiene un peso molecular de 150 kDa, 30 mg de pirofosfato de tiamina y 1 mg de protamina en 1 ml de agua para inyección, respectivamente. La solución mezclada de ARNip de survivina que no incluye pirofosfato de tiamina se preparó del mismo modo excepto en la etapa de disolución de pirofosfato de tiamina en 1 ml de agua para inyección.

20 La composición de cristales líquidos preparada de este modo y cada una de las soluciones acuosas preparadas a partir de la misma se añadió de acuerdo con las relaciones de peso que se muestran en la Tabla 3 a continuación para obtener un compuesto y el compuesto resultante se filtró usando un filtro de 0,22 µm. La Tabla 3 a continuación muestra las relaciones en peso de los componentes finales de las composiciones preparadas de este modo.

[Tabla 3] Los ejemplos 18 y 19 están de acuerdo con la invención.

Unidad (ug)	Ej. 14	Ej. 15	Ej. 16	Ej.17	Ej.18	Ej.19
Lipoide 5-100 ¹⁾	1,39	1,39	1,39	1,39	0,35	0,35
Monooleato de sorbitano	0,92	0,92	0,92	0,92	0,23	0,23
Polisorbato 80	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01	0,01
Acetato de tocoferol	0,18	0,18	0,18	0,18	0,05	0,05
Etanol	0,36	0,36	0,36	0,36	0,09	0,09
Poloxámero 407	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,50
ARNip de survivina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Pirofosfato de tiamina	-	-	1,00	1,00	4,00	6,00
Protamina	-	0,60	-	0,60	0,60	0,60
HCl de quitosano	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30

25 Ejemplos 20-24. Preparación de liofilización de compuestos con composición de lípidos formadora de cristales líquidos, gen, quitosano, protamina y lauril sulfato de sodio

30 Se añadió fosfolípido, éster de ácido graso insaturado de sorbitán, un endurecedor de cristal líquido y etanol en la cantidad que se muestra en la Tabla 4 a continuación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente para obtener una solución de lípidos uniforme.

35 Se añadieron 0,15 ml de la solución de lípidos en 5 ml de solución acuosa de poloxámero 407 al 1,1 % y se homogeneizó a 20-75 °C usando un ultrasonificador o un homogeneizador (PowerGenmode1123, Fisher) a una velocidad de 1.000-3.000 RPM y se obtuvo una composición para cristales líquidos en una fase de solución.

40 se mezcló ARNip de survivina y lauril sulfato de sodio en una relación de peso de 1:1 (p/p) y la mezcla se preparó a una concentración de 20 mg/ml usando agua para inyección. HCl de quitosano con un peso molecular de 150 kDa, protamina y poloxámero 407 se mezclaron en una relación de peso de 1:2:4(p/p) y se prepararon a una concentración de 8 mg/ml usando agua para inyección y, a continuación, se mezclaron con 20 mg/ml de la solución mezclada incluyendo ARNip de survivina y lauril sulfato de sodio, a una relación de volumen de 1:2,5 (v/v) y se agitó a continuación. La solución mezclada de ARNip de survivina que no incluye lauril sulfato de sodio se preparó del mismo modo que anteriormente excepto en la etapa de mezcla de lauril sulfato de sodio.

La composición de cristales líquidos preparada de este modo se añadió con la solución mezclada de ARNip de survivina de acuerdo con las relaciones de peso que se muestran en la Tabla 4 para obtener un compuesto y el compuesto resultante se filtró usando un filtro de 0,22 µm. Para liofilizar el compuesto preparado de este modo, se mezcló un excipiente preparado usando solución al 30 % con anterioridad de acuerdo con las relaciones de peso que se muestran en la Tabla 4, se congeló a -70 °C y se liofilizó para obtener un producto de fase sólida.

5

[Tabla 4]

Unidad (ug)	Ej. 20	Ej. 21	Ej. 22	Ej.23	Ej.24
Lipoide 5-100 ¹⁾	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39
Monooleato de sorbitano	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
Polisorbato 80	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Acetato de tocoferol	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Etanol	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Poloxámero 407	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20
ARNip de survivina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Lauril sulfato de sodio	-	-	1,00	1,00	1,00
Protamina	-	0,60	-	0,60	0,60
Quitosano	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Trehalosa	23,00	23,00	23,00	23,00	
Glucosa					23,00

10 Ejemplo comparativo 1. Preparación de compuesto con composición de lípidos formadora de cristales líquidos, gen, protamina y lauril sulfato de sodio

15 Para comparar la capacidad de producción de un compuesto para la inserción genética de acuerdo con su presencia/ausencia de quitosano, se prepararon y compararon compuestos para la inserción de genes sin quitosano. En particular, fosfolípido, éster de ácido graso insaturado de sorbitán, un endurecedor de cristal líquido y etanol en la cantidad que se muestra en la Tabla 5 a continuación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente para obtener una solución de lípidos uniforme.

20 Se añadieron 0,15 ml de la solución de lípidos en 5 ml de solución acuosa de poloxámero 407 al 1,1 % y se homogeneizó a 20-75 °C usando un ultrasonificador o un homogeneizador (PowerGenmode1123, Fisher) a una velocidad de 1.000-3.000 RPM y se obtuvo una composición para cristales líquidos en una fase de solución.

25 se mezcló ARNip de survivina y lauril sulfato de sodio en una relación de peso de 1:1 (p/p) y la mezcla se preparó a una concentración de 20 mg/ml usando agua para inyección. Protamina y poloxámero 407 se mezclaron en una relación de peso de 2:4(p/p) y se prepararon a una concentración de 8 mg/ml usando agua para inyección y, a continuación, se mezclaron con 20 mg/ml de la solución mezclada incluyendo ARNip de survivina y lauril sulfato de sodio, a una relación de volumen de 1:2,5 (v/v) y se agitó a continuación. La solución mezclada de ARNip de survivina que no incluye lauril sulfato de sodio se preparó del mismo modo que anteriormente excepto en la etapa de mezcla de lauril sulfato de sodio.

30 La solución de lípidos preparada de este modo se añadió con la solución mezclada de ARNip de survivina de acuerdo con las relaciones de peso que se muestran en la Tabla 5 para obtener un compuesto y el compuesto resultante se filtró usando un filtro de 0,22 µm.

[Tabla 5]

Unidad (ug)	Comp. Ej. 1
Lipoide S-100 ¹⁾	1,39
Monooleato de sorbitano	0,92
Polisorbato 80	0,05
Acetato de tocoferol	0,18
Etanol	0,36

ES 2 705 330 T3

Unidad (ug)	Comp. Ej. 1
Poloxámero 407	2,20
ARNip de survivina	1,00
Lauril sulfato de sodio	1,00
Protamina	0,60

Ejemplos comparativos 2 y 3. Preparación de compuesto con fármaco genético que consiste en gen, quitosano, pirofosfato de tiamina y protamina

- 5 Para confirmar si un compuesto para la inserción genética puede formarse en ausencia de un material que forma cristales líquidos, se fabricaron compuestos que no incluían un material que forma cristales líquidos.

10 En primer lugar, 30 mg de HCl de quitosano que tiene un peso molecular de 150 kDa, 2 mg de pirofosfato de tiamina y 0,5 mg de protamina en 1 ml de agua para inyección, respectivamente, y las soluciones acuosas preparadas de este modo se mezclaron de acuerdo con las relaciones de peso que se muestran en la Tabla 6 para obtener un compuesto.

[Tabla 6]

Unidad (ug)	Comp. Ej. 2	Comp. Ej. 3
ARNip de survivina	1,00	1,00
Pirofosfato de tiamina	17,10	17,10
Protamina		0,60
HCl de quitosano	2,90	2,90

- 15 Ejemplo comparativo 4. Preparación de compuestos entre un gen, quitosano soluble en agua, protamina, lauril sulfato de sodio y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos

20 Para confirmar si un gen incluido como material activo se suministra eficazmente para el fin previsto, se preparó un grupo comparativo que incluía oligómero de dsARN marcado con fluoresceína (dsARN FL, Invitrogen), que es un gen que no es capaz de inhibir el crecimiento tumoral, en lugar de el ARNip de survivina y se usó como grupo de control para comparar la eficacia de la inserción de genes.

25 En primer lugar, fosfolípido, éster de ácido graso insaturado de sorbitán, un endurecedor de cristal líquido y etanol en la cantidad que se muestra en la Tabla 7 a continuación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente para obtener una solución de lípidos uniforme.

Se añadieron 0,15 ml de la solución de lípidos en 5 ml de solución acuosa de poloxámero 407 al 1,1 % y se homogeneizó a 20-75 °C usando un ultrasonificador o un homogeneizador (PowerGenmode1123, Fisher) a una velocidad de 1.000-3.000 RPM y se obtuvo una composición para cristales líquidos en una fase de solución.

30 dsARN FL y lauril sulfato de sodio en una relación de peso de 1:1 (p/p) y la mezcla se preparó a una concentración de 20 mg/ml usando agua para inyección. La secuencia de nucleótidos usada para el dsARN FL fue 5'-UUG UUU UGG AGC ACG GAA A(dTdT)-3'. HCl de quitosano que tiene un peso molecular de 150 kDa, protamina y poloxámero 407 se mezclaron en una relación de peso de 1:2:4(p/p) y se prepararon a una concentración de 8 mg/ml usando agua para inyección y, a continuación, se mezclaron con 20mg/ml de la solución mezclada incluyendo ARNip de survivina y lauril sulfato de sodio, a una relación de volumen de 1:2,5 (v/v) y se agitó a continuación.

40 La solución de lípidos preparada de este modo se añadió con la solución mezclada de dsARN FL de acuerdo con la relación de peso que se muestra en la Tabla 7 para obtener un compuesto y el compuesto resultante se filtró usando un filtro de 0,22 µm.

[Tabla 7]

Unidad (ug)	Comp. Ej. 4
Lipoide S-100	1,39
Monooleato de sorbitano	0,92
Polisorbato 80	0,05
Acetato de tocoferol	0,18

ES 2 705 330 T3

Etanol	0,36
Poloxámero 407	2,20
dsARN FL	1,00
Lauril sulfato de sodio	1,00
Protamina	0,60
HCl de quitosano	0,30

Ejemplo experimental 1. Confirmación de estructuras de cristales líquidos en una fase de fluido acuoso

5 Para confirmar las estructuras de cristales líquidos formados en una fase de fluido acuoso mediante las composiciones de lípidos preparadas en los Ejemplos 1-6 usando un microscopio de polarización (Motic, BA 300 Pol), las composiciones de lípidos preparadas en los Ejemplos 1-6 se aplicaron muy finamente sobre portaobjetos de vidrio, colocados en Chalet que incluyen agua destilada triple durante 4 horas para formar cristales líquidos sobre portaobjetos de vidrio.

10 Estos portaobjetos de vidrio se cubrieron con portaobjetos de vidrio para prevenir la introducción de aire en los mismos y se observaron en un microscopio de polarización (Motic, BA 300 Pol) a un aumento de 200 veces.

Los resultados se muestran en la figura 1.

15 Como se muestra en la figura 1, las estructuras de cristales líquidos de las composiciones de lípidos preparadas en los Ejemplos 2 y 6 se confirmó que tenían la estructura típica hexagonal que puede proporcionar una estabilidad de partículas excelente.

20 Ejemplo experimental 2. Observación de compuestos con gen, quitosano, lauril sulfato de sodio, protamina y composición de lípidos formadora de cristales líquidos en un microscopio electrónico de crio-transmisión

25 Las composiciones de lípidos preparadas en los Ejemplos 2, 6 y 10 se observaron en un microscopio electrónico de crio-transmisión (Crio-TEM) (microscopio electrónico de Tecnai 12, Philips, Países Bajos) y se confirmó la formación de las composiciones compuestas de cristales líquidos para la inserción de genes. Las composiciones se colocaron sobre la parte superior de rejillas en forma de meninges finas y se liofilizaron a -170 °C. Se observaron los compuestos de las composiciones liofilizadas sobre la parte superior de las rejillas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados se muestran en la figura 2.

30 Como se muestra en la figura 2, se confirmó que las composiciones de lípidos preparadas en los Ejemplos, 2, 6 formaron los típicos cristales líquidos puesto que forman un tipo esféricamente hexagonal de una red en una fase de fluido acuoso. Adicionalmente, en el Ejemplo 10, se confirmó que la composición compuestas de cristales líquidos para la inserción de genes que consiste en un gen, quitosano soluble en agua, lauril sulfato de sodio, protamina y composición de lípidos formadora de cristales líquidos formó un tipo esférico típico de un nanocompuesto.

35 Ejemplo experimental 3. Medición de tamaño de partícula usando compuestos con un gen, quitosano, lauril sulfato de sodio, pirofosfato de tiamina, protamina en el pre-complejo, protamina y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos

40 El tamaño de partículas de las composiciones preparadas en los Ejemplos 7, 10, 12, 13, 14, 17 y 19 y Ejemplos comparativo 1 se midió usando un espectrofotómetro de dispersión de luz electroforético (ELS) de tamaño de partícula y un analizador de carga eléctrica (ELS-Z, Otsuka, Japón). El tamaño de partícula de las composiciones se midió usando una celda de tamaño de partícula según las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la figura 3.

45 Como se muestra en la figura 3, se confirmó que todas las composiciones compuestas de cristales líquidos para la inserción de genes que no incluyen selectivamente protamina en las composiciones compuestas, que incluyen un gen, quitosano soluble en agua y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos (Ejemplos 7 y 14) o las que incluyen además lauril sulfato de sodio (Ejemplos 10, 12 y 13) o pirofosfato de tiamina (Ejemplos 17 y 19) todas mostraron tener un tamaño de partícula uniforme en el intervalo de 200-300 nm. Sin embargo, las composiciones compuestas, que no incluían quitosano (Ejemplo comparativo 1) mostraron tener un tamaño de partícula no uniforme y el tamaño de partícula se volvió más grande. Por consiguiente, se confirmó que el quitosano es esencial en la formación de un compuesto que tenga un diámetro de partícula uniforme adecuado para la penetración celular.

50

Ejemplo experimental 4. Observación de efecto inhibitorio frente a expresión de proteínas diana mediante compuestos con un gen, quitosano, lauril sulfato de sodio, pirofosfato de tiamina, protamina en el pre-complejo, protamina y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos

5 Para evaluar el efecto inhibitorio frente a la expresión de proteínas diana mediante los grupos tratados con composiciones preparadas en el Ejemplos comparativo 1, los Ejemplos 7, 10, 12, 13, 14, 17 y 19, y mediante grupos
 10 tratados con un gen solo, se llevaron a cabo experimentos mediante un método descrito a continuación usando un kit Elisa de survivina (R&D systems, n.º de cat. SVE00). Se alicuotó una línea celular de cáncer de próstata humano (PC-3, ATCC) en una placa de 6 pocillos de modo que cada pocillo tenía 1×10^5 células y se incubó en un medio (pH 7,2) que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10 % a 37 °C, condición de 5 % de CO₂ durante 48 horas. Antes de la
 15 administración de un fármaco genético, se substituyó el medio con un medio (pH 7,2) que contenía FBS al 10 % fresco y, a continuación, se estabilizó durante 2 horas. Después, las composiciones preparadas en el Ejemplo comparativo 1, el Ejemplo 7, 10, 12, 13, 14, 17 y 19, y un gen solo se añadieron respectivamente a la línea celular de cáncer de próstata y se incubaron a 37 °C, condición de 5 % de CO₂ durante 48 horas. El fármaco genético administrado fue de 2 µg/pocillo. Tras completarse la incubación, se retiró el medio y se añadieron 5000 µl de tampón de lisis celular (tecnología de señalización celular) para recoger la línea celular de cáncer de próstata. Adicionalmente, el material recogido se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos para separar los restos celulares del sobrenadante. Se comparó el efecto inhibitorio frente a la expresión de proteínas diana usando 1000 µl del sobrenadante y la cantidad de expresión de proteínas de survivina contenida en la muestra de medio se midió usando el kit ELISA de survivina de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados se muestran en la figura 4.

25 Como se muestra en la figura 4, se confirmó que las composiciones compuestas de cristales líquidos para la inserción de genes que no incluyen selectivamente protamina en las composiciones compuestas, que incluyen un gen, quitosano soluble en agua y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos (Ejemplos 7 y 14) o las que incluyen además lauril sulfato de sodio (Ejemplos 10, 12 y 13) o pirofosfato de tiamina (Ejemplos 17 y 19) todas mostraron inhibir eficazmente la expresión de proteínas diana mediante una inserción de genes eficaz en las células. Por el contrario, en un compuesto tratado con un gen solo o en un compuesto en el que el quitosano está ausente (Ejemplo comparativo 1), la expresión de las proteínas diana no se inhibió en ningún caso. A partir de lo anterior, se confirmó que el quitosano catiónico resulta esencial para una inserción de genes eficaz, aunque haya protamina catiónica presente. Es decir, el quitosano juega un papel fundamental en el compuesto de acuerdo con la presente invención y la función de inserción de genes se pierde completamente en ausencia de quitosano.

35 Ejemplo experimental 5. Evaluación de seguridad en suero sanguíneo de compuestos con un gen, quitosano, lauril sulfato de sodio, pirofosfato de tiamina, protamina en el pre-complejo, protamina y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos.

40 Para que el quitosano tenga una biocompatibilidad *in vivo* como vector de inserción de genes resulta esencial asegurar su estabilidad de partículas en el suero sanguíneo, aunque el quitosano tiene el inconveniente de que provoca la precipitación en el suero sanguíneo y es, por lo tanto, incapaz de realizar la inserción de genes. Por consiguiente, para confirmar si las composiciones compuestas de cristales líquidos para la inserción de genes de la presente invención pueden formar partículas estables en el suero sanguíneo, se compararon los compuestos preparados en los Ejemplos de la presente invención con los de los Ejemplos comparativos 2 y 3, que no incluyen un material de formación de
 45 cristales líquidos.

Más específicamente, los compuestos preparados en los Ejemplos comparativos 2 y 3 y Ejemplos 10, 17, 18 y 19 se mezclaron de modo que el suero sanguíneo puede ser del 50 % y, en 3 horas, se midió el cambio en el tamaño de partículas usando un espectrofotómetro de dispersión de luz electroforético (ELS) de tamaño de partícula y un analizador de carga eléctrica (ELS-Z, Otsuka, Japón). El tamaño de partícula de las composiciones se midió respectivamente usando una celda de tamaño de partícula según las instrucciones del fabricante del ELS.

Los resultados se muestran en la figura 5.

55 Como se muestra en la figura 5, se confirmó que las composiciones compuestas de cristales líquidos para la inserción de genes que incluye selectivamente además lauril sulfato de sodio (Ejemplo 10) o pirofosfato de tiamina (Ejemplos 17, 18 y 19) en la composición compuesta que incluye un gen, quitosano soluble en agua y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos mantuvo su tamaño de partícula en el estado fabricado inicial para que sea en el intervalo de 200-300 nm incluso en el suero sanguíneo. Por el contrario, en compuestos para la inserción de genes preparados excluyendo la composición de lípidos para la formación de cristales líquidos (Ejemplos comparativos 2 y 3) las partículas eran de 1.500 nm, 1.200 nm, respectivamente, no fueron capaces de mantener la estabilidad de partícula debido a la grave aglutinación con proteínas presentes en el suero sanguíneo. Por consiguiente, se confirmó que la presente invención, mediante la constitución de una composición de lípidos formadora de cristales líquidos junto con quitosano, asegura la estabilidad de partícula en el suero sanguíneo y lleva a cabo de forma eficaz la inserción de un gen diana mientras que resuelve los problemas de la tecnología existente.

Ejemplo experimental 6. Fabricación de productos liofilizados usando compuestos con un gen, quitosano, lauril sulfato de sodio, protamina y composición de lípidos formadora de cristales líquidos y medición de tamaño de partícula de los mismos

5 Para confirmar si la composición compuesta de cristales líquidos de la presente invención puede liofilizarse para los fines de su facilidad de almacenamiento y distribución, las composiciones se liofilizaron y, a continuación, redispersaron para confirmar el tamaño de partícula.

10 Más específicamente, las composiciones preparadas en los Ejemplos 23 y 24 en las que se incluyó adicionalmente trehalosa y glucosa como sacáridos se liofilizaron y, a continuación, redispersaron con agua purificada para preparar el gen a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, y se observó el tamaño de partícula usando un espectrofotómetro de dispersión de luz electroforético (ELS) de tamaño de partícula y un analizador de carga eléctrica (ELS-Z, Otsuka, Japón). El tamaño de partícula de las composiciones se midió respectivamente usando una celda de tamaño de partícula según las instrucciones del fabricante del ELS.

15 Los resultados se muestran en la figura 6.

20 Como se muestra en la figura 6, se confirmó que las composiciones preparadas en los Ejemplos 23 y 24 fueron capaces de mantener el tamaño de partícula iniciar a aproximadamente 200 nm incluso cuando se rehidrataron después de la liofilización. Basado en lo anterior, puede mantenerse la estabilidad de partícula al nivel de antes de la liofilización incluso cuando se liofilizan las composiciones añadiendo adicionalmente un sacárido y aplicado in vivo, confirmando, de este modo, que la composición compuesta de cristales líquidos para la inserción de genes puede almacenarse de forma estable en forma de un producto liofilizado durante su almacenamiento y distribución.

25 Ejemplo experimental 7. Evaluación in vivo de efecto inhibitorio de crecimiento tumoral mediante compuestos con un gen, quitosano, lauril sulfato de sodio, protamina y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos

30 Para confirmar si el gen que está siendo insertado mediante la composición de cristales líquidos para la inserción de genes de la presente invención puede suministrarse dentro de un organismo vivo y mostrar eficazmente el fin previsto, el efecto inhibitorio de tumor mediante la composición preparada en el Ejemplo 10 que incluye ARNip de survivina como gen y la composición preparada en el Ejemplo comparativo 4 que incluye dsARN FL, que es incapaz del efecto inhibitorio de tumor, como gen. Para evaluar la capacidad de inserción *in vivo* de un fármaco genético, se usó un modelo de ratón inmunodeficiente trasplantado con cáncer de próstata. Para construir un modelo de ratón inmunodeficiente trasplantado con cáncer de próstata, se mezclaron 2×10^6 células de línea celular de cáncer de próstata redispersadas en 50 μl de medio de cultivo de RPMI con 50 μl de Matrigel (BD biosciences) y la mezcla se inyectó por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes de 5 semanas de edad. El tamaño del tumor se hizo crecer hasta el tamaño de 100 mm^3 y, a continuación, las composiciones preparadas en el Ejemplo 10 y el Ejemplo comparativo 4 para incluir la cantidad de gen a 200 $\mu\text{g/ml}$ se inyectaron respectivamente en la vena caudal de ratones. La cantidad de una única dosis de fármaco genética fue de 40 μg y se administró 6 veces durante un período de 2 semanas.

40 Los resultados se muestran en la figura 7.

45 Como se muestra en la figura 7, cuando una composición compuesta para la inserción de genes consiste en un gen, quitosano soluble en agua, lauril sulfato de sodio, protamina y una composición de lípidos formadora de cristales líquidos (Ejemplo 10) se inyectó por vía intravenosa en el modelo de ratón inmunodeficiente trasplantado con un cáncer de próstata, se observó que la proliferación *in vivo* se inhibió considerablemente. En el grupo de ratones inyectados por vía intravenosa con la composición preparada en el Ejemplo 10 de la presente invención, la tasa inhibitoria de tumor fue de aproximadamente el 63 % en el último día de la inyección (día 11) y de aproximadamente el 70 % a la semana después (día 18) respectivamente, en comparación con el grupo sin tratar. Por el contrario, en los ratones que pertenecían al grupo sin tratar y en el grupo tratado con una composición compuesta que incluía un gen no capaz de provocar la supresión tumoral (Ejemplo comparativo 4), el tumor mostró continuar creciendo sin ninguna inhibición notable. A partir de lo anterior, se confirmó que la composición compuesta para la inserción de genes de la presente invención puede suministrarse de forma eficaz mediante una inyección intravenosa *in vivo* y también el gen suministrado puede llevar a cabo de forma eficaz el efecto previsto.

55 En conclusión, se confirmó que las composiciones de la presente invención pueden mostrar un efecto de inserción de genes superior mediante una administración sistémica y también resolvieron la bioincompatibilidad del quitosano convencional como fármaco de inserción de genes debido a su resistencia de unión relativamente baja con un gen e inestabilidad en suero sanguíneo.

60 Aplicabilidad industrial

65 Las composiciones de la presente invención que incluyen quitosano y un material de formación de cristales líquidos para la inserción de genes han superado la baja resistencia de unión del quitosano con un gen y también han mejorado

considerablemente la estabilidad de un nanocompuesto de quitosano en suero sanguíneo, permitiendo una inserción de genes altamente eficaz y una estabilidad excelente, siendo útiles, de este modo, como agente terapéutico de genes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la inserción de genes que forma un cristal líquido en un fluido acuoso, que comprende:

- 5 (a) un material de formación de cristales líquidos;
- (b) un fosfolípido;
- (c) un endurecedor de cristal líquido; y
- (d) quitosano soluble en agua o sus sales,

10 en donde el material de formación de cristales líquidos es un éster de ácido graso insaturado de sorbitano que tiene al menos dos grupos hidroxilo en un grupo de cabeza polar, en donde el endurecedor de cristal líquido es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en triglicérido, palmitato de retinilo, acetato de tocoferol, colesterol, benzoato de bencilo, ubiquinona y una combinación de los mismos,

15 en donde el quitosano soluble en agua es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en HCl de quitosano, acetato de quitosano, glutamato de quitosano y lactato de quitosano, y en donde el material de formación de cristales líquidos, el fosfolípido y el endurecedor de cristales líquidos están incluidos en una relación de peso de 0,20-1 : 1-1,5 : 0,05-0,2.

20 2. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 3, en donde el éster de ácido graso insaturado de sorbitano es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en monooleato de sorbitano, monolinoleato de sorbitano, monopalmitoleato de sorbitano, monomiristoleato de sorbitano, sesquioleato de sorbitano, sesquialinoleato de sorbitano, sesquipalmitoleato de sorbitano, sesquimiristoleato de sorbitano, dioleato de sorbitano, dilinoleato de sorbitano, dipalmitoleato de sorbitano, dimiristoleato de sorbitano y una combinación de los mismos.

25 3. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 1, en donde el fosfolípido es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina y una combinación de los mismos.

30 4. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 1, en donde la composición comprende además un gen, en donde el gen es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ADN unicatenario o bicatenario, ARN unicatenario o bicatenario, ADN plasmídico, ARNip unicatenario o bicatenario, oligonucleótido antisentido, ribozima, ARN catalítico y nucleótido.

35 5. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 1, en donde la composición comprende adicionalmente un agente dispersante y en donde el agente dispersante en forma de un oligómero de igual o más de 15 unidades monoméricas o un polímero es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en poloxámero, alcohol polivinílico, succinato de polietilenglicol de D-alfa-tocoferol, polietilenglicol-gliceril monooleato, almidón hidrófobamente modificado y una combinación de los mismos.

40 6. La composición para la inserción de genes como se indica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición comprende adicionalmente pirofosfato de tiamina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 7. La composición para la inserción de genes como se indica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición comprende adicionalmente protamina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

50 8. La composición para la inserción de genes como se indica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición comprende además lauril sulfato de sodio.

9. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 1, en donde la composición forma un nanocompuesto.

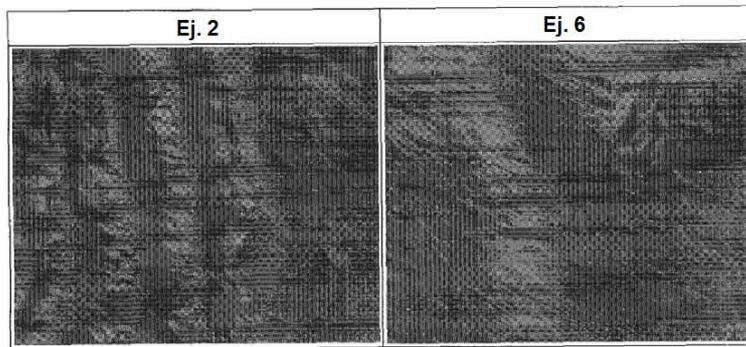
55 10. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 9, en donde el nanocompuesto está en forma de un recubrimiento de quitosano.

11. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 1, en donde la composición está en la forma de una preparación liofilizada.

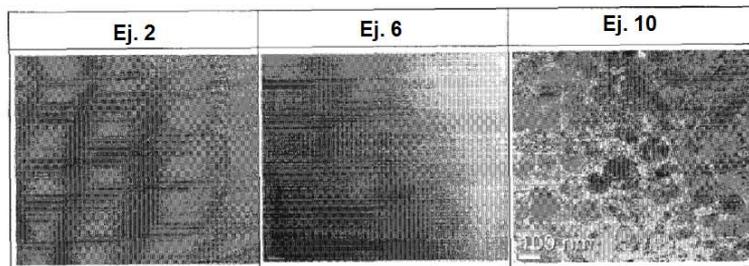
60 12. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 11, en donde la composición comprende adicionalmente (e) un excipiente para la liofilización, que es un alcohol de azúcar o un sacárido.

65 13. La composición para la inserción de genes como se indica en la reivindicación 9, en donde el nanocompuesto es una preparación para inyección.

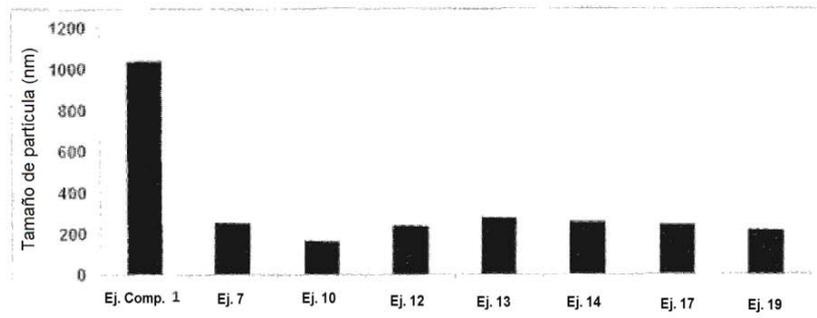
[Fig. 1]



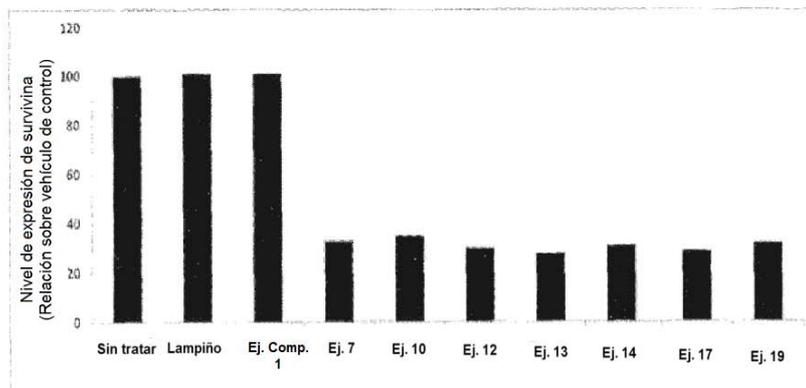
[Fig. 2]



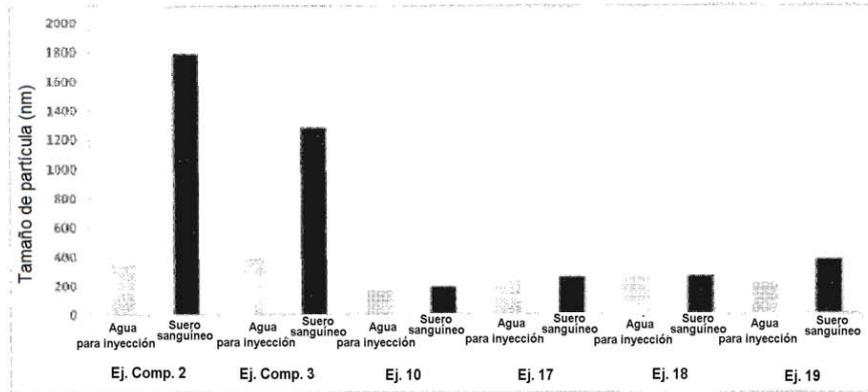
[Fig. 3]



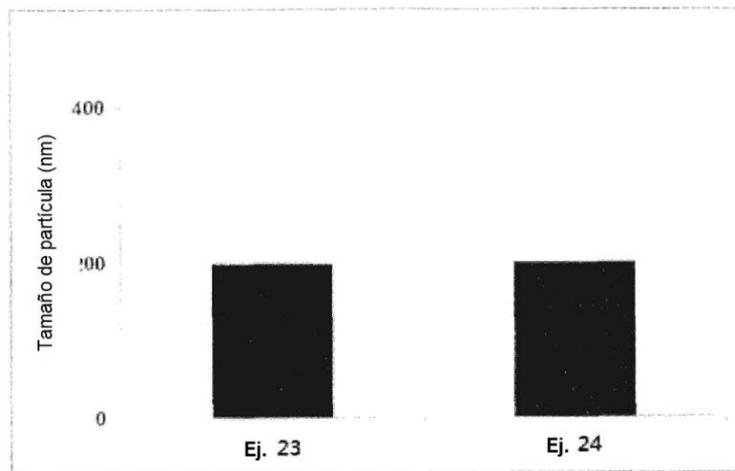
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

