

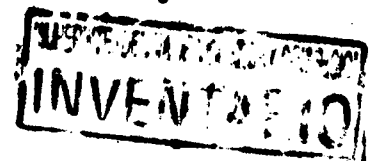


BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-120191

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ COMPOSICION DEPORTADOR DE SUMINISTRO DE ACIDO NUCLEICO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ HIROFUMI TAKEUCHI Y OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

DOMICILIO _____ GIFU-SHI, GIFU, JAPON Y CHIYODA-KU, TOKYO, JAPON RESPECT.

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-120191- -00000-0000

Fecha: 2009-10-26 16:59:27

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 93

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **HIROFUMI TAKEUCHI Y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.**Sociedades constituidas y existentes bajo
las leyes de Japón.Dirección: 7-91, Awanonishi,
Gifu-shi,
Gifu 5020006,
Japón

y

9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome,
Chiyoda-ku,
Tokyo 1018535,
Japón

Respectivamente

Domicilio: Gifu-shi,
Gifu,
Japón

y

Chiyoda-ku,
Tokyo,
Japón

Respectivamente

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Hirofumi TAKEUCHI**7-91, Awanonishi,
Gifu-shi,
Gifu 5020006,
Japón3. **Koji NAKANO**c/o GIFU PHARMACEUTICAL UNIVERSITY,
5-6-1, Mitahorahigashi,
Gifu-shi,
Gifu 5028585,
Japón2. **Yasuyuki HIRA**c/o GIFU PHARMACEUTICAL UNIVERSITY,
5-6-1, Mitahorahigashi,
Gifu-shi,
Gifu 5028585,
Japón4. **Hidekazu TOYOBUKU**c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
224-18 Ebisuno,
Hiraishi, Kawauchi-cho,
Tokushima-shi,
Tokushima 7710182,
Japón

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2008/055730 Fecha: 26 de marzo de 2008
Publicación Internacional No. WO 2008/117828 A1 Fecha: 02 de octubre de 2008

6

Título (54)

COMPOSICIÓN DE PORTADOR DE SUMINISTRO DE ÁCIDO NUCLEICO

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 031/7088 A61K 47/24
A61K 48/00

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI☒ NO☐

JP

26 de marzo de 2007

2007-079944

9

Comprobante de pago No.:

09-77,1779

Fecha:

13 de octubre de 20009

10

Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.

☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por.

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐ Poderes, si fuere el caso.

☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐ Declaraciones.

☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐ Arte final 12x12

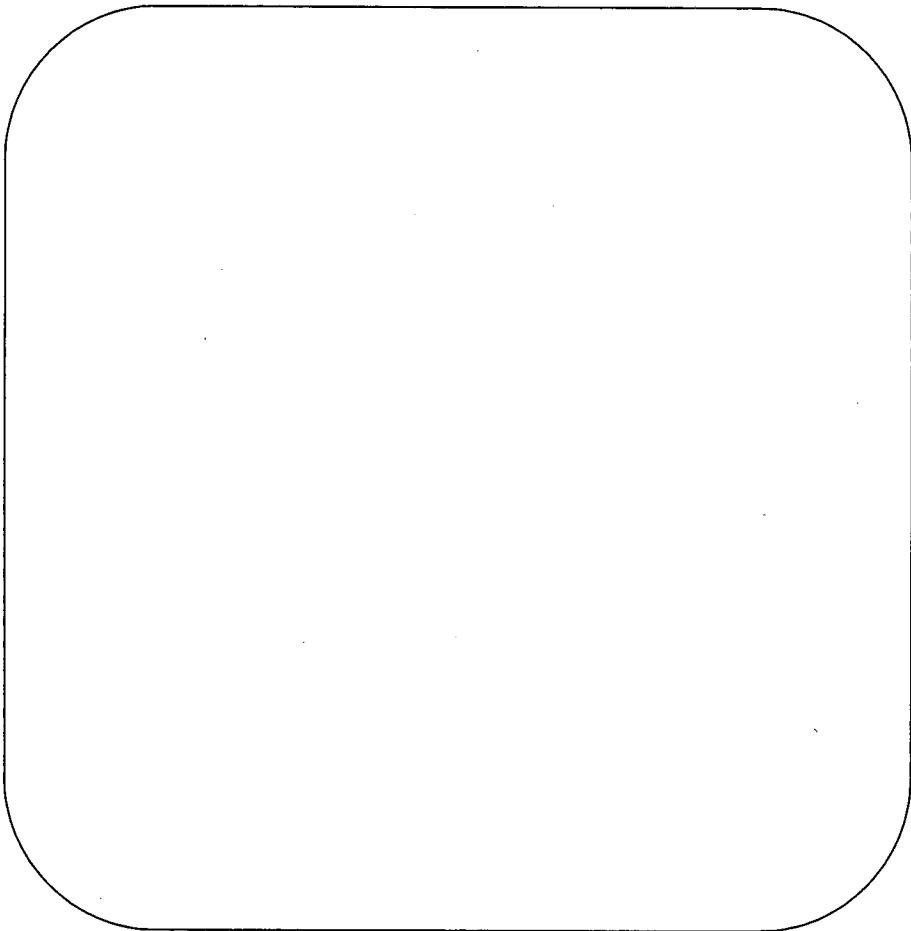
☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

3

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

FIRMA : Luz Clemencia De Páez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/117828 A1

Descripción:

Páginas 34 en el idioma original

Páginas 31 en español

Reivindicaciones: Número (s) 15

Figuras: Número (s) 4

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

on T J

CESION

ASSIGNMENT

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)	I (we), the undersigned
	1) Hirofumi TAKEUCHI
	2) Yasuyuki HIRA
	3) Koji NAKANO
	4) Hidekazu TOYOBUKU
domiciliado(s) en	of 1) 7-91, Awanonishi, Gifu-shi, Gifu 5020006, Japan
	2) 3) c/o GIFU PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, 5-6-1, Mitahorahigashi, Gifu-shi, Gifu 5028585, Japan
	4) c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 224-18, Ebisuno, Hiraishi, Kawaguchi-cho, Tokushima-shi, Tokushima 7710182, Japan
declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención:	state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:
	PROMPT NUCLEIC ACID DELIVERY CARRIER COMPOSITION
declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin limitación, a favor de la sociedad	state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of 1) Hirofumi TAKEUCHI
	2) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
constituida y existente de conformidad con las leyes de	a corporation constituted and existing in conformity with the laws of
	2) Japan
domiciliada en	domiciled in
	1) 7-91, Awanonishi, Gifu-shi, Gifu 5020006, Japan
	2) 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan
todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.	all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this 31st of August, 2009
en/in Japan

por/by 1) Hirofumi TAKEUCHI, 2) Yasuyuki HIRA
3) Koji NAKANO and 4) Hidekazu TOYOBUKU

Firma/Signature

Hirofumi Takeuchi
1) Hirofumi TAKEUCHI

Yasuyuki Hira
2) Yasuyuki HIRA

Koji Nakano
3) Koji NAKANO

Hidekazu Toyobuku
4) Hidekazu TOYOBUKU

登簿平成 21 年第 528 号

竹内 洋文 平 安幸

中野 浩士 豊福 秀一

上記の者は代理人三枝 英二により当公証
人の面前でこの証書の署名を自認した。——

よってこれを認証する。——

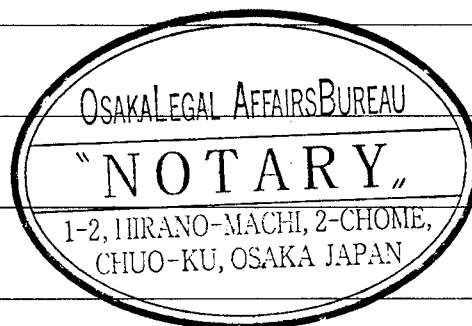
平成 21 年 9 月 8 日当公証人役場において

大阪府中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号(沢の鶴ビル内)

大阪法務局所属

公証人

三枝 英二

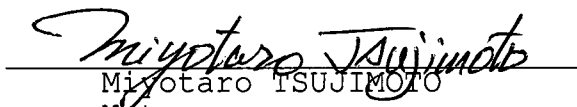


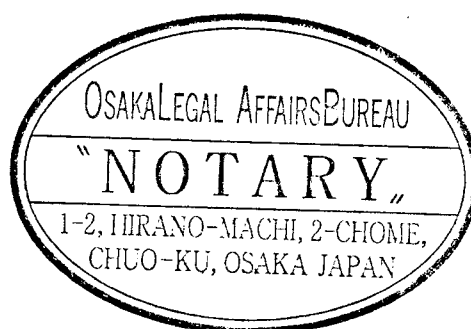
7
Registration No. 528 -2009

CERTIFICATE

I, the undersigned, hereby certify that Eiji SAEGUSA, a proxy for Hirofumi TAKEUCHI, Yasuyuki HIRA, Koji NAKANO and Hidekazu TOYOBUKU, i.e. the inventors and assignors, has stated in my very presence that said Hirofumi TAKEUCHI, Yasuyuki HIRA, Koji NAKANO and Hidekazu TOYOBUKU acknowledged themselves to have signed to the ASSIGNMENT.

Dated on this 8th day of September, 2009


Miyotaro TSUJIMOTO
Notary
Osaka Legal Affairs Bureau
1-2, Hirano-Machi, 2-Chome
Chuo-ku, Osaka Japan



8

総 第 4064 号

証 明

大阪法務局所属公証人

辻本 三代太郎

平成21年9月8日付

平成21年 登簿 第 528 号

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

For legalization by the foreign consul in Japan,
this is to certify that the Seal affixed hereto
is genuine.

Osaka, SEP. 9 2009

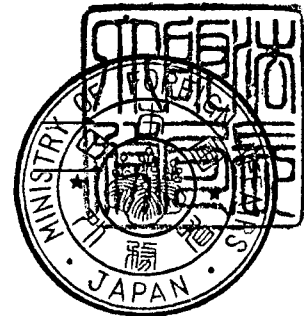
M. Kawahito

Official
Ministry of Foreign Affairs
(Consular Service Division)

平成21年9月9日

平成 年 月 日

大阪法務局長 白石 研



CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official Seal appearing on the same is genuine.

Date SEP. - 9. 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2009 SEP 24 A 10:34

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

738041

BOGOTÁ D.C.
DOCUMENTO RESERVA
LAS FUNCIONES INCORPORADAS

EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

Tokio, Japón, SEPTIEMBRE 11, 2009

No. 222

El encargado de las funciones consulares de Colombia

CERTIFICA:

Que el (la) Señor(a) NORIKO KAWAHITO, quien autoriza el presente documento, es la persona legalmente facultada para representar en la fecha señalada al (a la) MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPON y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son las que usa y acostumbra para sus actos oficiales.

El Encargado de Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Firma del Encargado de Funciones Consulares

JOSÉ FRANCISCO RÍAZ VILLOA

Segundo Secretario

Encargado de Funciones Consulares

Derechos: US\$30.00

TRADUCCION OFICIAL NO.783/2009

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES. LLEVA LA FIRMA Y EL SELLO DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL POR RESOLUCION NO. 3618 DEL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA, DE FECHA 6 SEPTIEMBRE DE 1972

CESION

Nosotros abajo firmantes

- 1) HIROFUMI TAKEUCHI
- 2) YASUYUKI HIRA
- 3) KOJI NAKANO
- 4) HIDEKAZU TOYOBUKU

Domiciliados en

- 1) 7-91 AWANONISHI, GIFU-SHI, GIFU 502006 JAPÓN
- 2) 3) C(O GIFU PHARMACEUTICAL UNIVERSTY 5-6-1 MITAHORAHIGASHI
GIFU-SHI GIFU 5025585 JAPÓN
- 4) C/O OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. LTD. 224-18 EBISUNO, HIRAISHI
KAWAUCHI-CHA TOKUSHIMA-SHI 7710182 JAPÓN

Declaramos bajo juramento ser los únicos inventores de la invención

**“COMPUESTO DEL PORTADOR PARA REPARTO EFICIENTE DEL
ACIDO NUCLÉICO”**

Declaramos así mismo que cedemos y transferimos sin limitación a favor de la sociedad es:

- 1) HIROFUMI TAKEUCHI
- 2) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

Constituidas bajo las leyes de Japón, domiciliadas en:

- 1) 7-91 AWANANISHI, GIFU-SHI 502006, JAPÓN
- 2) 9 KANDA-TSIKASAMACHI 2-CHOME, CHIYODA-KU TOKIO 1018535
JAPÓN

Todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

Dado y firmado: hoy 31 de Agosto de 2009 en Japón



10

TRADUCCION OFICIAL NO.783/2009

FIRMADO: HIROFUMI TAKEUCHI,

FIRMADO: YASUYUKI HIRA

FIRMADO: KOJI NAKANO

FIRMADO: HIDEKAZU TOYOBUKU

REGISTRO NO. 528 – 2009

CERTIFICACION

EL suscrito Notario por medio del presente certifica que **EIJI SAEGUSA**, Apoderado de **HIROFUMI TAKEUCHI, YASUYUKI HIRA, KOJI NAKANO, HIDEKAZU TOYOBUKU**, es decir los inventores y cedentes, han declarado en mi presencia que los mencionados **HIROFUMI TAKEUCHI, YASUYUKI HIRA, KOJI NAKANO, HIDEKAZU TOYOBUKU** reconocieron haber firmado la anterior cesión.

Fechado este día 8 de Septiembre de 2009

FIRMADO: MIYOTARO TSUJIMOTO, NOTARIO ADJUNTO DE LA OFICINA DE ASUNTOS LEGALES DE OSAKA.

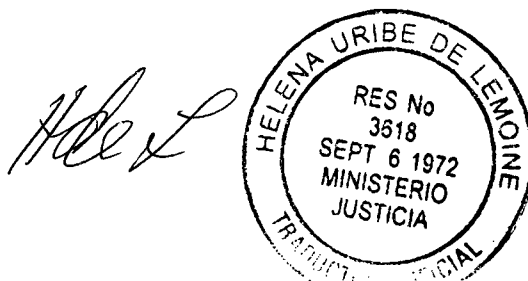
1-2 HIRANO MACHI, 2-CHOME - CJHUO-KU OSAKA, JAPON

CERTIFICACION

Por medio de la presente Certifico que el Certificado Notarial Anexo ha sido ejecutado por el Notario Público debidamente autorizado y quien ejerce en Osaka, Japón y que el Sello Oficial que aparece en el mismo es genuino.

Fecha: 9 de Septiembre de 2009.

FIRMADO: ILEGIBLE, DIRECTOR DE LA OFICINA DE ASUNTOS LEGALES DE OSAKA.



11

TRADUCCION OFICIAL NO.783/2009

LEGALIZACION

Visto para legalización por parte del Cónsul extranjero en Japón

Por medio del presente certificamos que el sello puesto en el presente documento es genuino.

Osaka, 9 de Septiembre de 2009

FIRMADO: KAWAHITO, FUNCIONARIO, MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

DIVISION DEL SERVICIO CONSULAR.

HAY SELLO.

SIGUE AUTENTICACION EFECTUADA POR LA EMBAJADA DE COLOMBIA EN TOKIO JAPON, DE LA FIRMA DEL SEÑOR NORIKO KAWAHITO, FUNCIONARIO DEL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE JAPÓN BAJO EL NO. 222 DEL 11 DE SEPTIEMBRE DE 2009.

FIRMADO: JOSE FRANCISCO DIAZ ULLOA, SEGUNDO SECRETARIO, ENCARGADO DE FUNCIONES CONSULARES.

SIGUE AUTENTICACION DE LA FIRMA JOSE FRANCISCO DIAZ EFECTUADA POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES EN BOGOTÁ BAJO EL NO. 138041 DEL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009.

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年10月2日 (02.10.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/117828 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7088 (2006.01) A61K 47/24 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/28 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)

田洞東 5-6-1 岐阜薬科大学内 Gifu (JP). 豊福 秀一 (TOYOBUKU, Hidekazu) [JP/JP]; 〒7710182 徳島県徳島市川内町平石夷野 2 2 4-1 8 大塚製薬株式会社内 Tokushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/055730

(74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2008年3月26日 (26.03.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2007-079944 2007年3月26日 (26.03.2007) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018535 東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 竹内 洋文 (TAKEUCHI, Hirofumi) [JP/JP]; 〒5020006 岐阜県岐阜市栗野西 7-9 1 Gifu (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平安幸 (HIRA, Yasuyuki) [JP/JP]; 〒5028585 岐阜県岐阜市三田洞東 5-6-1 岐阜薬科大学内 Gifu (JP). 中野 浩士 (NAKANO, Koji) [JP/JP]; 〒5028585 岐阜県岐阜市三

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: PROMPT NUCLEIC ACID DELIVERY CARRIER COMPOSITION

(54) 発明の名称: 即効型核酸送達用キャリアー組成物

(57) Abstract: Disclosed is a nucleic acid delivery carrier which can deliver a nucleic acid (e.g., siRNA) into a cell with high efficiency when the nucleic acid is administered to an animal-derived cell or an animal body, and which is less toxic and highly safe. Also disclosed is a nucleic acid delivery composition comprising the carrier and a nucleic acid. The nucleic acid delivery carrier comprises a combination of (A) diacylphosphatidyl choline, (B) at least one member selected from the group consisting of cholesterol and a derivative thereof, and (C) an aliphatic primary amine. A nucleic acid delivery composition can be prepared by mixing the nucleic acid delivery carrier with a nucleic acid.

(57) 要約: 本発明の目的は、siRNA等の核酸を動物由来細胞又は動物に投与した場合に、核酸を効率的に細胞内へ送達させることができ、しかも低毒性で安全性が高い核酸送達用キャリアー、及び該キャリアーと核酸を含有する核酸送達用組成物を提供することである。(A)ジアシルホスファチジルコリン、(B)コレステロール及びその誘導体よりなる群から選択される少なくとも1種、及び(C)脂肪族第1級アミンを組み合わせて配合して核酸送達用キャリアーを調製する。また、当該核酸送達用キャリアーと核酸を混合して、核酸送達用組成物を調製する。

WO 2008/117828 A1

-1-

DESCRIPTION

PROMPT NUCLEIC ACID DELIVERY CARRIER COMPOSITION

TECHNICAL FIELD

5 The present invention relates to a carrier composition for nucleic acid delivery which can efficiently deliver a nucleic acid into cells when a nucleic acid is administered to animal-derived cells or organisms, and which also has low toxicity and high safety; and to a composition for nucleic acid delivery.

10

BACKGROUND ART

 Various types of nucleic acids which exert physiologically active functions within cells have been discovered through recent developments in biotechnology. For example, it is known that small
15 interfering RNA (siRNA) induces degradation of mRNA of a target gene existing within cells and inhibits expression of the target gene (RNA interference). The inhibitory function against target gene expression due to the RNA interference is useful for mitigation or treatment of disease symptoms caused by irregular expression of
20 particular genes or gene groups, and development of therapeutic agents using siRNA is expected. To utilize nucleic acids including siRNA as therapeutic agents, it is important that siRNA functions in the target cell, and therefore, it is essential to establish efficient techniques to deliver the nucleic acids into target cells.

Use of a carrier (vector) is known as a technique to deliver exogenous nucleic acid molecules or genes into cells. Vectors include virus vectors and nonvirus vectors. Virus vectors have high gene transfer efficiency; however, there are various unknown safety aspects including pathogenicity, immunogenicity and cytotoxicity. Therefore, development of safer nonvirus vectors is awaited.

As a nonvirus nucleic acid delivery carrier that promotes delivery of a nucleic acid, such as siRNA, into cells, for example, a cationic lipid with a specific structure has been reported in Patent Document 1. However, the cationic lipid reported in Patent Document 1 has a disadvantage that it shows toxicity when administered to cultured cells or living organisms. Also, Patent Document 2 discloses a composition containing an amphiphilic compound and a polycation as a carrier composition which has comparatively low toxicity and can deliver siRNA into cells. However, the composition reported in Patent Document 2 also has a safety problem since its cytotoxicity becomes non-negligible when a sufficient amount of siRNA is introduced into cells.

In light of the prior art, development of a carrier composition for nucleic acid delivery which has low toxicity and can efficiently deliver a nucleic acid, such as siRNA, into cells has been desired.

[Patent Document 1] Japanese Unexamined Patent Publication No. 2002-529439

[Patent Document 2] Japanese Unexamined Patent Publication No.

2005-508394

DISCLOSURE OF THE INVENTION

Technical Problem

5 Thus, an object of the present invention is to solve the above problems of the prior art. Specifically, an object of the present invention is to provide a carrier composition for nucleic acid delivery, which can efficiently deliver nucleic acid into cells when a nucleic acid such as siRNA is administered to animal-derived cells or animals, and also has low toxicity and high safety; and a composition for nucleic acid delivery containing the carrier composition and nucleic acid. Also, an another object of the present invention is to provide a method for introducing a nucleic acid into cells, which can efficiently deliver the nucleic acid into cells with high safety.

15

Means for Solving the Problem

 The present inventors have intensively studied so as to achieve the above object and found that a composition containing (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) cholesterol and/or a derivative thereof and (C) an aliphatic primary amine has low toxicity and high safety, can efficiently deliver a nucleic acid into cells, and is therefore useful as a carrier for nucleic acid delivery. They have also found that it is possible to impart more excellent safety and nucleic acid-introducing properties by using a composition containing

the components (A) to (C) after forming into a liposomal form. The present invention has been completed by making further improvement based on these findings.

Namely, the present invention provides the following
5 embodiments.

Item 1. A carrier composition for nucleic acid delivery, comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) at least one member selected from the group consisting of cholesterol and derivatives thereof, and (C) an aliphatic primary amine.

10 Item 2. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Item 1, wherein the component (A) is a diacylphosphatidylcholine whose acyl group moiety has 4 to 23 carbon atoms.

Item 3. The carrier composition for nucleic acid
15 delivery according to Item 1 or 2, wherein the component (B) is cholesterol.

Item 4. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Item 1, wherein the component (C) is an alkylamine having 10 to 20 carbon atoms.

20 Item 5. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Item 1,

wherein the component (A) is at least one member selecting from the group consisting of dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, and distearoylphosphatidylcholine; the component (B) is cholesterol; and

5 the component (C) is stearylamine.

Item 6. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Item 1, wherein the molar ratio of component (A):component (B):component (C) is 5-9:1-5:1.

Item 7. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Item 1, which is a carrier for delivery of siRNA.

10

Item 8. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Item 1, which is a liposome preparation in which a liposomal membrane is formed of the components (A) to (C).

Item 9. A composition for nucleic acid delivery, comprising a nucleic acid, and the carrier composition for nucleic acid delivery of Item 1.

15

Item 10. The composition for nucleic acid delivery according to Item 9, wherein the nucleic acid is siRNA.

Item 11. The composition for nucleic acid delivery according to Item 9, which is a liposome preparation.

20

Item 12. A method for introducing a nucleic acid, which comprises the step of introducing the nucleic acid into cells by

bringing the composition for nucleic acid delivery of Item 9 into contact with the cells.

Item 13. A method for introducing a nucleic acid according to Item 12, wherein the cells are cultured cells, cells separated from
5 living organisms, or cells existing in living organisms.

Item 14. Use of a composition comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) at least one member selected from the group consisting of cholesterol and derivatives thereof, and (C) an aliphatic primary amine, in the manufacture of a carrier for nucleic
10 acid delivery.

Item 15. Use according to Item 14, wherein the carrier is used for delivery of siRNA.

EFFECTS OF THE INVENTION

15 The carrier composition for nucleic acid delivery and the composition for nucleic acid delivery of the invention have an advantage that they can effectively deliver a nucleic acid into cells thereby exerting a useful function of the nucleic acid in cells, and also has low toxicity and high safety. Therefore, the carrier
20 composition for nucleic acid delivery and the composition for nucleic acid delivery are useful for treatment of various diseases by introduction of a nucleic acid, particularly treatment of intractable diseases which are difficult to be treated by a low molecular compound.

The carrier composition for nucleic acid delivery and the composition for nucleic acid delivery of the invention are particularly preferred to introduce siRNA into cells since induction of interferon expression, which is an adverse reaction of siRNA, can be effectively suppressed.

Furthermore, the composition for nucleic acid delivery of the invention also has an advantage that the composition can be stored in a freeze-dried state since it can be subjected to a freeze-drying treatment.

10

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows the results of Test Example 1, i.e., the results of the evaluation of a composition for nucleic acid delivery on safety for cells.

15

Fig. 2 shows the results of the evaluation of siRNA introduction into cells mediated by each composition for nucleic acid delivery in Test Example 2. The ordinate in Fig. 2 indicates the average fluorescence intensity per one cell.

Fig. 3 shows the results of the evaluation of siRNA introduction into cells when the concentration of the constituent lipids (DSPC, cholesterol and stearylamine) of the carrier for nucleic acid delivery is changed in a composition for nucleic acid delivery in Test Example 2.

20

Fig. 4 shows the evaluation results of the inhibition of interferon induction by a siRNA-containing composition for nucleic acid delivery in Test Example 3.

5 BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The present invention will now be described in detail.

Carrier for Nucleic Acid Delivery

The carrier composition for nucleic acid delivery of the invention comprises (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) cholesterol
10 and/or a derivative thereof, and (C) an aliphatic primary amine.

The carrier composition for nucleic acid delivery of the invention is used as a nucleic acid carrier for delivery (introduction) of a nucleic acid into cells.

The type and structure of the nucleic acid to which the carrier
15 composition for nucleic acid delivery of the present invention is applied is not limited as long as it is required to be delivered into cells. Specific examples of such nucleic acids include siRNA, mRNA, tRNA, rRNA, cDNA, miRNA (microRNA), ribozyme, antisense
oligodeoxynucleotide, decoy oligonucleotide, plasmid DNA, peptide
20 nucleic acid, triplex forming oligonucleotide (TFO), aptamer, and genes. Particularly, the carrier composition for nucleic acid delivery of the invention has the useful feature of inhibiting induction of interferon expression, which is an adverse reaction of

siRNA, and thus it is useful to deliver siRNA into cells. Nucleic acids to which the carrier composition for nucleic acid delivery of the invention is applied may be derived from humans, animals, plants, bacteria and viruses, and also, it may be produced by chemical synthesis.

5 In addition, these nucleic acids can be single, double or triple strand, and the molecular weight thereof is not specifically limited. Also, nucleic acids can be modified with chemical compounds, enzymes or peptides. In the invention, these nucleic acids may be used alone, or two or more kinds of them may be used in combination.

10 Diacylphosphatidylcholine (hereinafter, referred sometimes to as "component (A)") used in the carrier composition for nucleic acid delivery of the invention is not specifically limited as long as it is pharmacologically acceptable, and examples thereof include a diacylphosphatidylcholine whose acyl group moiety has 4 to 23 carbon
15 atoms. The number of carbon atoms of two acyl groups constituting the diacylphosphatidylcholine may be the same or different.

Specific examples of the diacylphosphatidylcholine used in the present invention include dilauroylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine,
20 distearoylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylcholine, dilinoleoylphosphatidylcholine, myristoylpalmitoylphosphatidylcholine, myristoylstearoylphosphatidylcholine,

-10-

palmitoylstearylphosphatidylcholine,
dibutyloylphosphatidylcholine, dihexanoylphosphatidylcholine,
diheptanoylphosphatidylcholine, didecanoylphosphatidylcholine,
diphthanoylphosphatidylcholine, didodecylphosphatidylcholine,
5 dieicosenoylphosphatidylcholine, dihenicosanoylphosphatidylcholine,
dierucoylphosphatidylcholine, diarachidonoylphosphatidylcholine,
and bis(tricosadinoyl)phosphatidylcholine. Of these
diacylphosphatidylcholines, a diacylphosphatidylcholine whose acyl
group moiety has 12 to 18 carbon atoms is preferable; a
10 diacylphosphatidylcholine whose acyl group moiety has 13 to 17 carbon
atoms, such as dimyristoylphosphatidylcholine,
dipalmitoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine,
myristoylpalmitoylphosphatidylcholine,
myristoylstearylphosphatidylcholine, and
15 palmitoylstearylphosphatidylcholine is more preferable;
dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine,
and distearoylphosphatidylcholine are particularly preferable; and
distearoylphosphatidylcholine is most preferable. These
diacylphosphatidylcholines may be used alone, or two or more kinds
20 of them may be used in combination.

Cholesterol and/or a derivative thereof (hereinafter referred
sometimes to as "component (B)") used in the carrier composition for
nucleic acid delivery of the present invention is not specifically

limited as long as it is pharmacologically acceptable. The derivative of cholesterol is a cationic lipid having a cholesterol skeleton, and specific examples thereof include

- 3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol (DC-Chol),
5 3 β -[N',N',N'-trimethylaminoethane]cholesterol iodide (TC-Chol),
bis(guanidium)-tren-cholesterose (BGTC),
N-cholesteryloxycarbonyl-3,7-diazanonan-1,9-diamine,
 β -alanine-diethanolamine-cholesterol, N⁴-spermine cholesteryl
carbamate (GL-67), N[N⁴-3-aminopropylspermidine]cholesteryl
10 carbamate (GL-78), N⁴-spermine cholesteryl carboxamide (GL-90),
N¹,N⁸-bis(arginine carboxamide)-N⁴-spermidine cholesteryl carbamate,
and N-[N¹,N⁴,N⁸-tris(3-aminopropyl)spermidine]cholesteryl carbamate
(GL-96). In the invention, the component (B) is preferably
cholesterol. In the invention, as the component (B), cholesterol and
15 derivative thereof may be used alone, or two or more kinds of them
may be used in combination.

The aliphatic primary amine (hereinafter referred sometimes to as "component (C)") used in the carrier composition for nucleic acid delivery of the invention is not specifically limited as long
20 as it is pharmacologically acceptable, and examples thereof include an alkylamine whose alkyl group moiety has 10 to 20 carbon atoms.

Specific examples of the aliphatic primary amine used in the present invention include laurylamine, myristylamine, palmitylamine,

stearylamine, oleylamine, decanoylamine, and phthanoylamine. Of these aliphatic primary amines, an alkylamine whose alkyl group moiety has 12 to 18 carbon atoms is preferable; stearylamine, oleylamine and palmitoylamine are more preferable; and stearylamine is particularly preferable. These dialiphatic primary amines may be used alone, or two or more kinds of them may be used in combination.

The carrier composition for nucleic acid delivery of the present invention may contain a combination of the components (A) to (C). In view of further enhancing efficiency of delivery of nucleic acid into cells and low toxicity by employing the following combinations, a combination of (A) a diacylphosphatidylcholine whose acyl group moiety have 4 to 23 carbon atoms, (B) cholesterol and/or a derivative thereof, and (C) an alkylamine having 10 to 20 carbon atoms is preferable and a combination of (A) dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine and/or distearoylphosphatidylcholine, (B) cholesterol, and (C) stearylamine is more preferable.

In the carrier composition for nucleic acid delivery of the present invention, the ratio of the components (A) to (C) is not specifically limited. For example, the molar ratio component (A):component (B):component (C) is 5-9:1-5:1, preferably 6-9:1-4:1, and more preferably 7-8:2-3:1. Efficiency of delivery of a nucleic

acid into cells and low toxicity can be further enhanced by satisfying the molar ratio.

The total amount of the components (A) to (C) based on the total amount of the carrier composition for nucleic acid delivery of the present invention is, for example, from 1 to 100% by weight, preferably from 20 to 90% by weight, and more preferably from 30 to 70% by weight.

The carrier composition for nucleic acid delivery of the present invention may contain, in addition to the components (A) to (C), other cationic lipids. Specific examples of the cationic lipid include

10 cationic lipids bonded with a steroid, such as squalamine, 3a,7a,12a-tris(3-aminopropoxy)-5 β -cholan-24-(N,N-bis(3-aminopropyl)amine, 3a,7a,12a-tris(3-aminopropoxy)-5 β -cholan-24-(N-(N-(3-aminopropyl)-3-aminopropyl)-amine),

15 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxy)-5 β -cholan-24-(N,N-bis(2-cyanoethyl)amine), and 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxy)-5 β -cholan-24-(N-(benzyloxycarbonyl)-N-(3-hydroxypropyl)-amine)); cationic lipids bonded with cholic acid, such as umbrella-spermine conjugates; cationic lipids bonded

20 with sterolglycoside; cationic lipids bonded with steroidsaponin; and quaternary ammonium salt-type cationic lipids such as dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB), 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammoniumpropane,

- 1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane (DOTAP),
1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropanemethyl sulfate,
1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane,
1,2-distearoyl-3-trimethylammoniumpropane,
5 N-(1-(2,3-bis(oleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium
hydrochloride (DOTMA),
dimyristoyloxypropyldimethylhydroxyethylammonium bromide (DMRIE),
dioleoyloxypropyldimethylhydroxyethylammonium bromide (DORIE),
dimethyldidodecylammonium bromide,
10 N-(a-trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamine hydrochloride,
N-(a-trimethylammonioacetyl)-O,O'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl
) -L-glutamine hydrochloride,
O,O'-didodecanoyl-N-(a-trimethylammonioacetyl) diethanolamine
hydrochloride, methylallyldidodecylammonium bromide,
15 N-{p-(w-trimethylammoniobutyloxy)-benzoyl}-didodecyl-L-glutamine
hydrochloride,
9-(w-trimethylammoniobutyl)-3,6-bis(dodecanoyl) carbazole bromide,
dimethyldioctadecylammonium hydrochloride,
N-w-trimethylammoniodecanoyl-dihexadecyl-D-glutamine bromide,
20 N-{p-(w-trimethylammoniohexyloxy)-benzoyl}-ditetradecyl-L-glutami
ne bromide, p-(w-trimethylammoniodecyloxy)-p'-octyloxyazobenzene
bromide (MC-1-0810),
p-{w-(b-hydroxyethyl)dimethyl-ammonio-decyloxy}-p'-octyloxyazoben

zene bromide (MC-3-0810),

O,O',O''-tridodecanoyl-N-(w-trimethyl-ammonidecanoyl)-tris(hydroxymethyl)aminomethane bromide(TC-1-12),

1,2-dilauryl-glycero-3-ethylphosphocholine,

5 1,2-dimyristoyl-glycero-3-ethylphosphocholine,

1,2-dipalmitoyl-glycero-3-ethylphosphocholine,

1,2-distearoyl-glycero-3-ethylphosphocholine,

1,2-dioleoyl-glycero-3-ethylphosphocholine, and

1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-ethylphosphocholine.

10 In the invention, when cationic lipids other than the components (A) to (C) are contained, the proportion of the cationic lipid is not specifically limited as long as the effects of the invention are not adversely affected. The proportion of the cationic lipid is from 1 to 10 parts by weight, preferably from 2 to 8 parts by weight, and
15 more preferably from 4 to 6 parts by weight, per 100 parts by weight of the total amount of the components (A) to (C).

Furthermore, the carrier composition for nucleic acid delivery of the invention may contain an oily base, if necessary. By including an oily base and using its characteristics, it becomes possible to
20 control the efficiency of the nucleic acid to be introduced by the carrier composition for delivery. For example, adjustment of the specific gravity of the carrier composition for nucleic acid delivery by including the oily base controls contact between the nucleic acid

and the carrier composition for nucleic acid delivery and allows improvement of introduction efficiency *in vitro*. In addition, for example, by including a compound with a temperature-sensitive function as the oily base, fluctuation on a cell surface can be induced due to core disruption of a nucleic acid carrier composition under a given temperature condition, thereby improvement of introduction efficiency of nucleic acid become possible. Furthermore, for example, by including a compound with an external stimulation disruption property as the oily base, fluctuation on the cell surface can be induced due to core disruption of a nucleic acid carrier composition caused by external stimulation, thereby improvement of introduction efficiency of the nucleic acid become possible.

Examples of the oily base included in the carrier composition for nucleic acid delivery of the present invention include perfluorocarbon, perfluoropentane, perfluorooctyl bromide, perfluorohexane, perfluorotributylamine, soybean oil, refined soybean oil, hardened soybean oil, unsaponified soybean oil, squalene, castor oil, clove oil, sorbitan trioleate, turpentine oil, safflower oil, safflower oil fatty acid, oleic acid, coconut oil, rapeseed oil, fusel oil, olive oil, linseed oil, sesame oil, chlorophyll oil, croton oil, bergamot oil, cedar oil, orange oil, fennel oil, eucalyptus oil, corn oil, lavender oil, sweet majoram oil, lemon oil, cotton seed oil, egg yolk oil, rose oil, pine oil, almond oil, peanut oil, camellia

oil, white camphor oil, chamomile oil, cinnamon oil, peppermint oil, esterified corn oil, bread oil, Anthemis nobilis oil, snake oil, spearmint oil, sunflower oil, cacao butter, wheat germ oil, zinc oxide oil, hardened oil, hydrogenated vegetable oil, light liquid paraffin, liquid paraffin, medium chain fatty acid triglyceride, mink oil, orange peel oil, polyoxyethylene castor oil, polyoxyethylene hardened castor oil, polyoxyethylene hardened castor oil 10, polyoxyethylene hardened castor oil 100, polyoxyethylene hardened castor oil 20, polyoxyethylene hardened castor oil 40, polyoxyethylene hardened castor oil 5, polyoxyethylene hardened castor oil 50, polyoxyethylene hardened castor oil 60, polyoxyl 35 castor oil, and process oil. Of these oily bases, perfluoropentane has temperature sensitivity and also has characteristics that it is volatilized at 29.5°C. Also, perfluorohexane, perfluorooctyl bromide and perfluorotributylamine have an external stimulation disruption property and have characteristics that cavitation is generated on the core of the carrier composition through external stimulation such as stimulation caused by irradiation with ultrasound, thereby causing core disruption.

When the carrier composition for nucleic acid delivery contains the oily base, the proportion of the oily base is not specifically limited as long as the effects of the invention are not adversely affected. The proportion of the oily base is from 0.1 to 50 parts by weight, preferably from 1 to 30 parts by weight, and more preferably

from 5 to 20 parts by weight, per 100 parts by weight of the total amount of the components (A) to (C).

Furthermore, the carrier composition for nucleic acid delivery of the invention may contain a membrane-fusogenic lipid (helper lipid), if necessary. It becomes possible to further enhance efficiency of delivery of the nucleic acid into cells by containing such membrane-fusogenic lipid. Examples of the membrane-fusogenic lipid include dioleoylphosphatidylethanolamine, dioleoylphosphatidylcholine, transphosphatidylphosphatidylethanolamine, 1,2-bis(10,12-tricosadinoyl)-phosphoethanolamine, 1,2-dielaidoylphosphoethanolamine, 1,2-dihexadecylphosphoethanolamine, 1,2-dihexanoylphosphoethanolamine, 1,2-dilauroylphosphoethanolamine, 1,2-dilinoleoylphosphoethanolamine, 1,2-dimyristoylphosphoethanolamine, 1,2-dioleoylphosphoethanolamine, 1,2-dipalmitooleylphosphoethanolamine, 1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine, 1,2-diphytanoylphosphoethanolamine, 1,2-distearoylphosphoethanolamine, 1-palmitoyl-2-oleoylphosphoethanolamine,

- 1-palmitoyl-2-(10,12-tricosadinoyl)phosphoethanolamine,
1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-caproylamine,
1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-caproylamine,
1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N,N-dimethyl,
5 1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N,N-dimethyl,
1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-dodecanoyl,
1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-dodecanoyl,
1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-dodecanylamine,
1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-dodecanylamine,
10 1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-glutaryl,
1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-glutaryl,
1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-lactose,
1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-[4(p-maleimidemethyl)cyclohexan
e-carboxylate],
15 dipalmitoylphosphoethanolamine-N-[4(p-maleimidemethyl)cyclohexan
e-carboxylate],
1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-[4(p-maleimidephenyl)butyram
ide],
1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-[4(p-maleimidephenyl)butyrate],
20 1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-methyl,
dipalmitoylphosphoethanolamine-N-methyl,
1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-[3-(2-pyridyldithio)propionate],
1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-[3-(2-pyridyldithio)propiona

tel], 1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-(succinyl), and
1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-(succinyl). Of these
membrane-fusogenic lipids, dioleoylphosphatidylethanolamine is
preferably used in the carrier composition for nucleic acid delivery
5 of the invention.

When the carrier composition for nucleic acid delivery contains
the membrane-fusogenic lipid, the proportion of the
membrane-fusogenic lipid is not specifically limited as long as the
effects of the invention are not adversely affected. The proportion
10 of the membrane-fusogenic lipid is from 1 to 500 parts by weight,
preferably from 10 to 250 parts by weight, and more preferably from
25 to 100 parts by weight, based on 100 parts by weight of the total
amount of the components (A) to (C).

The carrier composition for nucleic acid delivery of the
15 invention can contain various additives such as isotonizing agents,
excipients, diluents, thickeners, stabilizers, buffers, and
preservatives; and aqueous vehicles such as purified water, an aqueous
saccharide solution, a buffer solution, a physiological saline, an
aqueous polymer solution, and RNase free water, according to its form.
20 The amounts of the additives and aqueous vehicles can be appropriately
set according to the form of the carrier for nucleic acid delivery.

The form of carrier composition for nucleic acid delivery of
the invention is not specifically limited as long as it can include

the target nucleic acid to be delivered into cells, and the composition is preferably in the form of a liposome.

When the carrier composition for nucleic acid delivery of the invention is liposomal form, the components (A) to (C) and other lipids, which are optionally added, form a liposomal membrane. When the liposome is formed, it may be small unilamellar vesicles (SUV), large unilamellar vesicles (LUV), or multilamellar vesicles (MLV). Moreover, the particle diameter can be appropriately set according to the kind of cells to be delivered, for example, the particle diameter is 20 to 100 nm for SUV, 200 to 1,000 nm for LUV, and 400 to 3,500 nm for MLV. The particle diameter is determined using a dynamic light scattering method.

Production of the liposome and adjustment of its particle diameter are implemented according to methods which are common knowledge of one skilled in the art. More specifically, the liposome can be formed using an oil phase containing the components (A) to (C) and a water phase (aqueous vehicle) by a thin film method, a reverse-phase evaporation method, an ether infusion method, a surfactant method, and a heating method. Furthermore, the particle diameter can be adjusted by an extrusion method, a French press method, and a homogenization method.

The carrier composition for nucleic acid delivery of the invention is prepared by mixing the components (A) and (B) and, if

necessary, other components, and appropriately forming the mixture into a preparation according to desired form.

Composition for Nucleic Acid Delivery

5 The composition for nucleic acid delivery of the invention contains the carrier composition for nucleic acid delivery and nucleic acid. Thus, the composition for nucleic acid delivery is used for introducing the nucleic acid contained in the composition into cells, which become the delivery target.

10 When the carrier composition for nucleic acid delivery is liposomal form, in the composition for nucleic acid delivery, the nucleic acid may exist in a state included in the aqueous phase of the liposome, or a state bound to the inside or outside of a liposomal membrane through an ionic or hydrophobic bond. In addition, if the
15 carrier composition for nucleic acid delivery is not liposomal form, in the composition for nucleic acid delivery, it is only necessary to form a complex of the nucleic acid with components of the carrier composition for nucleic acid delivery through an ionic or hydrophobic bond.

20 The composition for nucleic acid delivery of the invention is prepared by mixing the carrier composition for nucleic acid delivery and nucleic acid, and forming the mixture into a desired form, or

produced by mixing the nucleic acid and components of the carrier compositions for nucleic acid delivery in any order.

In the composition for nucleic acid delivery of the present invention, the mixing ratio of the nucleic acid and the carrier composition for nucleic acid delivery varies depending on the kind of nucleic acid, the carrier composition for nucleic acid delivery used, and the kind of cells of the delivery target. The proportion of nucleic acid is from 1.0×10^{-5} to 1.0 parts by weight, preferably from 1.0×10^{-4} to 1.0×10^{-1} parts by weight, and more preferably from 1.0×10^{-3} to 1.0×10^{-2} parts, per 100 parts by weight of the total amount of the components (A) to (C) contained in the carrier composition for nucleic acid delivery.

Also, the total amount of the components (A) to (C) contained in the composition for nucleic acid delivery is from 10 to 90% by weight, preferably from 30 to 80% by weight, and more preferably from 40 to 60% by weight, based on the total amount of the composition.

The carrier composition for nucleic acid delivery of the invention can contain various additives such as isotonizing agents, excipients, diluents, thickeners, stabilizers, buffering agent, and preservatives; and aqueous vehicles such as purified water, an aqueous saccharide solution, a buffer, a physiological saline, according to its form. The amounts of the additives and aqueous vehicles can be

appropriately set according to the form of the carrier for nucleic acid delivery.

In the invention, examples of the cells to which the nucleic acid is delivered include cultured cells, cells separated from living organisms (including established cell lines), and cells existing in living organisms such as human.

The form of the composition for nucleic acid delivery of the invention is not specifically limited as long as a proper amount of the composition for nucleic acid delivery is applied so as to be brought into contact with target cells into which the nucleic acid is introduced. When the nucleic acid is delivered into cells existing in living organisms such as human, examples of the application include direct infusion into tissue; intravenous, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, digestive organic, and endodontic injections; inhalation administration to the nasal cavity, mouth cavity and lungs; oral administration; percutaneous administration through the skin; and mucosal administration through the oral mucous membrane, vaginal mucous membrane, ocular mucous membrane, rectal mucous membrane, and uterine mucous membrane. Alternatively, when the nucleic acid is delivered into cells separated from living organisms and cultured cells, a method of culturing cells in the presence of an appropriate amount of the composition for nucleic acid delivery added in advance of incubation is exemplified. In addition, when the

nucleic acid is delivered into cells separated from living organisms or cultured cells, the nucleic acid can also be delivered into cells even in the presence of serum.

Amount of the composition for nucleic acid delivery of the invention applied to the delivery target cells is determined according to the kind of nucleic acid used, the kind of carrier composition for nucleic acid delivery used, and the kind of target cells. For example, when the delivery target are cells in human, therapeutically effective amount of the composition for nucleic acid delivery of the invention is administer to the patient of whom the therapeutic gain is expected by administering the nucleic acid.

EXAMPLES

The invention will now be described in detail based on Examples and the like, but the invention is not limited thereto. In the following Examples, distearoylphosphatidylcholine is abbreviated to "DSPC", dipalmitoylphosphatidylcholine is abbreviated to "DPPC", and dimyristoylphosphatidylcholine is abbreviated to "DMPC". In the following Test Examples 1 and 2, GL3-siRNA (siRNA to firefly luciferase; Dharmacon Co., Boulder, CO, USA; sense: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT, antisense: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT) was used as siRNA. In Test Example 3, Human MMP-9-siRNA (Samchully

Pharm. Co., Ltd, Korea; Sense 5'-CCAACUAUGACCAGGAUAAdTdT-3',
antisense: 5'-UUAUCCUGGUCAUAGUUGGdTdT-3') was used as siRNA.

Example 1

5 Preparation of DSPC-containing Carrier Composition for Nucleic Acid Delivery

DSPC, cholesterol and stearylamine were weighed in a molar ratio of 7:3:1 and then dissolved in chloroform using a recovery flask. The solution was dried under reduced pressure using a rotary evaporator
10 to form a lipid thin-membrane. After DEPC-treated water (manufactured by Ambion Co.; RNase free water) was added to the solution in such a manner that its DSPC concentration became 30 mg/mL, the particle diameter of the resulting solution was adjusted by passing through a membrane having a pore diameter of 100 nm using an extruder to prepare
15 a carrier composition for nucleic acid delivery in a cationic liposomal form.

Example 2

20 Preparation of DPPC-Containing Carrier Composition for Delivery of Nucleic Acid

In the same manner as in Example 1, except that DPPC was used in place of DSPC, a carrier composition for nucleic acid delivery in a cationic liposomal form was prepared.

Example 3

Preparation of DMPC-Containing Carrier Composition for Delivery of Nucleic Acid

- 5 In the same manner as in Example 1, except that DMPC was used in place of DSPC, a carrier composition for nucleic acid delivery in a cationic liposomal form was prepared.

Example 4

- 10 Preparation of DSPC-containing Carrier Composition for Delivery of Nucleic Acid

A solution containing siRNA in a 2 μ M concentration (siRNA solution) was prepared using a solution prepared by diluting 20 $\times$ Tris-EDTA (TE) buffer (manufactured by Invitrogen Co.) 20 times with DEPC-treated water (manufactured by Ambion Co., Rnasefree water).
15 Then, an equal amount of the carrier composition for nucleic acid delivery of Example 1 and the siRNA solution were mixed to form a lipoplex (complex), thus obtaining a composition for nucleic acid delivery.

20

Example 5

Preparation of DPPC-containing Carrier Composition for Delivery of Nucleic Acid

A solution containing siRNA in a 2 μ M concentration (siRNA solution) was prepared using a solution prepared by diluting 20 $\times$ Tris-EDTA (TE) buffer (manufactured by Invitrogen Co.) 20 times with DEPC-treated water (manufactured by Ambion Co., RNasefree water).

5 Then, an equal amount of the carrier composition for nucleic acid delivery of Example 2 and the siRNA solution were mixed to form a lipoplex (complex), thus obtaining a composition for nucleic acid delivery.

10 Example 6

Preparation of DMPC-Containing Carrier Composition for Delivery of Nucleic acid

A solution containing siRNA in a 2 μ M concentration (siRNA solution) was prepared using a solution prepared by diluting 20 $\times$ Tris-EDTA (TE) buffer (manufactured by Invitrogen Co.) 20 times with DEPC-treated water (manufactured by Ambion Co., RNasefree water).
15 Then, an equal amount of the carrier composition for nucleic acid delivery of Example 3 and the siRNA solution were mixed to form a lipoplex (complex), thus obtaining a composition for nucleic acid
20 delivery.

Test Example 1 Test for Evaluation of Safety for Cells

The evaluation was performed using a MTS assay. A CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay manufactured by Promega Co. was used for the MTS assay. Specifically, A594 cells (ATCC, USA) were inoculated at 3.16×10^4 cells/well into 200 μ l of Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) containing 10 vol% fetal bovine serum (FBS) in a 96-well plate, and incubated at 37°C for 24 hours. After rinsing with Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) 3 times, the medium was changed to DMEM without FBS, then 20 μ l of each of the compositions for nucleic acid delivery of Examples 4 to 6 were added to each well and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 4 hours. Next, the culture supernatant in the wells was changed to DMEM with 10 vol% of FBS and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 20 hours again. 20 μ l of a MTS (Methanethiosulfonate) reagent and 100 μ l of a DMEM medium with 10 vol% FBS were added to each well, incubated for 2 hours, followed by determination of absorbance at 492 nm and further calculation of cell viability. The cell viability was calculated by setting the absorbance at 492 nm determined without adding the composition for nucleic acid delivery which was incubated under the above conditions as 100%.

The results are shown in Fig. 1. As shown in Fig. 1, it became apparent that all compositions for nucleic acid delivery of Examples 4 to 6 have low cytotoxicity and high safety. Particularly, it was confirmed that safety was significantly high in the compositions for

nucleic acid delivery using DSPC or DPPC as the diacylphosphatidylcholine (Example 4 or 5).

Test Example 2 Test for Evaluation of siRNA Delivery Efficiency into

5 Cells

Intracellular introduction of siRNA was evaluated by measuring fluorescence intensity of FITC-labeled siRNA using flow cytometry. In this test, a composition for nucleic acid delivery prepared with FITC pre-labeled siRNA was used. Specifically, A594 cells (ATCC, USA) 10 were inoculated at 5×10^5 cells/well into 500 μ l of DMEM with 10 vol% FBS in a 24-well plate, and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 24 hours. After rinsing three times with HBSS, the medium was changed to DMEM containing no FBS, and then 0.05 ml of each of the compositions for nucleic acid delivery of Examples 4 to 6 were added to each well and 15 incubated at 37°C under 5% CO₂ for 4 hours. Next, the culture supernatant in the wells was changed to DMEM with 10 vol% of FBS and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 20 hours again. Each well was rinsed with HBSS once and 0.2 mL of CellScrubBuffer (Gene Therapy Systems, Inc.) was added, followed by incubation at 37°C under 5% CO₂ for 15 20 minutes. Again, the wells were rinsed with HBSS 2 times and cells attached on the well bottom were detached using trypsin and collected by centrifugation, and then the resulting cells were suspended in HBSS. The suspension was filtered through a membrane having a pore diameter

of 41 μ m. Fluorescence intensity of cells was measured using flow cytometry at 2 hours and 24 hours after the addition of the compositions for nucleic acid delivery. As a control, fluorescence intensity of a control composition for nucleic acid delivery obtained by mixing
5 a solution of Lipofectamine 2000TM (Invitrogen) often used as a commercially-available gene vector diluted with OptiMEM media to 0.1 mg/mL and siRNA solution diluted with TE buffer at a concentration of 2 μ M in a volume ratio of 1:1 was also measured in the same manner as described above.

10 The results are shown in Fig. 2. From these results, it was confirmed that siRNA is incorporated into cells in any case of compositions for nucleic acid delivery of Examples 4 to 6. Particularly, in the compositions for nucleic acid delivery using DSPC or DMPC as the diacylphosphatidylcholine (Examples 4 and 6), it became
15 apparent that introduction of siRNA 2 hours after addition was significantly high as compared with LipofectamineTM 2000 often used as a commercially-available gene vector and that the compositions have favorable characteristics in excellent fast-acting.

 Furthermore, a carrier for nucleic acid delivery having a DSPC
20 concentration of 7.5 to 30 mg/mL was produced according to the same manner as in Example 1, using DSPC, cholesterol, and stearylamine (DSPC:cholesterol:stearylamine = 7:3:1 in a molar ratio, hereinafter, collectively referred to as a "constituent lipid of the carrier for

nucleic acid delivery"). A lipoplex (complex) was formed by mixing an equal amount of this carrier for nucleic acid delivery and TE buffer containing 200 nM siRNA, and the composition for nucleic acid delivery were prepared. Using the composition for nucleic acid delivery prepared in this manner, introduction of siRNA into cells was evaluated in the same manner as described above. The results are shown in Fig. 3. From these results, when the concentration of the constituent lipid of the carrier for nucleic acid delivery was changed, the amount of nucleic acid introduced into cells mediated by the composition for nucleic acid delivery was changed accordingly. Also, it was found that the constituent lipid of the carrier for nucleic acid delivery shows a low value in the introduced siRNA amount at 24 hours after addition as compared with 2 hours after addition at any concentration, and that disappearance of siRNA started at 24 hours after addition. Therefore, the results also revealed that it is possible to deliver siRNA into cells within a short time of 2 hours after addition by using the combination of DSPC, cholesterol, and stearylamine as the carrier for nucleic acid delivery, and that the compositions have favorable characteristics in excellent fast-acting.

20

Test Example 3 Test for Evaluation of Inhibition of Interferon Induction

A594 cells (ATCC, USA) were inoculated at 5×10^5 cells/well into 500 μ l of DMEM with 10 vol% FBS in a 24-well plate, and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 24 hours. After rinsing three times with HBSS, a 450 μ l of DMEM medium containing no FBS was added into each well, moreover, 50 μ l of the composition for nucleic acid delivery of Example 4 was added into each well and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 4 hours. Next, the culture supernatant in the wells was changed to DMEM with 10 vol% of FBS and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 20 hours again. After rinsing three times with HBSS, cells attached on the well bottom were detached using trypsin and collected by centrifugation. RNA was extracted from the resulting cells using Rneasy Plus Mini (Qiagen), and then cDNA was obtained by transcription using QutantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Using the resulting cDNA, QutantiTectPrimer Assay (Qiagen), and iCycler iQ (Bio-RAD), mRNA of IFIT-1, which is an interferon-inducing gene, was quantified with real-time PCR. As a control, mRNA of IFIT-1 was quantified in a control composition for nucleic acid delivery obtained by mixing a solution of Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) often used as a commercially-available gene vector diluted with OptiMEM media to 0.1 mg/mL and the siRNA solution diluted with TE buffer at concentration of 2 μ M in a volume ratio of 1:1 in the same manner as described above. As a housekeeping gene to correct the quantification, 18rRNA was used. Also, as a blank, mRNA of IFIT-1 was quantified with the above

conditions without the addition of the composition for nucleic acid delivery.

The results are shown in Fig. 4. The composition for nucleic acid delivery of Example 4 using DSPC indicated significantly low
5 induction of interferon as compared with the control composition for nucleic acid delivery using LipofectTM amine 2000. The results revealed that it is possible to inhibit induction of interferon, which is an adverse effect of siRNA, using the composition for nucleic acid delivery of the present invention.

CLAIMS

1. A carrier composition for nucleic acid delivery, comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) at least one member selected from the group consisting of cholesterol and derivatives thereof, and (C) an aliphatic primary amine.

2. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Claim 1, wherein the component (A) is a diacylphosphatidylcholine whose acyl group moiety has 4 to 23 carbon atoms.

3. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Claim 1 or 2, wherein the component (B) is cholesterol.

4. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Claim 1, wherein the component (C) is an alkylamine having 10 to 20 carbon atoms.

5. The carrier composition for nucleic acid delivery according to Claim 1, wherein the component (A) is at least one member selecting from the group consisting of dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, and distearoylphosphatidylcholine;

the component (B) is cholesterol; and
the component (C) is stearylamine.

6. The carrier composition for nucleic acid delivery
5 according to Claim 1, wherein the molar ratio of component
(A):component (B):component (C) is 5-9:1-5:1.

7. The carrier composition for nucleic acid delivery
according to Claim 1, which is a carrier for delivery of siRNA.
10

8. The carrier composition for nucleic acid delivery
according to Claim 1, which is a liposome preparation in which a
liposomal membrane is formed of the components (A) to (C).

9. A composition for nucleic acid delivery, comprising a
15 nucleic acid, and the carrier composition for nucleic acid delivery
of Claim 1.

10. The composition for nucleic acid delivery according to
20 Claim 9, wherein the nucleic acid is siRNA.

11. The composition for nucleic acid delivery according to
Claim 9, which is a liposome preparation.

12. A method for introducing a nucleic acid, which comprises the step of introducing the nucleic acid into cells by bringing the composition for nucleic acid delivery of Claim 9 into contact with
5 the cells.

13. A method for introducing a nucleic acid according to Claim 12, wherein the cells are cultured cells, cells separated from living organisms, or cells existing in living organisms.
10

14. Use of a composition comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) at least one member selected from the group consisting of cholesterol and derivatives thereof, and (C) an aliphatic primary amine, in the manufacture of a carrier for nucleic
15 acid delivery.

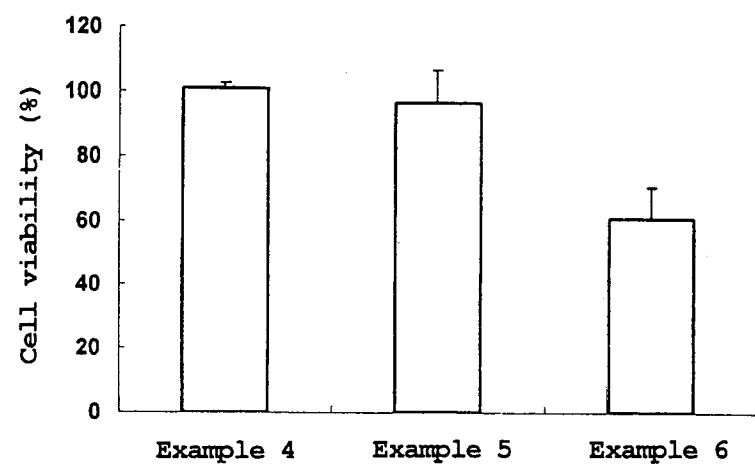
15. Use according to Claim 14, wherein the carrier is used for delivery of siRNA.

ABSTRACT

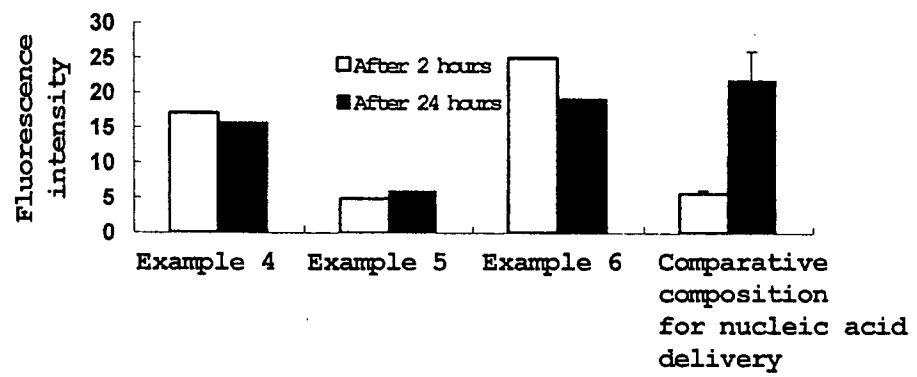
An object of the present invention is to provide a carrier composition for nucleic acid delivery, which can efficiently deliver a nucleic acid into cells when a nucleic acid such as siRNA is
5 administered to animal-derived cells or animals, and also has low toxicity and high safety, and a composition for nucleic acid delivery containing the carrier composition and nucleic acid.

A carrier for nucleic acid delivery is prepared by using (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) at least one member selected from
10 the group consisting of cholesterol and derivatives thereof, and (C) an aliphatic primary amine. Also, a composition for nucleic acid delivery is prepared by mixing the carrier for nucleic acid delivery with a nucleic acid.

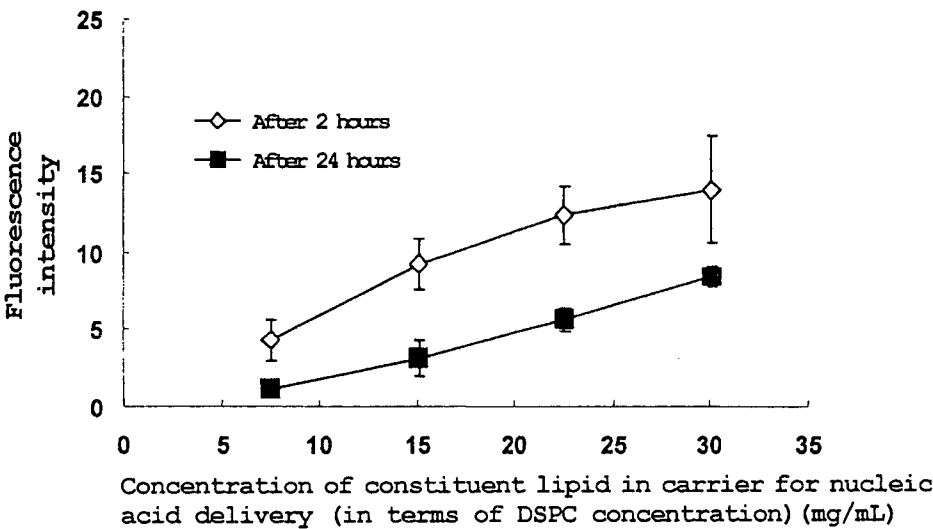
[Fig. 1]



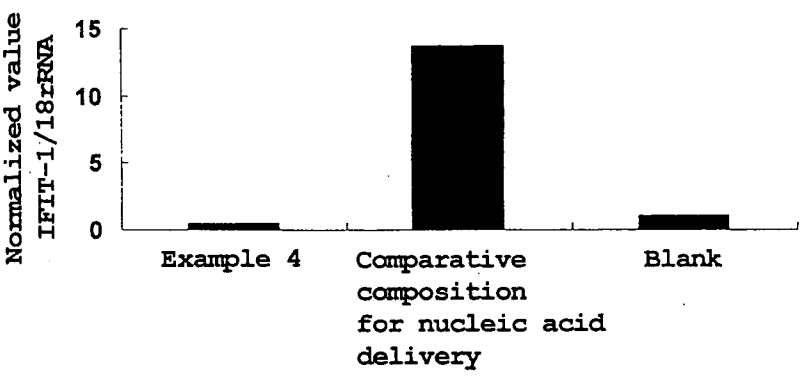
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN DE PORTADOR DE SUMINISTRO DE ÁCIDO NUCLEICO

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona con una composición de portador para el suministro de ácido nucleico que puede suministrar eficientemente un ácido nucleico en las células cuando se administra un ácido nucleico a células u organismos derivados de animal, y que también tiene baja toxicidad y alta seguridad; y con una composición para el suministro del ácido nucleico.

TÉCNICA ANTECEDENTE

15 Se han descubierto varios tipos de ácidos nucleicos que ejercen funciones fisiológicamente activas dentro de las células por medio de recientes desarrollos en biotecnología. Por ejemplo, se sabe que el ARN de interferencia pequeña (siARN) induce la degradación de mARN de un gen objetivo que existe dentro de las células e inhibe la expresión del gen objetivo (interferencia de ARN). Se espera
20 que la función inhibidora contra la expresión del gen objetivo debida a la interferencia de ARN sea útil para la mitigación o tratamiento de síntomas de enfermedad originados por expresión irregular de genes particulares o grupos de genes y el desarrollo de agentes terapéuticos utilizando siARN. Para utilizar ácidos nucleicos que incluyen siARN como agentes terapéuticos, es importante que el
25 siARN funcione en la célula objetivo, y por lo tanto, es esencial establecer técnicas eficientes para suministrar los ácidos nucleicos en las células objetivo.

Se conoce el uso de un portador (vector) como una técnica para suministrar moléculas o genes de ácido nucleico exógeno en las células. Los vectores incluyen vectores víricos y vectores no víricos. Los vectores víricos tienen alta eficiencia de la transferencia de gen; sin embargo, existen varios aspectos de seguridad no conocidos que incluyen patogenicidad, inmunogenicidad y citotoxicidad. Por lo tanto, se espera el desarrollo de vectores no víricos más seguros.

Se ha reportado en el Documento de Patente 1 un portador de suministro de ácido nucleico no vírico que promueve el suministro de un ácido nucleico, tal como siARN, en las células, por ejemplo, un lípido catiónico con una estructura específica. Sin embargo, el lípido catiónico reportado en el Documento de Patente 1 tiene una desventaja que muestra toxicidad cuando se administra a células cultivadas u organismos vivos. También, el Documento de Patente 2 describe una composición que contiene un compuesto amfifílico y un polícatión como una composición de portador que tiene comparativamente baja toxicidad y puede suministrar siARN en las células. Sin embargo, la composición reportada en el Documento de Patente 2 también tiene un problema de seguridad ya que su citotoxicidad no llega a ser insignificante cuando se introduce una cantidad suficiente de siARN en las células.

A la luz de la técnica antecedente, se ha deseado el desarrollo de una composición de portador para el suministro de ácido nucleico que tiene baja toxicidad y puede suministrar eficientemente un ácido nucleico, tal como siARN, en las células.

[Documento de Patente 1] Solicitud de Patente No Examinada Japonesa
No. 2002-529439

[Documento de Patente 2] Solicitud de Patente No Examinada Japonesa No.
5 2005-508394

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Problema Técnico

10 Así, un objeto de la presente invención es resolver los anteriores problemas de la técnica antecedente. Específicamente, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de portador para el suministro de ácido nucleico, que puede suministrar eficientemente ácido nucleico a las células cuando un ácido
15 nucleico tal como siARN se administra a células derivadas de animal o animales, y también tiene baja toxicidad y alta seguridad; y una composición para el suministro de ácido nucleico que contiene la composición de portador y ácido nucleico. También, otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para introducir un ácido nucleico en las células, que puede suministrar eficientemente el
20 ácido nucleico en las células con alta seguridad.

Medios para Resolver el Problema

25 Los presentes inventores han estudiado intensamente de qué manera lograr el anterior objetivo y encontrar que una composición que contenga (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado de los mismos y (C) una amina primaria alifática que tenga baja toxicidad y alta seguridad, que pueda suministrar

eficientemente un ácido nucleico en las células, y sea por lo tanto útil como un portador para suministro de ácido nucleico. Ellos también han encontrado que es posible impartir propiedades de seguridad más excelentes y de introducción de ácido nucleico al utilizar una composición que contenga los componentes (A) a (C) después de que se constituye en una forma liposómica. Se ha completado la presente invención al hacer la mejora adicional basada en estos hallazgos.

A saber, la presente invención proporciona las siguientes modalidades.

10 Ítem 1. Una composición de portador para el suministro de ácido nucleico, que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática.

15 Ítem 2. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del Ítem 1, en donde el componente (A) es una diacilfosfatidilcolina cuyo grupo funcional acilo tiene 4 a 23 átomos de carbono.

20 Ítem 3. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del Ítem 1 o 2, en donde el componente (B) es colesterol.

Ítem 4. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del Ítem 1, en donde el componente (C) es una alquilamina que tiene 10 a 20 átomos de carbono.

25

Ítem 5. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del Ítem 1,

en donde el componente (A) es por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y diestearoilfosfatidilcolina;

5

el componente (B) es colesterol; y

el componente (C) es estearilamina.

10 Ítem 6. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del Ítem 1, en donde la relación molar del componente (A):componente (B):componente (C) es 5-9:1-5:1.

15 Ítem 7. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del Ítem 1, que es un portador para suministro de siARN.

Ítem 8. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del Ítem 1, que es una preparación de liposoma en la que una membrana liposómica se forma de los componentes (A) a (C).

20

Ítem 9. Una composición para suministro de ácido nucleico, que comprende un ácido nucleico, y la composición de portador para suministro de ácido nucleico del Ítem 1.

25 Ítem 10. La composición para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del Ítem 9, en donde el ácido nucleico es siARN.

Ítem 11. La composición para suministro de ácido nucleico de acuerdo con del
Ítem 9, que es una preparación de liposoma.

Ítem 12. Un método para introducir un ácido nucleico, que comprende la etapa
de introducir el ácido nucleico en las células al poner en contacto la composición
para suministro de ácido nucleico del Ítem 9 con las células.

Ítem 13. Un método para introducir un ácido nucleico de acuerdo con del Ítem
12, en donde las células son células cultivadas, células separadas de los
organismos vivos, o células que existen en los organismos vivos.

Ítem 14. Uso de una composición que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina,
(B) por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de colesterol y
derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática, en la fabricación de un
portador para suministro de ácido nucleico.

Ítem 15. Uso de acuerdo con del Ítem 14, en donde el portador se utiliza para
suministro de siARN.

EFFECTOS DE LA INVENCION

La composición de portador para suministro de ácido nucleico y la
composición para suministro de ácido nucleico de la invención tienen una ventaja
ya que ellas pueden suministrar efectivamente un ácido nucleico en las células
ejerciendo por lo tanto una función útil del ácido nucleico en las células, y también
tiene baja toxicidad y alta seguridad. Por lo tanto, la composición de portador para
suministro de ácido nucleico y la composición para suministro de ácido nucleico

son útiles para el tratamiento de varias enfermedades mediante la introducción de un ácido nucleico, particularmente tratamiento de enfermedades no tratables que son difíciles de tratar mediante un compuesto molecular bajo.

5 La composición de portador para suministro de ácido nucleico y la composición para suministro de ácido nucleico de la invención se prefieren particularmente para introducir siARN en las células debido a que la inducción de expresión de interferón, que es una reacción adversa del siARN, se puede suprimir efectivamente.

10

Adicionalmente, la composición para suministro de ácido nucleico de la invención también tiene una ventaja de que la composición se puede almacenar en un estado seco-congelado ya que ésta se puede someter a un tratamiento de secado por congelamiento.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20

La Figura 1 muestra los resultados del Ejemplo de Prueba 1, es decir, los resultados de la evaluación de una composición para el suministro de ácido nucleico en forma segura para las células.

25

La Figura 2 muestra los resultados de la evaluación de introducción de siARN en las células mediadas por cada composición para suministro de ácido nucleico en el Ejemplo de Prueba 2. La coordenada en la Figura 2 indica la intensidad de fluorescencia promedio por célula.

La Figura 3 muestra los resultados de la evaluación de introducción de siARN en las células cuando la concentración de los lípidos constituyentes (DSPC, colesterol y estearilamina) del portador para suministro de ácido nucleico se cambia en una composición para suministro de ácido nucleico en el Ejemplo de Prueba 2.

La Figura 4 muestra los resultados de la evaluación de la inducción de inhibición de interferón mediante una composición que contiene siARN para suministro de ácido nucleico en el Ejemplo de Prueba 3.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención se describirá ahora en detalle.

Portador para Suministro de Ácido Nucleico

La composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado de los mismos, y (C) una amina primaria alifática.

La composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención se utiliza como un portador de ácido nucleico para suministro (introducción) de un ácido nucleico en las células.

El tipo y la estructura del ácido nucleico al que la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la presente invención se aplica no se limitan mientras que se requiera ser suministrada a las células. Ejemplos específicos de

tales ácidos nucleicos incluyen siARN, mARN, tARN, rARN, cADN, miARN (microARN), ribozima, oligodesoxinucleótido anticodificante, oligonucleótido señuelo, ADN de plásmido, ácido nucleico de péptido, oligonucleótido de formación triple (TFO), aptámero, y genes. Particularmente, la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención tiene la característica útil de inhibir la inducción de expresión de interferón, que es una reacción adversa del siARN, y así es útil para suministrar siARN en las células. Los ácidos nucleicos a los que se aplica la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención se pueden derivar de humanos, animales, plantas, bacterias y virus, y también, se pueden producir mediante síntesis química. Adicionalmente, estos ácidos nucleicos pueden ser mono, bi o tricatenarios, y el peso molecular del mismo no se limita específicamente. También, los ácidos nucleicos se pueden modificar con compuestos químicos, enzimas o péptidos. En la invención, se pueden utilizar estos ácidos nucleicos solos, o se pueden utilizar dos o más clases de los mismos en combinación.

La diacilfosfatidilcolina (aquí en adelante, algunas veces mencionada como "componente (A)") utilizada en la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención no se limita específicamente mientras que es farmacológicamente aceptable, y ejemplos de la misma incluyen una diacilfosfatidilcolina cuyo grupo funcional acilo tiene 4 a 23 átomos de carbono. El número de átomos de carbono de los dos grupos acilo que constituyen la diacilfosfatidilcolina pueden ser iguales o diferentes.

Ejemplos específicos de la diacilfosfatidilcolina utilizada en la presente invención incluyen dilauroilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina,

dilinoleoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina,
 miristoilestearoilfosfatidilcolina, palmitoilestearoilfosfatidilcolina,
 dibutyloilfosfatidilcolina, dihexanoilfosfatidilcolina, diheptanoilfosfatidilcolina,
 didecanoilfosfatidilcolina, dftanoilfosfatidilcolina, didodecilfosfatidilcolina,
 5 dieicosenoilfosfatidilcolina, dihenicosanoilfosfatidilcolina, dierucoilfosfatidilcolina,
 diarachidonoilfosfatidilcolina, y bis(tricosadinoil)fosfatidilcolina. De estas
 diacilfosfatidilcolinas, se prefiere una diacilfosfatidilcolina cuyo grupo funcional
 acilo tiene 12 a 18 átomos de carbono; es más preferible una diacilfosfatidilcolina
 cuyo grupo funcional acilo tiene 13 a 17 átomos de carbono, tal como
 10 dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina,
 miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina, y
 palmitoilestearoilfosfatidilcolina; son particularmente preferibles
 dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y diestearoilfosfatidilcolina; y es
 más preferible diestearoilfosfatidilcolina. Estas diacilfosfatidilcolinas se pueden
 15 utilizar solas, o se pueden utilizar dos o más clases en combinación.

El colesterol y/o un derivado del mismo (aquí en adelante algunas veces
 mencionado como "componente (B)") utilizado en la composición de portador para
 suministro de ácido nucleico de la presente invención no se limita específicamente
 20 mientras que es farmacológicamente aceptable. El derivado del colesterol es un
 lípido catiónico que tiene un esqueleto de colesterol, y ejemplos específicos del
 mismo incluyen 3β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Chol),
 yoduro de 3β -[N',N',N'-trimetilaminoetano]colesterol (TC-Chol), bis(guanidio)-tren-
 colesterosa (BGTC), N-colesteriloxycarbonil-3,7-diazanonan-1,9-diamina, β -
 25 alanina-dietanolamina-colesterol, carbamato de N⁴-espermina colesterilo (GL-67),
 carbamato de N[N⁴-3-aminopropilespermidina]colesterilo (GL-78), N⁴-espermina
 colesteril carboxamida (GL-90), carbamato de N¹,N⁸-bis(carboxamida arginínica)-

N⁴-espermidina colesterilo, y carbamato de N-[N¹,N⁴,N⁸-tris(3-aminopropil)espermidina]colesterilo (GL-96). En la invención, el componente (B) es preferiblemente colesterol. En la invención, como el componente (B), se pueden utilizar colesterol y derivados del mismo solos, o se pueden utilizar dos o
5 más clases en combinación.

La amina primaria alifática (aquí en adelante algunas veces mencionada como "componente (C)") utilizada en la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención no se limita específicamente mientras que es
10 farmacológicamente aceptable, y ejemplos de la misma incluyen una alquilamina cuyo grupo funcional alquilo tiene 10 a 20 átomos de carbono.

Ejemplos específicos de la amina primaria alifática utilizada en la presente invención incluyen laurilamina, miristilamina, palmitilamina, estearilamina,
15 oleilamina, decanoilamina, y ftanoilamina. De estas aminas primarias alifáticas, se prefiere una alquilamina cuyo grupo funcional alquilo tiene 12 a 18 átomos de carbono; son más preferibles estearilamina, oleilamina y palmitoilamina; y es particularmente preferible estearilamina. Estas aminas primarias alifáticas se pueden utilizar sols, o se pueden utilizar dos o más clases en combinación.

La composición de portador para suministro de ácido nucleico de la presente invención puede contener una combinación de los componentes (A) a (C). En vista de la eficiencia mejorada de suministro de ácido nucleico en las células y la baja toxicidad al emplear las siguientes combinaciones, se prefiere una
25 combinación de (A) una diacilfosfatidilcolina cuyos grupos funcionales acilo 4 a 23 átomos de carbono, (B) colesterol y/o un derivado de los mismos, y (C) una alquilamina que tiene 10 a 20 átomos de carbono y es más preferible una

combinación de (A)dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y/o diestearoilfosfatidilcolina, (B) colesterol, y (C) estearilamina.

En la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la presente invención, la relación de los componentes (A) a (C) no se limita específicamente. Por ejemplo, la relación molar componente (A):componente (B):componente (C) es 5-9:1-5:1, preferiblemente 6-9:1-4:1, y más preferiblemente 7-8:2-3:1. Se puede mejorar la eficiencia de suministro de un ácido nucleico en las células y la baja toxicidad al satisfacer la relación molar.

La cantidad total de los componentes (A) a (C) basada en la cantidad total de la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la presente invención es, por ejemplo, de 1 a 100% en peso, preferiblemente de 20 a 90% en peso, y más preferiblemente de 30 a 70% en peso.

La composición de portador para suministro de ácido nucleico de la presente invención puede contener, en adición a los componentes (A) a (C), otros lípidos catiónicos. Ejemplos específicos del lípido catiónico incluyen lípidos catiónicos unidos con un esteroide, tal como esqualamina,

3a,7a,12a-tris(3-aminopropoxi)-5 β -colan-24-(N,N-bis(3-aminopropil)amina, 3a,7a,12a-tris(3-aminopropoxi)-5 β -colan-24-(N-(N-(3-aminopropil))-3-aminopropil)-amina), 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxi)-5 β -colan-24-(N,N-bis(2-cianoetil)amina), y 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxi)-5 β -colan-24-(N-(benciloxicarbonil)-N-(3-hidroxipropil)-amina)); lípidos catiónicos unidos con ácido cólico, tal como conjugados de umbrela-espermina; lípidos catiónicos unidos con esterolglucisida; lípidos catiónicos unidos con esteroide saponina; y lípidos catiónicos de tipo de sal de amonio cuaternaria tal como bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB),

- 1,2-dimiristoil-3-trimetilamoniopropano,
1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano (DOTAP),
sulfato de 1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropanometilo,
1,2-dipalmitoil-3-trimetilamoniopropano,
5 1,2-diestearoil-3-trimetilamoniopropano,
clorhidrato de N-(1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA),
bromuro de dimiristoiloxipropildimetilhidroxietilamonio (DMRIE),
bromuro de dioleoiloxipropildimetilhidroxietilamonio (DORIE),
bromuro de dimetildidodecilamonio,
10 clorhidrato de N-(α -trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamina,
clorhidrato de N-(α -trimetilamonioacetil)-O,O'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)-L-glutamina,
clorhidrato de O,O'-didodecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina,
clorhidrato de metilalildidodecilamonio,
15 clorhidrato de N-{p-(w-trimetilamoniobutiloxi)-benzoil}-didodecil-L-glutamina,
bromuro de 9-(w-trimetilamoniobutil)-3,6-bis(dodecanoil)carbazol,
clorhidrato de dimetildiocetadecilamonio,
bromuro de N-w-trimetilamoniododecanoil-dihexadecil-D-glutamina,
bromuro de N-{p-(w-trimetilamoniohexiloxi)-benzoil}-ditetradecil-L-glutamina,
20 bromuro de p-(w-trimetilamoniodeciloxi)-p'-octiloxiazobenceno (MC-1-0810),
bromuro de p-{w-(b-hidroxietil)dimetil-amonio-deciloxi}-p'-octiloxiazobenceno (MC-3-0810),
bromuro de O,O',O''-tridodecanoil-N-(w-trimetil-amoniododecanoil)-tris(hidroximetil)aminometano (TC-1-12),
25 1,2-dilauril-glicero-3-etilfosfocolina,
1,2-dimiristoil-glicero-3-etilfosfocolina,
1,2-dipalmitoil-glicero-3-etilfosfocolina,

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

5 En la invención, cuando se contienen lípidos catiónicos diferentes de los
componentes (A) a (C), la proporción del lípido catiónico no se limita
específicamente mientras que los efectos de la invención no se afectan
adversamente. La proporción del lípido catiónico es de 1 a 10 partes en peso,
preferiblemente de 2 a 8 partes en peso, y más preferiblemente de 4 a 6 partes en
10 peso, por 100 partes en peso de la cantidad total de los componentes (A) a (C).

Adicionalmente, la composición de portador para suministro de ácido
nucleico de la invención puede contener una base aceitosa, si es necesario. Al
incluir una base aceitosa y utilizar sus características, llega a ser posible controlar
15 la eficiencia del ácido nucleico a ser introducido mediante la composición de
portador para suministro. Por ejemplo, el ajuste de la gravedad específica de la
composición de portador para suministro de ácido nucleico al incluir la base
aceitosa controla el contacto entre el ácido nucleico y la composición de portador
para suministro de ácido nucleico y permite el mejoramiento de la eficiencia de
20 introducción *in vitro*. Adicionalmente, por ejemplo, al incluir un compuesto con una
función sensible a la temperatura como la base aceitosa, se puede inducir la
fluctuación en una superficie celular debido a la ruptura del núcleo de un portador
de ácido nucleico composición bajo una condición de temperatura dada, por lo
tanto llega a ser posible el mejoramiento de la eficiencia de introducción del ácido
25 nucleico. Adicionalmente, por ejemplo, al incluir un compuesto con una propiedad
de interrupción de estimulación externa como la base aceitosa, se puede inducir la
fluctuación sobre la superficie celular debido a la ruptura del núcleo de un portador

de ácido nucleico composición originada mediante estimulación externa, por lo tanto llega a ser posible el mejoramiento de la eficiencia de introducción del ácido nucleico.

- 5 Ejemplos de la base aceitosa incluidos en la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la presente invención incluyen perfluorocarbono, perfluoropentano, bromuro de perfluorooctilo, perfluorohexano, perfluorotributilamina, aceite de soya, aceite de soya refinado, aceite de soya endurecido, aceite de soya no saponificado, escualeno, aceite de ricino, aceite de
- 10 clavo, trioleato de sorbitán, trementina vegetal, aceite de cártamo, ácido graso de aceite de cártamo, ácido oleico, aceite de coco, aceite de colza, aceite de fusel, aceite de oliva, aceite de linaza, aceite de sésamo, aceite de clorofila, el aceite de crotón, aceite de bergamota, aceite de cedro, aceite de naranja, aceite de hinojo, aceite de eucalipto, aceite de maíz, aceite de lavanda, aceite de mejorana, aceite
- 15 de limón, aceite de semilla de algodón, aceite de yema de huevo, aceite de rosa, aceite de pino, aceite de almendras, aceite de maní, aceite de camelia, aceite de alcanfor blanco, aceite de manzanilla, aceite de canela, aceite de menta, aceite de maíz esterificado, aceite de pan, aceite de Anthemis nobilis, aceite de serpiente, aceite de hierbabuena, aceite de girasol, manteca de cacao, aceite de germen de
- 20 trigo, aceite de óxido de cinc, aceite endurecido, aceite vegetal hidrogenado, parafina líquida ligera, parafina líquida, triglicérido de ácido graso de cadena media, aceite de visón, aceite de cáscara de naranja, aceite de ricino de polioxietileno, aceite de ricino endurecido de polioxietileno, aceite de ricino endurecido de polioxietileno 10, aceite de ricino endurecido de polioxietileno 100,
- 25 aceite de ricino endurecido de polioxietileno 20, aceite de ricino endurecido de polioxietileno 40, aceite de ricino endurecido de polioxietileno 5, aceite de ricino endurecido de polioxietileno 50, aceite de ricino endurecido de polioxietileno 60,

aceite de ricino 35 polioxilo, y aceites procesados. Des estas bases de bases
aceitosas, el perfluoropentano tiene temperatura sensible y también tiene
características que es la volatilidad a 29.5° C. También, el perfluorohexano,
bromuro de perfluorooctilo y perfluorotributilamina tienen una propiedad de ruptura
5 de estimulación externa y tienen características que generan cavitación en el
núcleo de la composición de portador por medio de estimulación externa tal como
estimulación originada por irradiación con ultrasonido, originando por lo tanto
ruptura del núcleo.

10 Cuando la composición de portador para suministro de ácido nucleico
contiene la base aceitosa, la proporción de la base aceitosa no se limita
específicamente mientras que los efectos de la invención no se afectan
adversamente. La proporción de la base aceitosa es de 0.1 a 50 partes en peso,
preferiblemente de 1 a 30 partes en peso, y más preferiblemente de 5 a 20 partes
15 en peso, por 100 partes en peso de la cantidad total de los componentes (A) a (C).

Adicionalmente, la composición de portador para suministro de ácido
nucleico de la invención puede contener un lípido fusogénico de membrana (lípido
auxiliar), si es necesario. Llega a ser posible mejorar adicionalmente la eficiencia
20 del suministro del ácido nucleico en las células al contener tal lípido fusogénico de
membrana. Ejemplos de lípido fusogénico de membrana incluyen
dioleoilfosfatidiletanolamina,
dioleoilfosfatidilcolina,
transfosfatidilfosfatidiletanolamina,
25 1,2-bis(10,12-tricosadinoil)-fosfoetanolamina,
1,2-dielaidoilfosfoetanolamina,
1,2-dihexadecilfosfoetanolamina,

- 1,2-dihexanoilfosfoetanolamina,
1,2-dilauroilfosfoetanolamina,
1,2-dilinoleoilfosfoetanolamina,
1,2-dimiristoilfosfoetanolamina,
5 1,2-dioleoilfosfoetanolamina,
1,2-dipalmitooleilfosfoetanolamina,
1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina,
1,2-difitanoilfosfoetanolamina,
1,2-diestearoilfosfoetanolamina,
10 1-palmitoil-2-oleoilfosfoetanolamina,
1-palmitoil-2-(10,12-tricosadinoil)fosfoetanolamina,
1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-caproilamina,
1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-caproilamina,
1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N,N-dimetilo,
15 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N,N-dimetilo,
1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-dodecanoilo,
1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-dodecanoilo,
1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-dodecanilamina,
1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-dodecanilamina,
20 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-glutarilo,
1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-glutarilo,
1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-lactosa,
1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidemetil)ciclohexano-carboxilato],
dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidemetil)ciclohexano-carboxilato],
25 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidefenil)butiramida],
1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidefenil)butirato],
1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-metilo,

dipalmitoilfosfoetanolamina-N-metilo,

1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato],

1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato],

1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-(succinilo),

5 y 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-(succinilo). De estos lípidos fusogénicos de membrana, se utiliza preferiblemente la dioleoilfosfatidiletanolamina en la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención.

10 Cuando la composición de portador para suministro de ácido nucleico contiene el lípido fusogénico de membrana, la proporción del lípido fusogénico de membrana no se limita específicamente mientras que los efectos de la invención no se afectan adversamente. La proporción del lípido fusogénico de membrana es de 1 a 500 partes en peso, preferiblemente de 10 a 250 partes en peso, y más preferiblemente de 25 a 100 partes en peso, se basa en 100 partes en peso de la
15 cantidad total de los componentes (A) a (C).

La composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención puede contener varios aditivos tales como agentes de isotonización, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, amortiguadores, y
20 conservantes; y vehículos acuosos tales como agua purificada, una solución de sacarido acuosa, una solución de amortiguador, una solución salina fisiológica, una solución de polímero acuosa, y agua libre de RNasa, de acuerdo con su forma. Las cantidades de los aditivos y vehículos acuosos se pueden establecer apropiadamente de acuerdo con la forma del portador para suministro de ácido
25 nucleico.

La forma de la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención no se limita específicamente aunque puede incluir el ácido nucleico objetivo a ser suministrado en las células, y la composición es preferiblemente en la forma de un liposoma.

5

Cuando la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención es de forma liposómica, los componentes (A) a (C) y otros lípidos, que se agregan opcionalmente, forman una membrana liposómica. Cuando se forma el liposoma, este puede ser vesículas unilamelares pequeñas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), o vesículas multilamelares (MLV). Más aún, el diámetro de partícula se puede establecer apropiadamente de acuerdo con la clase de células a ser suministradas, por ejemplo, el diámetro de partícula es 20 a 100 nm para SUV, 200 a 1,000 nm para LUV, y 400 a 3,500 nm para MLV. El diámetro de partícula se determina utilizando un método de dispersión liviano dinámico.

15

La producción del liposoma y ajuste de su diámetro de partícula se implementan de acuerdo con métodos que son de común conocimiento de un experto en la técnica. Más específicamente, el liposoma se puede formar utilizando una fase de aceite que contiene los componentes (A) a (C) y una fase de agua (vehículo acuoso) mediante un método de película fina, un método de evaporación de fase inversa, un métodos de infusión de éter, un método de tensoactivo, y un método de calentamiento. Adicionalmente, el diámetro de partícula se puede ajustar mediante un método de extrusión, un método de presión French, y un método de homogenización.

20

25

La composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención se prepara al mezclar los componentes (A) y (B) y, si es necesario, otros componentes, y formar apropiadamente la mezcla en una preparación de acuerdo con la forma deseada.

5

Composición para Suministro de Ácido Nucleico

La composición para suministro de ácido nucleico de la invención contiene la composición de portador para suministro de ácido nucleico y ácido nucleico. Así, la composición para suministro de ácido nucleico se utiliza para introducir el ácido nucleico contenido en la composición en las células, que llega a ser el suministro objetivo.

10

Cuando la composición de portador para suministro de ácido nucleico es de forma liposómica, en la composición para suministro de ácido nucleico, el ácido nucleico puede existir en un estado en la fase acuosa del liposoma, o un estado unido al interior o al exterior de una membrana liposómica por medio de un enlace iónico o hidrófobo. Adicionalmente, si la composición de portador para suministro de ácido nucleico no es de forma liposómica, en la composición para suministro de ácido nucleico, esta es solo necesaria para formar un complejo del ácido nucleico con componentes de la composición de portador para suministro de ácido nucleico por medio de un enlace iónico o hidrófobo.

15

20

La composición para suministro de ácido nucleico de la invención se prepara al mezclar la composición de portador para suministro de ácido nucleico y ácido nucleico, y formar la mezcla en una forma deseada, o producida al mezclar

25

el ácido nucleico y los componentes de la composición de portadores para suministro de ácido nucleico en cualquier orden.

En la composición para suministro de ácido nucleico de la presente invención, la relación de mezclado del ácido nucleico y la composición de portador para suministro de ácido nucleico varía dependiendo de la clase de ácido nucleico, la composición de portador para suministro de ácido nucleico utilizado, y la clase de células del suministro objetivo. La proporción de ácido nucleico es de 1.0×10^{-5} a 1.0 partes en peso, preferiblemente de 1.0×10^{-4} a 1.0×10^{-1} partes en peso, y más preferiblemente de 1.0×10^{-3} a 1.0×10^{-2} partes, por 100 partes en peso de la cantidad total de los componentes (A) a (C) contenidos en la composición de portador para suministro de ácido nucleico.

También, la cantidad total de los componentes (A) a (C) contenida en la composición para suministro de ácido nucleico es de 10 a 90% en peso, preferiblemente de 30 a 80% en peso, y más preferiblemente de 40 a 60% en peso, basada en la cantidad total de la composición.

La composición de portador para suministro de ácido nucleico de la invención puede contener varios aditivos tales como agentes de isotonización, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, agente de amortiguación, y conservantes; y vehículos acuosos tales como agua purificada, una solución de sacarido acuosa, un amortiguador, una solución salina fisiológica, de acuerdo con su forma. Las cantidades de los aditivos y vehículos acuosos se pueden establecer apropiadamente de acuerdo con la forma del portador para suministro de ácido nucleico.

En la invención, ejemplos de las células a las que el ácido nucleico se suministra incluyen células cultivadas, células separadas de los organismos vivos (que incluyen estirpes celulares establecidas), y células que existen en los organismos vivos tales como humanos.

5

La forma de la composición para suministro de ácido nucleico de la invención no se limita específicamente mientras que una cantidad apropiada de la composición para suministro de ácido nucleico se aplica mientras que se coloca en contacto con células objetivo en las que se introduce el ácido nucleico. Cuando se suministra el ácido nucleico a las células que existen en los organismos vivos tales como humanos, ejemplos de aplicación incluyen infusión directa en tejido; intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, orgánica digestiva, e inyecciones endodónticas; administración por inhalación en la cavidad nasal, cavidad de la boca y pulmones; administración oral; administración percutánea a través de la piel; y administración mucosa a través de la membrana de mucosa, membrana de mucosa vaginal, membrana de mucosa ocular, membrana de mucosa rectal, y membrana de mucosa uterina. Alternativamente, cuando el ácido nucleico se suministra a las células separadas de organismos vivos y células cultivadas, se ejemplifica un método para cultivar las células en la presencia de una cantidad apropiada de la composición para suministro de ácido nucleico agregado antes de incubación. Adicionalmente, cuando el ácido nucleico se suministra a las células separadas de organismos vivos o células cultivadas, también se puede suministrar el ácido nucleico en las células aún en la presencia de suero.

25

Se determina la cantidad de la composición para suministro de ácido nucleico de la invención aplicada al suministro de células objetivo de acuerdo con

la clase de ácido nucleico utilizado, la clase de composición de portador para suministro de ácido nucleico utilizada, y la clase de células objetivo. Por ejemplo, cuando el suministro objetivo son células en humanos, se administra la cantidad terapéuticamente efectiva de la composición para suministro de ácido nucleico de la invención al paciente de quien se espera la ganancia terapéutica al administrar el ácido nucleico.

EJEMPLOS

10 La invención se describirá ahora en detalle basada en los Ejemplos y similares, pero la invención no se limita a estos. En los siguientes Ejemplos, diestearoilfosfatidilcolina se abrevia a “DSPC”, dipalmitoilfosfatidilcolina se abrevia a “DPPC”, y dimiristoilfosfatidilcolina se abrevia a “DMPC”. En los siguientes Ejemplos de Prueba 1 y 2, GL3-siARN (siARN a luciferasa de luciérnaga; 15 Dharmacon Co., Boulder, CO, USA; se utiliza codificante: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT, anticodificante: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT) como siARN. En el Ejemplo de Prueba 3, MMP-9-siARN Humano (Samchully Pharm. Co., Ltd, Corea; se utiliza codificante 5'-CCAACUAUGACCAGGAUAAdTdT-3', anticodificante: 5'-UUAUCCUGGUCAUAGUUGGdTdT-3') como siARN. 20

Ejemplo 1

Preparación de Composición de Portador que contiene DSPC para Suministro de 25 Ácido Nucleico

Se pesan DSPC, colesterol y estearilamina en una relación molar de 7:3:1 y luego se disuelven en cloroformo utilizando un matraz de recuperación. La solución se seca bajo presión reducida utilizando un evaporador rotatorio para formar una membrana delgada de lípido. Después se agrega agua tratada con DEPC (manufacturada por Ambion Co.; agua libre de RNasa) a la solución en tal una forma que su concentración de DSPC llega a ser 30 mg/mL, el diámetro de partícula de la solución resultante se ajusta al pasar a través de una membrana que tiene un diámetro de poro de 100 nm utilizando un extrusor para preparar una composición de portador para suministro de ácido nucleico en una forma liposómica catiónica.

Ejemplo 2

Preparación de Composición de Portador que contiene DPPC para Suministro de Ácido Nucleico

En la misma forma como en el Ejemplo 1, excepto que se utiliza DPPC en lugar de DSPC, se prepara una composición de portador para suministro de ácido nucleico en una forma liposómica catiónica.

Ejemplo 3

Preparación de Composición de Portador que contiene DMPC para Suministro de Ácido Nucleico

En la misma forma como en el Ejemplo 1, excepto que se utiliza DMPC en lugar de DSPC, se prepara una composición de portador para suministro de ácido nucleico en una forma liposómica catiónica.

5 Ejemplo 4

Preparación de Composición de Portador que contiene DSPC para Suministro de Ácido Nucleico

10 Una solución que contiene siARN en una concentración de 2 μ M (solución siARN) se prepara utilizando una solución preparada al diluir 20 $\times$ de amortiguador Tris-EDTA (TE) (manufacturado por Invitrogen Co.) 20 veces con agua tratada con DEPC (manufacturada por Ambion Co., agua libre de Rnasa). Luego, se mezclan
15 nucleico del Ejemplo 1 y la solución siARN para formar un lipoplex (complejo), obteniendo así una composición para suministro de ácido nucleico.

Ejemplo 5

20 Preparación de Composición de Portador que contiene DPPC para Suministro de Ácido Nucleico

Una solución que contiene siARN en una concentración de 2 μ M (solución siARN) se prepara utilizando una solución preparada al diluir 20 $\times$ de amortiguador
25 Tris-EDTA (TE) (manufacturado por Invitrogen Co.) 20 veces con agua tratada con DEPC (manufacturada por Ambion Co., agua libre de Rnasa). Luego, se mezclan una cantidad igual de la composición de portador para suministro de ácido

nucleico del Ejemplo 2 y la solución siARN para formar un lipoplex (complejo), obteniendo así una composición para suministro de ácido nucleico.

Ejemplo 6

5

Preparación de Composición de Portador que contiene DMPC para Suministro de Ácido Nucleico

10

Una solución que contiene siARN en una concentración de 2 μ M (solución siARN) se prepara utilizando una solución preparada al diluir 20 $\times$ de amortiguador Tris-EDTA (TE) (manufacturado por Invitrogen Co.) 20 veces con agua tratada con DEPC (manufacturada por Ambion Co., agua libre de Rnasa). Luego, se mezclan una cantidad igual de la composición de portador para suministro de ácido nucleico del Ejemplo 3 y la solución siARN para formar un lipoplex (complejo), obteniendo así una composición para suministro de ácido nucleico.

15

Ejemplo de Prueba 1 Prueba para Evaluación de Seguridad para las células

20

Se desarrolla la evaluación utilizando un ensayo MTS. Se utiliza un ensayo de A Ensayo de Proliferación Celular de Una Solución acuosa CellTiter 96 manufacturado por Promega Co. se utiliza para el ensayo MTS. Específicamente, se inoculan células A594 (ATCC, USA) a 3.16×10^4 células/pozo en 200 μ l de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene 10 vol% de suero bocino fetal (FBS) en una placa de 96 pozos, y se incuban a 37° C durante 24 horas. Después de enjuagar con Solución de Cal Amortiguada Hank (HBSS) 3 veces, el medio se cambia a DMEM sin FBS, luego se agregan 20 μ l de cada una de las composiciones para suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 4 a 6 a

25

cada pozo y se incuban a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 4 horas. Luego, el sobrenadante del cultivo en los pozos se cambia a DMEM con 10 vol% de FBS y se incuba a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas de nuevo. Se agregan 20 µl de un reactivo MTS (Metanotiosulfonato) y 100 µl de un medio DMEM con 10 vol% de FBS a cada pozo, se incuba durante 2 horas, seguido por la determinación de la absorbancia a 492 nm y cálculo adicional de viabilidad celular. Se calcula la viabilidad celular al establecer la absorbancia en 492 nm determinada sin agregar la composición para suministro de ácido nucleico que se incuba bajo las anteriores condiciones como el 100%.

Los resultados se muestran en la Figura 1. Como se muestra en la Figura 1, llega a ser evidente que todas las composiciones para suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 4 a 6 tienen bajo citotoxicidad y alta seguridad. Particularmente, se confirma que la seguridad es significativamente alta en las composiciones para suministro de ácido nucleico utilizando DSPC o DPPC como la diacilfosfatidilcolina (Ejemplo 4 o 5).

Ejemplo de Prueba 2 Prueba para Evaluación de Eficiencia de Suministro de siARN en las Células

Se evalúa introducción intracelular de siARN al medir la intensidad de fluorescencia de siARN marcado FITC utilizando citometría de flujo. En esta prueba, se utiliza una composición para suministro de ácido nucleico preparada con siARN premarcado FITC. Específicamente, se inoculan células A594 (ATCC, USA) en 5×10^5 células/pozo en 500 µl de DMEM con 10 vol% de FBS en una placa de 24 pozos, y se incuban a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 24 horas. Después de enjuagar tres veces con HBSS, el medio se cambia a DMEM que

contiene no FBS, y luego se agregan 0.05 ml de cada una de las composiciones para suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 4 a 6 a cada pozo y se incuban a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 4 horas. Luego, el sobrenadante del cultivo en los pozos se cambia a DMEM con 10 vol% de FBS y se incuba a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas de nuevo. Cada pozo se enjuaga con HBSS una vez y se agrega 0.2 ml de CellscrubBuffer (Gene Therapy Systems, Inc.), seguido por incubación a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 15 minutos. De nuevo, los pozos se enjuagan con HBSS 2 veces y las células adheridas en el fondo del pozo se desprenden utilizando tripsina y se recolectan mediante centrifugación, y luego las células resultantes se suspenden en HBSS. La suspensión se filtra a través de una membrana que tiene un diámetro de poro de 41 µm. Se mide la intensidad de fluorescencia de las células utilizando citometría de flujo en 2 horas y 24 horas después de la adición de las composiciones para suministro de ácido nucleico. Como un control, la intensidad de fluorescencia de una composición de control para suministro de ácido nucleico obtenida al mezclar una solución de Lipofectamina 2000TM (Invitrogen) a menudo se utiliza como un vector de gen disponible comercialmente diluido con medio OptiMEM a 0.1 mg/mL y solución de siARN diluida con amortiguador TE en una concentración de 2 µM en una relación de volumen de 1:1 también se mide en la misma forma como se describió anteriormente.

Los resultados se muestran en la Figura 2. De estos resultados, se confirma que el siARN se incorpora en las células en cualquier caso de las composiciones para suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 4 a 6. Particularmente, en las composiciones para suministro de ácido nucleico utilizando DSPC o DMPC como la diacilfosfatidilcolina (Ejemplos 4 y 6), llega a ser evidente que la introducción de siARN 2 horas después de la adición es significativamente alta según se compara

con LipofectaminaTM 2000 a menudo utilizada como un vector de gen disponible comercialmente y que las composiciones tienen características favorables en actuación excelente rápida.

5 Adicionalmente, se produce un portador para suministro de ácido nucleico que tiene una concentración DSPC de 7.5 a 30 mg/mL de acuerdo con la misma forma como en el Ejemplo 1, utilizando DSPC, colesterol, y estearilamina (DSPC:colesterol:estearilamina = 7:3:1 en una relación molar, aquí en adelante, denominada colectivamente como un "lípidos constituyente del portador para suministro de ácido nucleico"). Se forma un lipoplex (complejo) al mezclar una 10 cantidad igual de este portador para suministro de ácido nucleico y amortiguador TE que contiene 200 nM de siARN, y se prepara la composición para suministro de ácido nucleico. Utilizando la composición para suministro de ácido nucleico preparada de esta forma, la introducción de siARN en las células se evalúa en la 15 misma forma como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 3. A partir de estos resultados, cuando se cambia la concentración del lípidos constituyente del portador para suministro de ácido nucleico, la cantidad de ácido nucleico introducida en las células mediadas por la composición para suministro de ácido nucleico se cambia de acuerdo con lo anterior. También, se 20 encuentra que el lípidos constituyente del portador para suministro de ácido nucleico muestra un bajo valor en la cantidad de siARN introducida a 24 horas después de la adición según se compara con 2 horas después de la adición en cualquier concentración, y tal desaparición de siARN inicia a las 24 horas después de la adición. Por lo tanto, los resultados también revelan que es posible 25 suministrar siARN en las células dentro de un corto tiempo de 2 horas después de la adición al utilizar la combinación de DSPC, colesterol, y estearilamina como el

portador para suministro de ácido nucleico, y las composiciones tienen características favorables en actuación excelente rápida.

Ejemplo de Prueba 3 Prueba para Evaluación de Inhibición de Inducción de

5 Interferón

Se inoculan células A594 (ATCC, USA) a 5×10^5 células/pozo en 500 μ l de DMEM con 10 vol% de FBS en una placa de 24 pozos, y se incuban a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 24 horas. Después de enjuagar tres veces con HBSS, 450 μ l de un medio de DMEM que no contiene FBS se agrega en cada pozo, más aún, 50 μ l de la composición para suministro de ácido nucleico del Ejemplo 4 se agrega en cada pozo y se incuban a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 4 horas. Luego, el sobrenadante del cultivo en los pozos se cambia a DMEM con 10 vol% de FBS y se incuban a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas de nuevo. Después de enjuagar tres veces con HBSS, las células adheridas en el fondo del pozo se desprenden utilizando tripsina y se recolectan mediante centrifugación. Se extrae ARN de las células resultantes utilizando Rneasy Plus Mini (Qiagen), y luego se obtiene cADN mediante transcripción utilizando Transcripción Inversa QutantiTect (Qiagen). Utilizando el cADN resultante, Ensayo QutantiTectPrimer (Qiagen), y iCycler iQ (Bio-RAD), mARN de IFIT-1, que es un gen que induce interferón, se cuantifica con PCR en tiempo real. Como un control, se cuantifica el mARN de IFIT-1 en una composición de control para suministro de ácido nucleico obtenido al mezclar una solución de Lipofectamina 2000TM (Invitrogen) a menudo utilizado como un vector de gen disponible comercialmente diluido con medio OptiMEM a 0.1 mg/mL y la solución siARN diluido con amortiguador TE en concentración de 2 μ M en una relación de volumen de 1:1 en la misma forma como describió anteriormente. Como un gen de mantenimiento para corregir la cuantificación se

utiliza 18rARN. También, como un blanco, el mRNA de IFIT-1 se cuantifica con las condiciones anteriores sin la adición de la composición para suministro de ácido nucleico.

- 5 Los resultados se muestran en la Figura 4. La composición para suministro de ácido nucleico del Ejemplo 4 utilizando DSPC indica significativamente baja inducción de interferón según se compara con la composición de control para suministro de ácido nucleico utilizando LipofectTM amina 2000. Los resultados revelan que es posible inhibir inducción de interferón, que es un efecto adverso de
- 10 siARN, utilizando la composición para suministro de ácido nucleico de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de portador para suministro de ácido nucleico, que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática.
2. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el componente (A) es una diacilfosfatidilcolina cuyo grupo funcional acilo tiene 4 a 23 átomos de carbono.
3. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en donde el componente (B) es colesterol.
4. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el componente (C) es una alquilamina que tiene 10 a 20 átomos de carbono.
5. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el componente (A) es por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y diestearoilfosfatidilcolina; el componente (B) es colesterol; y

el componente (C) es estearilamina.

- 5 6. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la relación molar del componente (A):componente (B):componente (C) es 5-9:1-5:1.
- 10 7. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 1, que es un portador para suministro de siARN.
- 15 8. La composición de portador para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 1, que es una preparación de liposoma en la que una membrana liposómica se forma de los componentes (A) a (C).
- 20 9. Una composición para suministro de ácido nucleico, que comprende un ácido nucleico, y la composición de portador para suministro de ácido nucleico de la Reivindicación 1.
- 25 10. La composición para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 9, en donde el ácido nucleico es siARN.
11. La composición para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 9, que es una preparación de liposoma.
12. Un método para introducir un ácido nucleico, que comprende la etapa de introducir el ácido nucleico en las células al poner la composición para

suministro de ácido nucleico de la Reivindicación 9 en contacto con las células.

5 13. Un método para introducir un ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 12, en donde las células son células cultivadas, células separadas de los organismos vivos, o células que existen en los organismos vivos.

10 14. Uso de una composición que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática, en la fabricación de un portador para suministro de ácido nucleico.

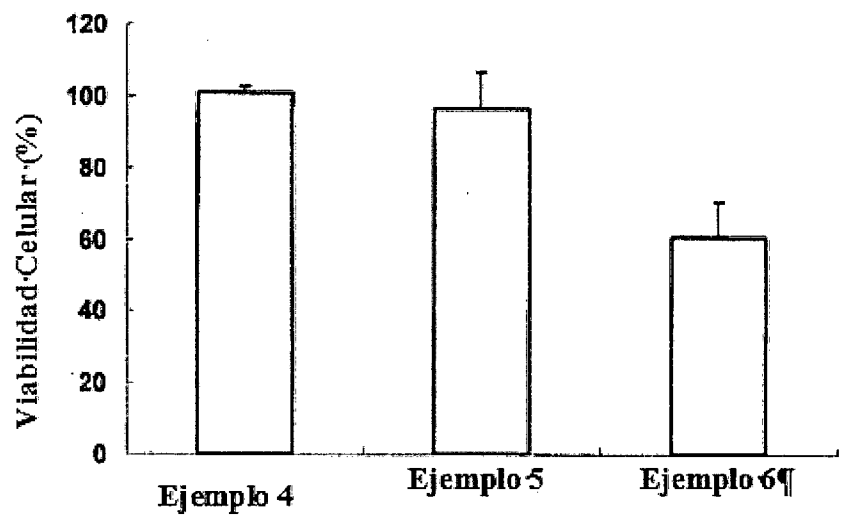
15 15. Uso de acuerdo con la Reivindicación 14, en donde el portador se utiliza para suministro de siARN.

RESUMEN

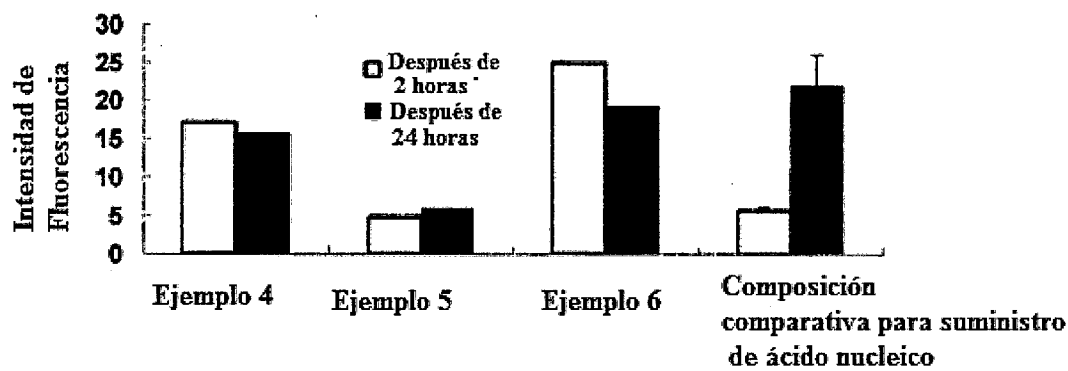
Un objeto de la presente invención es para proporcionar una composición de portador para suministro de ácido nucleico, que puede suministrar eficientemente un ácido nucleico en las células cuando un ácido nucleico tal como se administra siARN a células derivadas de animal o animales, y también tiene baja toxicidad y alta seguridad, y una composición para suministro de ácido nucleico que contiene la composición de portador y ácido nucleico.

Se prepara un portador para suministro de ácido nucleico al utilizar (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática. También, una composición para suministro de ácido nucleico se prepara al mezclar el portador para suministro de ácido nucleico con un ácido nucleico.

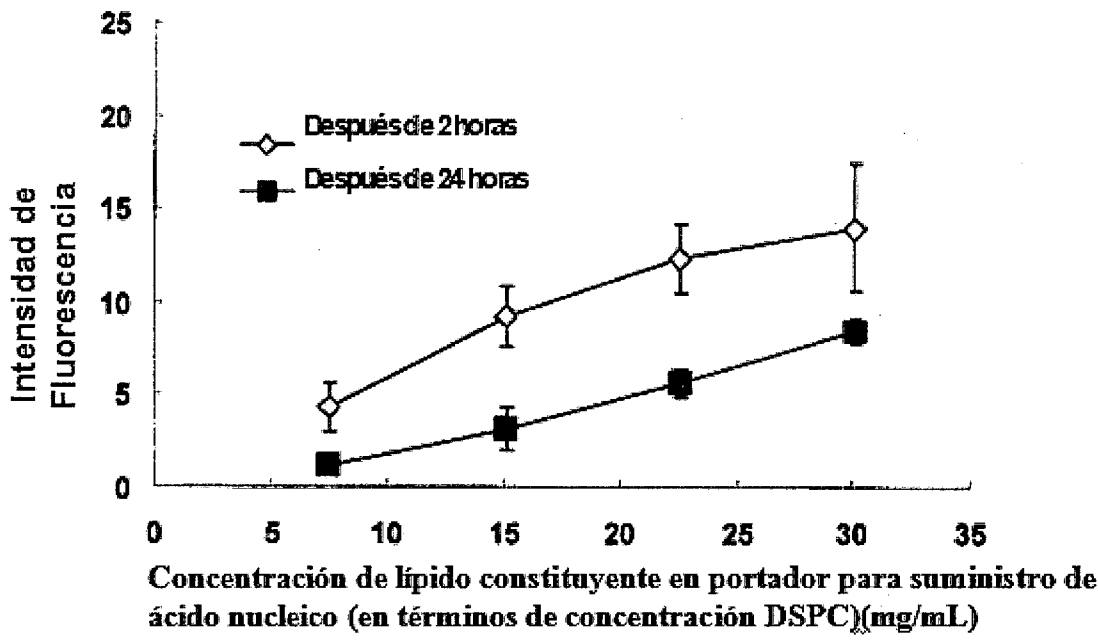
[Fig. 1]



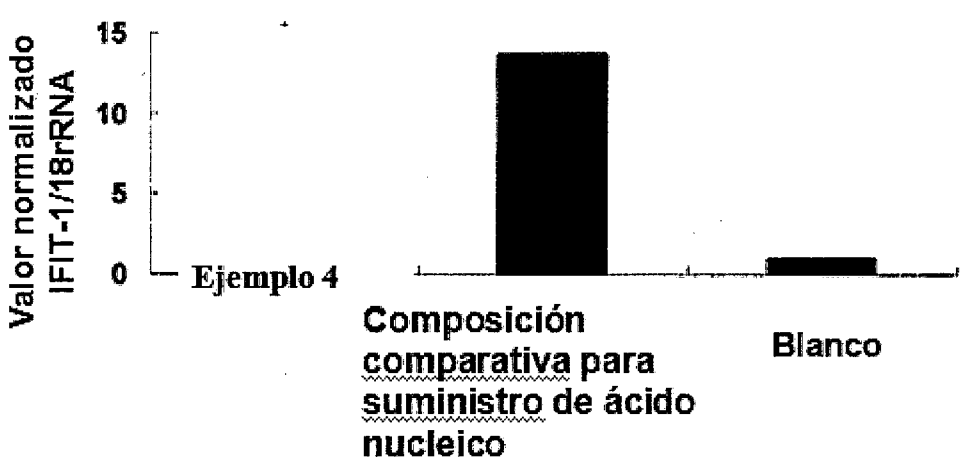
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055730

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/7088(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61K48/00 (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/7088, A61K9/127, A61K31/713, A61K47/18, A61K47/24, A61K47/28, A61K48/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Caplus (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-292795 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.),	1-6, 8-9,
Y	26 October, 1999 (26.10.99), Claims; Par. Nos. [0023] to [0026], [0031] to [0044] & WO 1999/051751 A1 & AU 9929611 A	11-14 7, 10, 15
X	JP 10-313872 A (Discovery Technology Research Laboratories),	1-6, 8-9,
Y	02 December, 1998 (02.12.98), Claims; Par. Nos. [0023] to [0027], [0050] (Family: none)	11-14 7, 10, 15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 May, 2008 (09.05.08)		Date of mailing of the international search report 27 May, 2008 (27.05.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

91

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055730

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/002538 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC.), 12 January, 2006 (12.01.06), Claims; Par. Nos. [0069], [0120] to [0125] & US 2006/025366 A1 & EP 1773857 A1 & AU 2005259799 A1 & JP 2008-504827 A	7, 10, 15
A	JP 2005-336081 A (Anges MG, Inc.), 08 December, 2005 (08.12.05), Claims; Par. Nos. [0038] to [0044] (Family: none)	1-15
A	WO 2005/102268 A2 (SANOCHEMIA PHARMAZEUTIKA AG.), 03 November, 2005 (03.11.05), Claims; description, page 11, line 10 to page 13, line 30 & AT 500143 A1 & EP 1737426 A2 & NO 200605339 A & AU 2005235430 A1 & IN 200602887 P2 & CN 1946377 A & JP 2007-533666 A	1-15
A	WO 2004/017940 A2 (NEOPHARM, INC.), 04 March, 2004 (04.03.04), Claims; description, page 3, line 28 to page 7, line 6 & AU 2003282782 A1 & EP 1539102 A2 & US 2005/238706 A1 & US 2006/030578 A1 & AU 2003282782 A8 & JP 2006-513984 A	1-15
A	WO 1999/013816 A2 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS, INC.), 25 March, 1999 (25.03.99), Claims & AU 9893877 A & EP 1037610 A1 & BR 9812316 A & KR 2001030599 A & AU 751439 B & NZ 503293 A & JP 2003-510239 A & US 6740335 B1	1-15
A	WO 1995/024201 A1 (Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.), 14 September, 1995 (14.09.95), Claims & EP 750910 A1 & KR 97701551 A & US 5776488 A	1-15

93

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 77,179
FECHA : OCTUBRE 13 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-120191- -00000-0000

Fecha: 2009-10-26 16:59:27 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130928140	13/10/2009	15,516,000.00

***** CONCEPTO *****

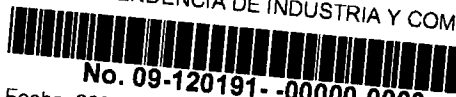
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010: 17257 - 841 - 001-8



No. 09-120191-00000-0000

Fecha: 2009-10-26 16:59:27 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Elvar Acuña
Firma Responsable

Fecha 26-10-09

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia