



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PGT

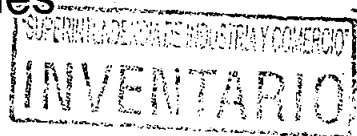
Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



CSA125544

SOLICITUD



Organización y
Digitalización CSA Ltda

PATENTE DE INVENCION

10.68754

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

COMPLEJO DE ÁCIDO NUCLEICO Y COMPOSICION DE

SUMINISTRO DE ACIDOS NUCLEICOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., y HIROFUMI TAKEUCHI

DOMICILIO

TOKIO, JAPON y GIFU, JAPON, Respectivamente

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

(FORMA P-10)

Cur
08-06-2010



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-068754-00000-0000

Fecha: 2010-06-08 16:08:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

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: **OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. y HIROFUMI TAKEUCHI**

sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón y ciudadano Japonés, respectivamente.

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

y

c/o Gifu Pharmaceutical
University,
5-6-1, Mitahorahigashi,
Gifu-shi, Gifu 5028585,
JapónDomicilio: Tokio,
Japón

y

Gifu,
Japón**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: **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**c/o Gifu Pharmaceutical University,
5-6-1 Mitahorahigashi,
Gifu-shi,
Gifu 5028585,
Japón3. **Yasuyuki HIRA**c/o Gifu Pharmaceutical University,
5-6-1 Mitahorahigashi,
Gifu-shi,
Gifu 5028585,
Japón2. **Yuichi TOZUKA**c/o Gifu Pharmaceutical University,
5-6-1 Mitahorahigashi,
Gifu-shi,
Gifu 5028585,
Japón4. **Hidekazu TOYOBUKU**c/o Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.,
1-7-1 Doshomachi,
Chuo-ku,
Osaka-shi,
Osaka 5410045,
Japón

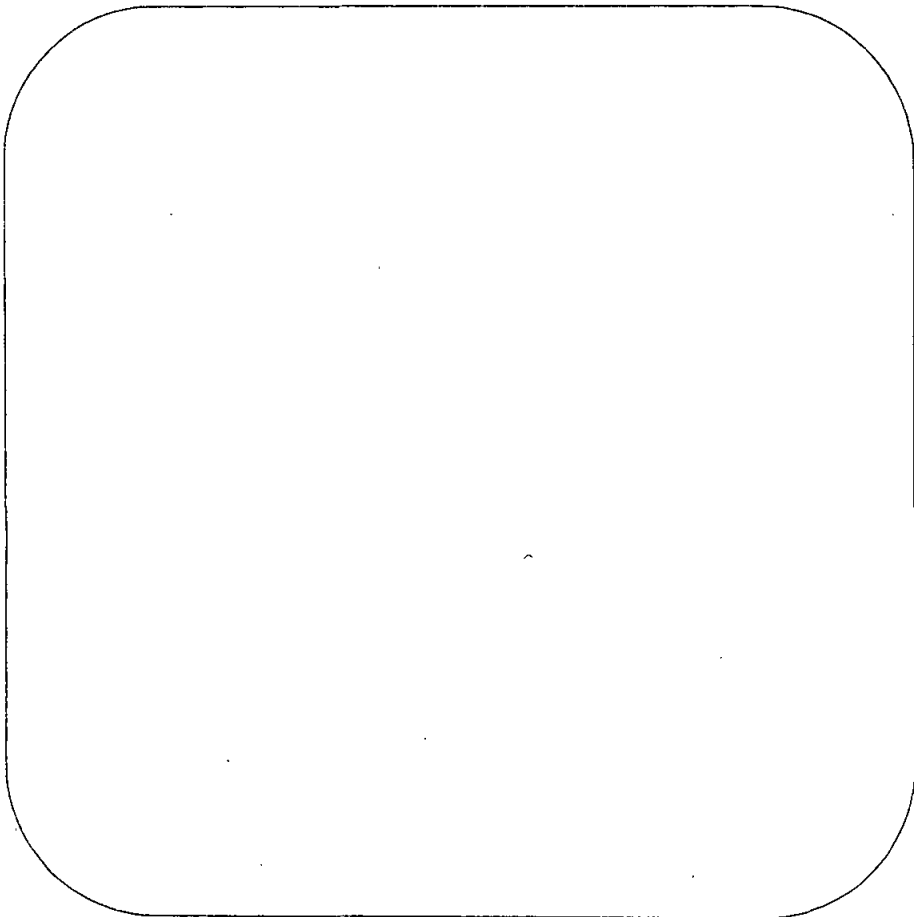
5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/JP2008/070642Publicación Internacional No. WO 2009/061003 A2Fecha: 6 de noviembre de 2008Fecha: 14 de mayo de 2009

6	Título (54) COMPLEJO DE ÁCIDO NUCLEICO Y COMPOSICIÓN DE SUMINISTRO DE ÁCIDOS NUCLEICOS		
7	Clasificación Internacional (51) <u>A61K 009/127</u>		
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>JP</u>	(32) Fecha <u>8 de noviembre de 2007</u>
			(31) Número de Solicitud <u>2007-291317</u>
9	Comprobante de pago No.: <u>10-40,445</u> Comprobante de pago No.: <u>10-40,442</u>		Fecha: <u>19 de mayo de 2010</u> Fecha: <u>19 de mayo de 2010</u>
10	Anexos:		
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.00.		
☒	Comprobante de pago por 5 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$130.000.00.		
☒	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		

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

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

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/061003 A2

Descripción:

Páginas 28 en el idioma original

Páginas 36 en español

Reivindicaciones: Número (s) 15

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.
4. ☒ Listado de Secuencias.
5. ☒ Extracto de publicación.

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

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

domiciliado (s) en/of 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome,

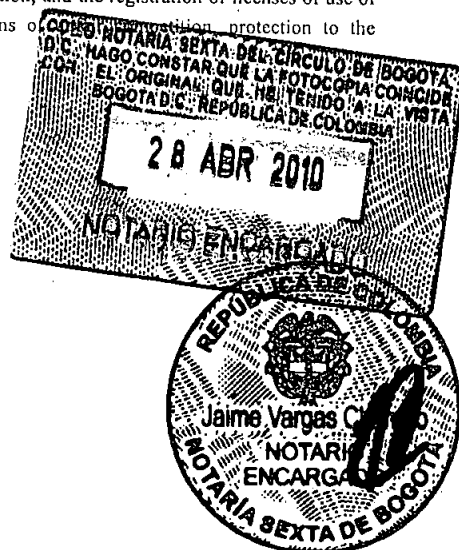
Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan

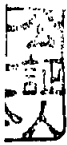
por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos;

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 and GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of





6.

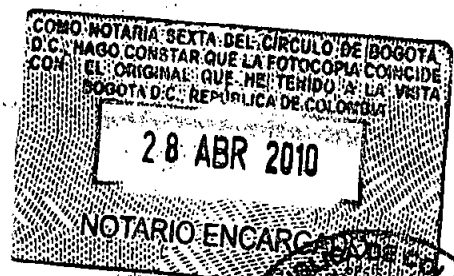
b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 26th of June, 2009
en/in Japan
por/by Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department

Firma

Signature



三代太郎

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR 2010

NOTARIO ENCARGADO



公証人

公証人

7

登簿平成 21 年第 387 号

当公証人は次の認証をする。

大塚製薬株式会社

知的財産部部長 鮫澤由夫

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。

上記の会社は日本国東京都千代田区神田司町 2

丁目 9 番地に所在し日本の法律に基づいて設立

された会社であることを東京法務局発行の証明

書によって相違ないことが認められるものであ

る。 _____

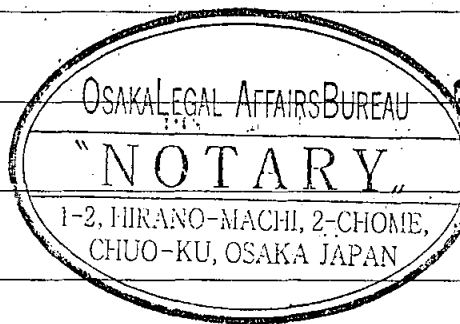
平成 21 年 6 月 26 日当公証人役場において

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

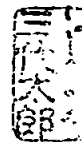
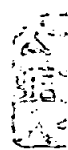
公証人

三枝英二



大阪法務局所





COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR 2010

NOTARIO ENCARGADO





8

Registration No. 387-2009

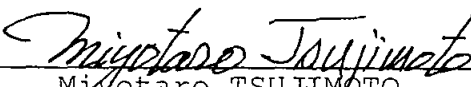
CERTIFICATE

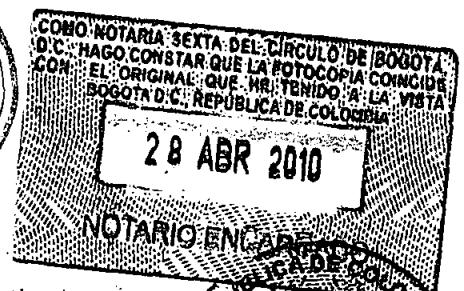
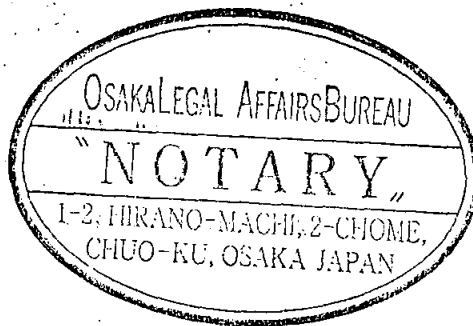
I, the undersigned, hereby certify :

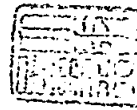
that Eiji SAEGUSA, a proxy for Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department of OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., has stated in my presence that Eiji SAEGUSA has acknowledged as true the signature of Yoshio SAMEZAWA on the attached REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY.

that the abovementioned company is a corporation located at 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan; and was established under the laws of Japan; as verified by the certificate issued by Tokyo District Legal Affairs Bureau.

Dated on this 26th day of June, 2009


Miyotaro TSUJIMOTO
Notary
Osaka Legal Affairs Bureau



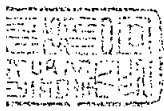


COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR 2010

NOTARIO ENCARGADO





9

総 第 2833 号

証 明

大阪法務局所属公証人

辻本 三代太郎

平成 21 年 6 月 26 日付

平成 21 年 登簿 第 387 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。

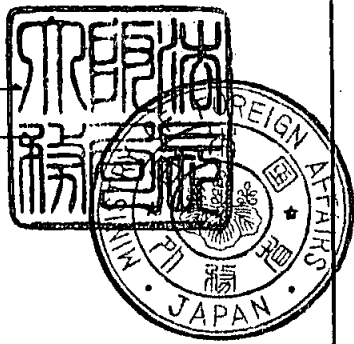
For legalization by the foreign consul in Japan,
this is to certify that the Seal affixed hereto
is genuine.

Osaka, JUN. 26 2009

Official
Ministry of Foreign Affairs
(Consular Service Division)

平成 21 年 6 月 26 日
平成 年 月 日

大阪法務局長 白石 研

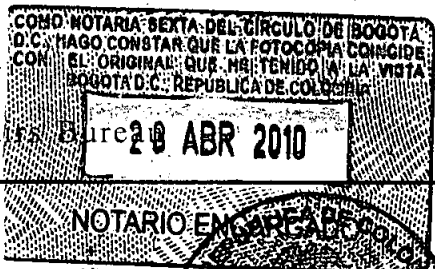


CERTIFICATE

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 JUN. 26. 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

016576

Jose Diaz
Cuya firma aparece en el
documento desempeña
las funciones indicadas

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 AGO -3 A 10:12

COLOMBIANAS
BOGOTA D.C.

EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

Tokio, Japón, JUNIO 30, 2009

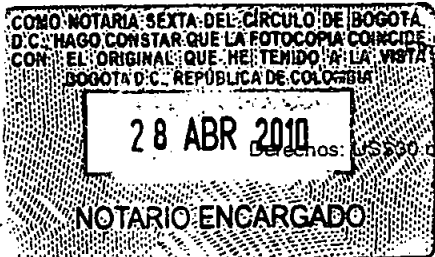
No. 173

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

JOSE FRANCISCO DIAZ VILLOA
Segundo Secretario
Encargado de Funciones Consulares



TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.04/09b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

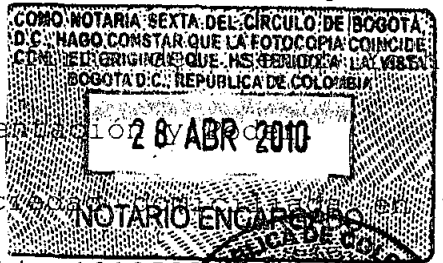
A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.**, domiciliada en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón, otorga derechos de representación y poder a los Doctores Luz Clemencia de Páez, 23555; Daniel Peña, tpa. 65620 y Germán Marín, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 26 de junio de 2009 en Japón por Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual.

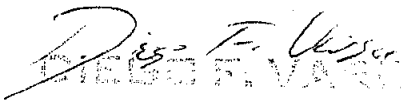
Firma Firma Ilegible

Registro No. 387 - 2009

CERTIFICADO

Yo, el suscrito, por el presente certifico:
que el señor Eiji SAEGUSA, apoderado de Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual de OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., ha declarado en mi presencia que Eiji SEAGUSA ha reconocido como verdadera la  io SAMEWAZA en el adjunto documento de Representación
que la anterior compañía es una sociedad  9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón, que fue constituida de conformidad con las leyes de Japón, lo que constata el certificado expedido por la Oficina de Registro de Japón de Tokio.

Fecha hoy 26 de junio de 2009


DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

Jl

Firma ilegible

Miyotaro TSUJIMOTO

Notario

Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Sello: Oficina de Asuntos Legales de Osaka

NOTARIO

1-2 HIRANO-MACHI, 2-CHOME,
CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

TEXTO EN JAPONÉS

CERTIFICADO

El presente es para certificar que el Certificado Notarial anexo fue suscrito por un Notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

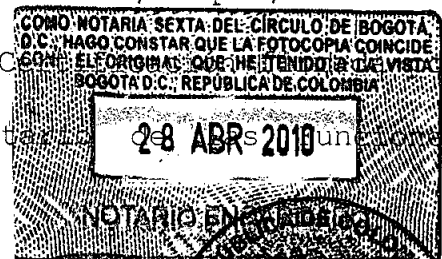
Fecha JUN.-26.2009

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Se anexa certificación No.173 expedida por la Sección Consular de la Embajada de Colombia en Tokio, Japón con fecha del 30 de junio de 2009 en donde se certifica la firma anterior del señor NORIKO KAWAHITO como funcionario del Ministerio de Relaciones Exteriores, Japón, así como el sello que aparece en el documento anexo.

José Francisco Díaz Ulloa, Segundo Secretario de Consulares. Pagados los Derechos Consulares.

Legalización de la firma anterior por parte de las Legalizaciones en Bogotá D.C. del Ministerio Exteriores con número **016576** con fecha del 3 de agosto



Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-155360\WPCL002H\COLO 14055-841-003-5

Diaz Ulloa
TRAMITE DE LEGALIZACION
ESPANOL - INGLES - INGLES - JAPON
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

SECRET

2009 AGO 11 A 9:27 019140

DILEO JALAS
CRA...
...
LAS...

100014

[illegible]

RECIBO DE CALIFICACION ^{3/3}

981183746596.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENDIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR 2010

NOTARIO ENCARGADO



Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned Hirofumi TAKEUCHI
domiciled (s) en/of

7-91, Awananishi, Gifu-shi, Gifu 5020006, Japan

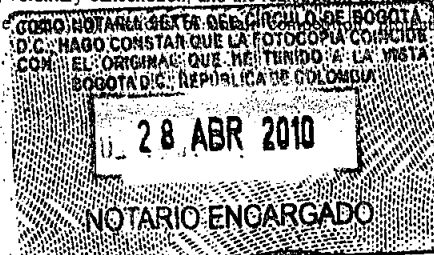
por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 DANIEL PEÑA, tpa.65620 y GERMAN MARIN tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4° N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos;

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 DANIEL PEÑA, tpa.65620 y GERMAN MARIN tpa. 64239, domiciled at Carrera 4° N° 72-35,

Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above



Handwritten marks and a small stamp in the top right corner.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR 2010

NOTARIO ENCARGADO



b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

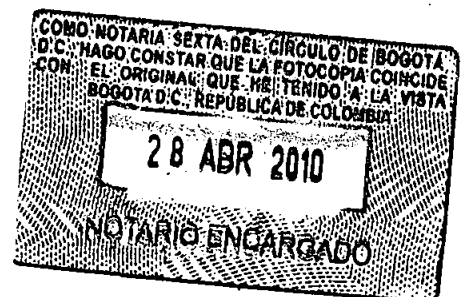
consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

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

Firma

Signature

H. Takeuchi





COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTÁ D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR 2010

NOTARIO ENCARGADO





登簿平成 21 年第 527 号

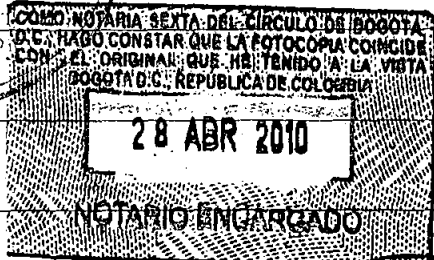
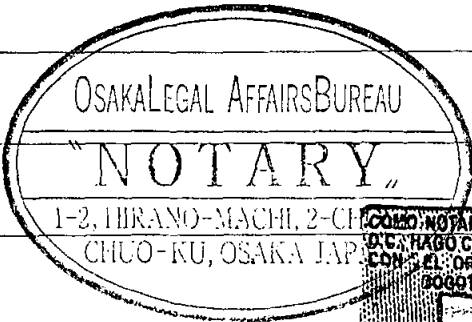
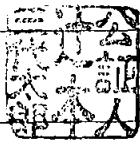
竹内 洋文

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
大阪市中央区平野町 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



大阪法務局所属 公証人役場

人

公
司
印
章

NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ

BOGOTÁ, D.C.

En el día veintiocho de abril del año dos mil diez

se otorgó en la ciudad de Bogotá, D.C., el presente

instrumento notarial

entre los señores

Don [Nombre], de legal edad, y

Don [Nombre]

[Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE ME TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA

28 ABR 2010

NOTARIO ENCARGADO

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Jaime Vargas
NOTARIO ENCARGADO
NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

BOGOTÁ, D.C. 28 de abril de 2010

Registration No. 527 - 2009

CERTIFICATE

I, the undersigned, hereby certify :

that Eiji SAEGUSA, a proxy for Hirofumi TAKEUCHI has stated
in my presence that Eiji SAEGUSA has acknowledged as true the signature
of Hirofumi TAKEUCHI on the attached REPRESENTATION AND POWER
-OF-ATTORNEY ;

Dated on this 8th day of September, 2009

Miyotaro Tsujimoto

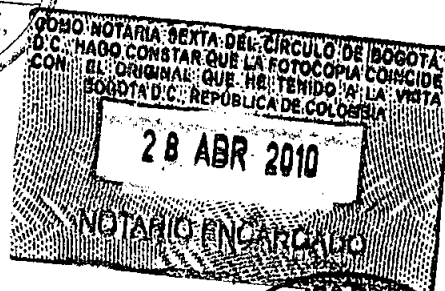
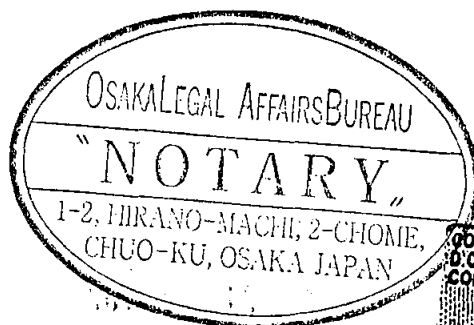
Miyotaro TSUJIMOTO

Notary

Osaka Legal Affairs Bureau

1-2, Hirano-Machi, 2-Chome

Chuo-ku, Osaka Japan





COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR 2010

NOTARIO ENCARGADO



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 527 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 here
is genuine.

Osaka, SEP. 9 2009

Mauro Rito

平成 21 年 9 月 9 日

平成 年 月 日

Official
Ministry of Foreign Affairs
(Consular Service Division)

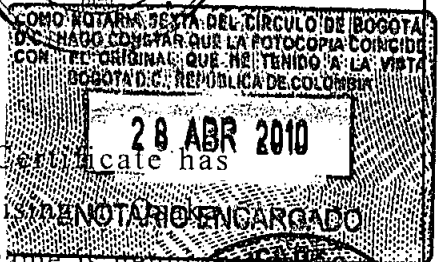
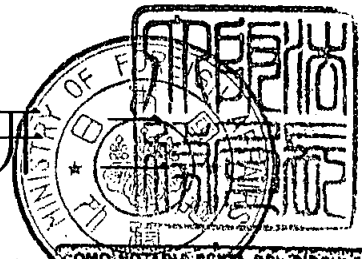
大阪法務局長 白石 研

CERTIFICATE

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

Date SEP. - 9. 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
See R P 122
001242

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
7009 OCT 30 11:33
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

Tokio, Japón, SEPTIEMBRE 11, 2009

No. 221

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 a sus actos oficiales.

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

28 ABR 2010
NOTARIO ENCARGADO

Jaime Vargas
Firma del Encargado de Funciones Consulares
JAIME FRANCISCO VAZQUELOA
Segundo Secretario
Encargado de Funciones Consulares



18

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 10.29/09 realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **Hirofumi TAKEUCHI**, domiciliado en 7-91, Awanonishi, Gifu-shi, Gifu 5020006, Japón, otorga derechos de Representación y Poder a los Doctores LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555; DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y Germán Marín, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 31 de agosto de 2009 en Japón por Hirofumi TAKEUCHI.

Firma Ilegible

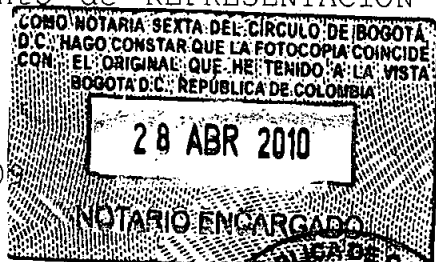
Registro No. 527-2009

CERTIFICADO

Yo, el suscrito, por el presente certifico:

Que Eiji SAEGUSA, un apoderado de Hirofumi TAKEUCHI ha declarado en mi presencia que Eiji SAEGUSA ha reconocido como auténtica la firma de Hirofumi TAKEUCHI en el adjunto documento de REPRESENTACIÓN Y PODER;

Fechado hoy 8 de Septiembre de 2009



Firma ilegible

Miyotaro TSUJIMOTO
Notario
Oficina de Asuntos Legales de
1-2, Hirano-Machi, 2-Chome
Chuo-ku, Osaka, Japón



Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

12

Texto en Japonés

CERTIFICADO

El presente es para certificar que el anexo Certificado Notarial ha sido suscrito por un Notario, debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón, y que el Sello Oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: SEP.-9-2009

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

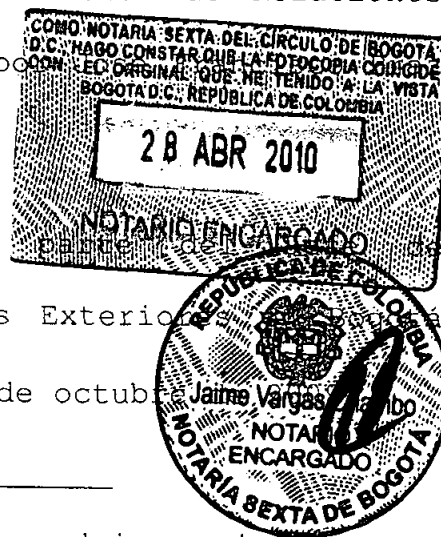
Sello: Para fines de legalización por parte de cónsul extranjero en Japón, por el presente se certifica que el sello anexo al presente es auténtico.

Osaka, 9 de septiembre de 2009 Firma Ilegible

Funcionario del
Ministerio de Relaciones Exteriores
(División del Servicio Consular)

Se anexa certificación No. 221 del 11 de septiembre de 2009 expedida por la Embajada de Colombia - Sección Consular por medio de la cual se certifica la firma del señor Noriko Kawahito en el anterior documento como funcionario del Ministerio de Relaciones Exteriores de Japón. Certificación firmada por Ulloa. Pagados los derechos consulares.

Legalización de la firma anterior por
Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores
D.C. bajo el número 001242 con fecha del 30 de octubre



Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-160497\WPCL002H\COLO 17257-841-001-8

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES 2 ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2009 NOV 5 13:11

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

081653

Diego Vargas
CUYA FIRMA AGENCE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
RECIBO LEGALIZACION
No. 9115133514424 1/2

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
28 ABR 2010
NOTARIO ENCARGADO



28.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 May 2009 (14.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/061003 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 9/127 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01) C12N 15/87 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

Gifu, 5028585 (JP). TOYOBUKU, Hidekazu [JP/JP];
c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 1-7-1,
Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 5410045 (JP).

(21) International Application Number:

PCT/JP2008/070642

(74) Agents: Saegusa & Partners et al.; Kitahama TNK
Building,, 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Os-
aka, 5410045 (JP).

(22) International Filing Date:

6 November 2008 (06.11.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

2007-291317 8 November 2007 (08.11.2007) JP

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): OT-
SUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. [JP/JP];
9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo,
1018535 (JP).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (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) Applicant and

(72) Inventor: TAKEUCHI, Hirofumi [JP/JP]; c/o GIFU
PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, 5-6-1, Mitahorahi-
gashi, Gifu-shi, Gifu, 5028585 (JP).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TOZUKA, Yuichi
[JP/JP]; c/o GIFU PHARMACEUTICAL UNIVERSITY,
5-6-1, Mitahorahigashi, Gifu-shi, Gifu, 5028585 (JP).
HIRA, Yasuyuki [JP/JP]; c/o GIFU PHARMACEUTI-
CAL UNIVERSITY, 5-6-1, Mitahorahigashi, Gifu-shi,

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
— with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

(54) Title: NUCLEIC ACID COMPLEX AND NUCLEIC ACID DELIVERY COMPOSITION

(57) Abstract: The present invention provides a nucleic acid complex with low toxicity and high safety that can persistently main-
tain a nucleic acid, such as siRNA or the like, in a cell; and a nucleic acid delivery composition that can efficiently deliver the
nucleic acid complex into a cell. A nucleic acid complex with low toxicity and high safety that can persistently maintain a nucleic
acid in a cell can be obtained by forming a complex using a nucleic acid to be introduced into a cell, and a highly branched cyclic
dextrin. Moreover, when a carrier comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) cholesterol and/or a derivative thereof, and (C)
an aliphatic primary amine is used as a nucleic acid delivery carrier to introduce the nucleic acid complex into a cell, the safety, the
efficiency of intracellular delivery, and the persistence of the nucleic acid in the cell can be further improved.

WO 2009/061003 A2

DESCRIPTION

NUCLEIC ACID COMPLEX AND NUCLEIC ACID DELIVERY COMPOSITION

5 TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a nucleic acid complex that can persistently reside in a cell and has low toxicity and high safety, and a composition for nucleic acid delivery.

10 BACKGROUND ART

With recent developments in biotechnology, a variety of nucleic acids exhibiting physiologically active functions in cells have been discovered. For example, it is known that siRNA (small interfering RNA) causes the degradation of the mRNA of a target gene in a cell, and interferes with the expression of the target gene (RNA interference). The inhibitory function on target gene expression due to such RNA interference is useful for the mitigation or treatment of disease symptoms caused by the abnormal expression of specific genes or gene clusters, and the development of therapeutic agents using siRNA is expected. However, since nucleic acids are water-soluble macromolecules having a negative charge, they have extremely low intracellular gene delivery efficiencies, resulting in inefficient therapeutic effects under gene therapies including siRNA therapies.

25 Use of a carrier (vector) has been known to efficiently deliver genes into cells. Vectors include viral vectors and non-viral vectors. Viral vectors have high nucleic acid introduction efficiency; however, there are various unknown safety aspects including pathogenicity, immunogenicity and cytotoxicity. Therefore, the use of non-viral vectors is desired for clinical applications.

Examples of non-viral vectors include LipofectamineTM2000, which is already commercially available. Further, a cationic lipid with a specific structure (see, Patent Document 1), and a composition (see, Patent Document 2) containing an

amphiphilic compound and a polycation have been reported. Intracellular nucleic acid delivery using a non-viral vector is conducted by first mixing the nucleic acid to be delivered with the non-viral vector to form a complex, and then bringing the
5 complex into contact with the target cell. When a non-viral vector can form a liposome, the vector is incorporated into a cell with a nucleic acid enveloped in the liposome, thereby conducting intracellular nucleic acid delivery.

Nucleic acids such as siRNA, however, have the specific
10 features of poor stability and a strong electric charge. Therefore, the nucleic acid has problematically reduced stability when mixed with a non-viral vector, inhibiting continuous nucleic acid introduction into a cell. Though an example in which a nucleic acid is entrapped in a liposome by forming a complex of
15 the siRNA and the cationic polymer has been known (see, Non-patent Document 1), it is not usable in practice in view of the cytotoxicity of the cationic polymer. Further, even when a stable complex can be formed using a known non-viral vector and a nucleic acid, the complex may have low intracellular delivery
20 ability or may be rapidly delivered into a cell. Therefore, such known non-viral vectors cannot persistently maintain the nucleic acid in the cell; which fails to keep the desired effects obtained by the nucleic acid.

In light of the prior art, the development of
25 techniques for efficiently delivering a nucleic acid (e.g., siRNA) into a cell and for persistently maintaining the nucleic acid with low toxicity and high safety has been desired.

Patent Document 1: Japanese Unexamined Patent Publication No. 2002-529439

30 Patent Document 2: Japanese Unexamined Patent Publication No. 2005-508394

Non-patent Document 1: Kentaro Kogure et al., Development of a non-viral-multifunctional-envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method, J. Control. Release, 98 (2004) 317-
35 323

DISCLOSURE OF THE INVENTION

PROBLEMS TO BE SOLVED BY THE INVENTION

21

An object of the present invention is to solve the
5 problems of the prior art. Specifically, an object of the present
invention is to provide a nucleic acid complex with low toxicity
and high safety that can persistently maintain a nucleic acid,
such as siRNA or the like, in a cell; and a nucleic acid delivery
composition that can efficiently deliver the nucleic acid complex
10 into a cell. Another object of the present invention is to
provide a pharmaceutical composition comprising a nucleic acid
delivery composition, and a method for delivering a nucleic acid
into a cell by bringing a nucleic acid delivery composition into
contact with the cell.

15

MEANS FOR SOLVING THE PROBLEMS

The present inventors conducted extensive research to
solve the above problems, and found that a nucleic acid complex
with low toxicity and high safety that can persistently maintain
20 a nucleic acid in a cell can be obtained by forming a complex
using the nucleic acid to be introduced into the cell and a
highly branched cyclic dextrin. The present inventors further
found that the safety, effectiveness of intracellular delivery,
and intracellular persistence of a nucleic acid can be further
25 improved by using, as a nucleic acid delivery carrier for
introducing the nucleic acid complex into a cell, a carrier
comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) cholesterol
and/or a derivative thereof, and (C) an aliphatic primary amine.
The present invention was accomplished by conducting further
30 research based on these findings.

The present invention provides the following items:

Item 1. A nucleic acid complex comprising a nucleic
acid and a highly branched cyclic dextrin.

Item 2. The nucleic acid complex according to Item 1,
35 wherein the amount of the highly branched cyclic dextrin is 1 to

4000 parts by weight per part by weight of the nucleic acid.

Item 3. The nucleic acid complex according to Item 1 or 2, wherein the nucleic acid is siRNA.

Item 4. The nucleic acid complex according to any one
5 of Items 1 to 3, wherein the highly branched cyclic dextrin is a glucan with a degree of polymerization of 50 to 5000 having an inner branched cyclic structure portion formed from α -1,4-glucoside bonds and at least one α -1,6-glucoside bond, and an outer branched structure portion bound to the inner branched
10 cyclic structure portion.

Item 5. The nucleic acid complex according to any one of Items 1 to 4, which is an aggregate obtained by mixing a nucleic acid with a highly branched cyclic dextrin in an aqueous solution.

15 Item 6. A nucleic acid delivery composition comprising the nucleic acid complex according to any one of Items 1 to 5 and a nucleic acid delivery carrier.

Item 7. The nucleic acid delivery composition according to Item 6, wherein the nucleic acid delivery carrier is a
20 composition comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) at least one member selected from cholesterol and derivatives thereof, and (C) an aliphatic primary amine.

Item 8. The nucleic acid delivery composition according to Item 7, wherein Component (A) in the nucleic acid delivery
25 carrier is a diacylphosphatidylcholine in which the acyl moiety has 4 to 23 carbon atoms.

Item 9. The nucleic acid delivery composition according to Item 7, wherein Component (B) in the nucleic acid delivery carrier is cholesterol.

30 Item 10. The nucleic acid delivery composition according to Item 7, wherein Component (C) in the nucleic acid delivery carrier is an alkylamine having 10 to 20 carbon atoms.

Item 11. The nucleic acid delivery composition according to Item 7, wherein the molar ratio of Components
35 (A):(B):(C) is 5-9:1-5:1.

23

Item 12. The nucleic acid delivery composition according to Item 7, wherein the nucleic acid delivery carrier is a liposome preparation in which a liposome membrane is formed from Components (A) to (C).

5 Item 13. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid delivery composition according to any one of Items 6 to 12.

Item 14. The pharmaceutical composition according to Item 13, wherein the nucleic acid is siRNA.

10 Item 15. Use of the nucleic acid delivery composition according to any one of Items 6 to 12 to produce a pharmaceutical for delivering a nucleic acid into a cell.

Item 16. The use according to Item 15, wherein the nucleic acid is siRNA.

15 Item 17. A method for delivering a nucleic acid into a cell, the method comprising the step of bringing the nucleic acid delivery composition according to any one of Items 6 to 12 into contact with the cell.

Item 18. The method according to Item 17, wherein the
20 nucleic acid is siRNA.

EFFECTS OF THE INVENTION

The nucleic acid complex of the present invention is obtained by forming a nucleic acid into a complex using a highly
25 branched cyclic dextrin, thereby making it possible for the nucleic acid complex to be highly safe and to be able to stably maintain the nucleic acid in a cell for a long period of time so that useful effects based on the nucleic acid can be persistently exhibited. Further, the nucleic acid complex of the present
30 invention can be readily formed into a complex with a nucleic acid delivery carrier, and can be easily encapsulated even in a nucleic acid delivery carrier in liposome form. The complex of the present invention is therefore also excellent in ease of formulation into a nucleic acid delivery composition. Furthermore,
35 the nucleic acid delivery composition of the present invention

can introduce the nucleic acid complex into a cell.

For delivering the nucleic acid complex of the present invention into a cell, the use of a carrier comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) cholesterol and/or a derivative thereof, and (C) an aliphatic primary amine, as a carrier for intracellular delivery can increase the efficiency of intracellular delivery of the nucleic acid complex, and can further improve the persistence and safety of such intracellular delivery.

As described above, the nucleic acid complex and nucleic acid delivery composition of the present invention can exhibit useful effects based on the nucleic acid effectively, persistently, and with high safety; therefore, the complex and composition are particularly useful as pharmaceuticals for gene therapy. Thus, the pharmaceutical composition or method of delivering a nucleic acid into a cell according to the present invention can deliver a nucleic acid into a cell more effectively.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The present invention is described below in detail.

(1) Nucleic Acid Complex

The nucleic acid complex of the present invention comprises a nucleic acid and a highly branched cyclic dextrin.

The nucleic acid used for the nucleic acid complex of the present invention is not limited by the type or structure, as long as it needs to be delivered into the cell. Specific examples of such nucleic acids include siRNA, mRNA, tRNA, rRNA, cDNA, miRNA (microRNA), ribozymes, antisense oligos, decoy oligonucleotides, plasmid DNA, peptide nucleic acids, triplex-forming oligonucleotides (TFOs), aptamers, genes, etc., among which siRNA is preferable. siRNA has the disadvantage of low stability in the presence of heretofore known non-viral vectors, but when siRNA is formed into the nucleic acid complex of the present invention, it has the ability to be continuously delivered into a cell as well as having excellent stability. The

nucleic acid used in the nucleic acid complex of the present invention may be derived from humans, animals, plants, bacteria, viruses, or the like, or may be chemically synthesized. Such nucleic acids may be single-stranded, double-stranded, or triple-
5 stranded, and are not limited by the molecular weight. Further, in the present invention, nucleic acids modified with chemicals, enzymes, or peptides can be used. Furthermore, in the present invention, nucleic acids can be used singly or in a combination of two or more.

10 The highly branched cyclic dextrin used in the nucleic acid complex of the present invention is produced by allowing a branching enzyme to act on a saccharide having α -1,4-glycoside bonds and at least one α -1,6-glycoside bond, such as amylopectin, and is a glucan with a degree of polymerization of 50 to 5000
15 having an inner branched cyclic structure portion and an outer branched structure portion. The inner branched cyclic structure portion is a cyclic structure portion formed from α -1,4-glycoside bonds and at least one α -1,6-glycoside bond; and the outer branched structure portion is a non-cyclic structure portion
20 bound to the inner branched cyclic structure portion. The outer branched structure portion is bound to the inner branched cyclic structure portion via at least one α -1,6-glycoside bond. Preferable forms of the highly branched cyclic dextrin include the above-mentioned glucan in which the inner branched cyclic
25 structure portion has a degree of polymerization of 10 to 100, the above-mentioned glucan in which the outer branched structure portion has a degree of polymerization of 40 or more, and the above-mentioned glucan in which the unit chains of the outer branched structure portion have an average degree of
30 polymerization of 10 to 20. The highly branched cyclic dextrin can be illustrated as in, for example, Fig. 1 in which the inner branched cyclic structure portion is indicated by (i) and the outer branched structure portion is indicated by (ii).

35 The degree of polymerization can be determined by gel filtration using a differential refractometer, from the elution

26

position of a material whose degree of polymerization is known.
In this determination, the output of a differential refractometer
is proportional to the concentration of the glucan, and the
output of a low-angle laser light scattering photometer is
5 proportional to the product of the degree of polymerization and
concentration of the glucan. Therefore, the degree of
polymerization of the glucan can be determined by measuring the
ratio of the outputs of the two detectors, i.e., a differential
refractometer and a low-angle laser light scattering photometer.
10 The specific conditions are described in US6248566B1 (Japanese
Patent No. 3107358).

The highly branched cyclic dextrin and the production
process therefor are described in US6248566B1 (Japanese Patent No.
3107358), and the highly branched cyclic dextrin is sold under
15 the registered trademark of "Cluster Dextrin" by Ezaki Glico Co.,
Ltd.

In the nucleic acid complex of the present invention,
the ratio of the highly branched cyclic dextrin to the nucleic
acid is not limited, but is usually 1 to 4000 parts by weight,
20 preferably 10 to 1000 parts by weight, and more preferably 100 to
400 parts by weight, of the highly branched cyclic dextrin per
part by weight of the nucleic acid. In terms of molar ratio, the
above ratio is, for example, 0.1 to 1000 mol, preferably 1 to 100
mol, and more preferably 10 to 20 mol, of the highly branched
25 cyclic dextrin per mol of the nucleic acid. Satisfying such a
ratio makes it possible to render more remarkable the continuity
of intracellular delivery of nucleic acid by a nucleic acid
delivery carrier, and the safety thereof.

The average particle diameter of the nucleic acid
30 complex of the present invention is usually 6 to 60 nm,
preferably 8 to 30 nm, and more preferably 10 to 20 nm. The
average particle diameter of the nucleic acid complex is measured
as a volume average particle diameter using a dynamic laser light
scattering method.

35 The nucleic acid complex of the present invention is a

complex formed by aggregation of the nucleic acid and the highly branched cyclic dextrin. The nucleic acid complex of the present invention is produced by mixing the nucleic acid and highly branched cyclic dextrin in a solution that can stably disperse the two compounds. Specific examples of solutions that can stably disperse the nucleic acid and highly branched cyclic dextrin include buffers such as Tris and the like. The buffers may contain chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and the like. The conditions for mixing the nucleic acid and the highly branched cyclic dextrin may be such that, in the above-mentioned solution, for example, about 0.1 μM to about 100 μM , preferably about 1 μM to about 10 μM , of the nucleic acid are mixed with about 1 μM to about 1000 μM , and preferably about 10 μM to about 100 μM , of the highly branched cyclic dextrin, at room temperature for about 1 to about 100 minutes, and preferably about 5 to about 10 minutes. The thus produced nucleic acid complex of the present invention is present as a dispersion in the solution. The dispersion can be mixed as it is, or after dilution or concentration if necessary, with a nucleic acid delivery carrier.

(2) Nucleic Acid Delivery Composition

The nucleic acid complex is incorporated into a nucleic acid delivery carrier by being mixed with the nucleic acid delivery carrier, and thereby the nucleic acid is enabled to be delivered into a cell. That is, the present invention also provides a nucleic acid delivery composition comprising the nucleic acid complex and a nucleic acid delivery carrier.

The nucleic acid delivery carrier is a non-viral vector used as a nucleic acid carrier to deliver (introduce) a nucleic acid into a cell. The nucleic acid delivery composition is a composition used for bringing the nucleic acid into contact with the cell into which the nucleic acid is to be delivered, in order to introduce the nucleic acid contained in the composition into the cell.

Formulation of Nucleic Acid Delivery Carrier

The nucleic acid delivery carrier used in the nucleic acid delivery composition of the present invention is not limited as long as it is capable of incorporating a nucleic acid into a cell. Examples of usable nucleic acid delivery carriers include known carriers such as LipofectamineTM 2000 and the like.

From the viewpoint of the further improvement of the intracellular persistence of the nucleic acid contained in the nucleic acid complex, and the further improvement of the efficiency and safety of intracellular delivery, it is preferable to use, for example, a carrier comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) cholesterol and/or a derivative thereof, and (C) an aliphatic primary amine (hereinafter referred to as "Carrier 1").

The diacylphosphatidylcholine (hereinafter sometimes referred to as "Component (A)") used in Carrier 1 is not limited as long as it is pharmacologically acceptable, and may be, for example, a diacylphosphatidylcholine in which the acyl moiety has 4 to 23 carbon atoms. The carbon numbers of the two acyl groups constituting the diacylphosphatidylcholine may be the same or different.

Specific examples of diacylphosphatidylcholines include dilauroylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylcholine, dilinoleoylphosphatidylcholine, myristoylpalmitoylphosphatidylcholine, myristoylstearylphosphatidylcholine, palmitoylstearylphosphatidylcholine, dibutyloylphosphatidylcholine, dihexanoylphosphatidylcholine, diheptanoylphosphatidylcholine, didecanoylphosphatidylcholine, diphthanoylphosphatidylcholine, didodecylphosphatidylcholine, dieicosanoylphosphatidylcholine, dihenicosanoylphosphatidylcholine, dierucoylphosphatidylcholine, diarachidonoylphosphatidylcholine,

-11-

bis(tricosadinoyl)phosphatidylcholine, etc. Among these, preferable examples include diacylphosphatidylcholines in which the acyl moiety has 12 to 18 carbon atoms; more preferable examples include dimyristoylphosphatidylcholine, 5 dipalmitoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine, myristoylpalmitoylphosphatidylcholine, myristoylstearoylphosphatidylcholine, palmitoylstearoylphosphatidylcholine, and like diacylphosphatidylcholines in which the acyl moiety has 13 to 17 10 carbon atoms; particularly preferable examples include dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, and distearoylphosphatidylcholine; and the most preferable examples include distearoylphosphatidylcholine. Such diacylphosphatidylcholines may be used singly or in a combination 15 of two or more.

Cholesterol and/or a derivative thereof (hereinafter sometimes referred to as "Component (B)") used in Carrier 1 is not limited as long as it is pharmacologically acceptable. Derivatives of cholesterol are cationic lipids with a cholesterol 20 skeleton, and specific examples include 3β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol (DC-Chol), 3β -[N',N',N'-trimethylaminoethane]cholesterol iodide (TC-Chol), bis(guanidinium)-tren-cholesterol (BGTC), N-cholesteryloxycarbonyl-3,7-diaza-nonan-1,9-diamine, β -alanine- 25 diethanolamine-cholesterol, N⁴-spermine cholesteryl carbamate (GL-67), N[N⁴-3-aminopropylspermidine]cholesteryl carbamate (GL-78), N⁴-spermine cholesteryl carboxamide (GL-90), N1,N8-bis(arginine carboxamide)-N⁴-spermidine cholesteryl carbamate (GL-95), and N-[N¹,N⁴,N⁸-tris(3-aminopropyl)spermidine]cholesteryl 30 carbamate (GL-96). Preferable examples of Component (B) include cholesterol. In Carrier 1, cholesterol and derivatives thereof can be used singly or in a combination of two or more as Component (B).

The aliphatic primary amine (hereinafter sometimes 35 referred to as "Component (C)") used in Carrier 1 is not limited

as long as it is pharmacologically acceptable, and may be, for example, an alkylamine in which the alkyl moiety has 10 to 20 carbon atoms.

Specific examples of aliphatic primary amines include
5 laurylamine, myristylamine, palmitylamine, stearylamine, oleylamine, decanoylamine, phthanoylamine, etc. Among these, alkylamines in which the alkyl moiety has 12 to 18 carbon atoms are preferable; stearylamine, oleylamine, and palmitoylamine are more preferable; and stearylamine is especially preferable. These
10 aliphatic primary amines may be used singly or in a combination of two or more.

Carrier 1 comprises a combination of Components (A) to (C) described above. In order to further improve the efficiency of intracellular delivery of a nucleic acid, and further reduce
15 the toxicity, the following combinations are preferable:
(A) a diacylphosphatidylcholine in which the acyl moiety has 4 to 23 carbon atoms, (B) cholesterol and/or a derivative thereof, and (C) a C₁₀₋₂₀ alkylamine; and more preferably, (A) dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine,
20 and/or distearoylphosphatidylcholine, (B) cholesterol, and (C) stearylamine.

In Carrier 1, the ratio of Components (A) to (C) is not limited, and may be, for example, a Components (A):(B):(C) molar ratio of 5-9:1-5:1, preferably 6-9:1-4:1, and more preferably
25 7-8:2-3:1. Satisfying such a ratio makes it possible to achieve intracellular nucleic acid delivery with more improved efficiency and lower toxicity.

The total amount of Components (A) to (C) in the total amount of Carrier 1 is, for example, 1 to 100 wt.%, preferably 20
30 to 90 wt.%, and more preferably 30 to 70 wt.%.

Carrier 1 may contain, in addition to Components (A) to (C), other cationic lipids. Specific examples of usable cationic lipids include 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, 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxy)-5 β -cholan-24-(N,N-bis(2-cyanoethyl)amine)), 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxy)-5 β -cholan-24-(N-(benzyloxycarbonyl)-N-(3-hydroxypropyl)amine), and like cationic lipids to which steroids are bound; umbrella-
- 5 spermine conjugates and like cationic lipids to which cholic acid is bound; cationic lipids to which sterol glycoside is bound; cationic lipids to which steroid saponin is bound; dimethyldioctadecylammonium bromide salt (DDAB), 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium propane, 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium
- 10 propane (DOTAP), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane methylsulfate, 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium propane, 1,2-distearoyl-3-trimethylammonium propane, N-(1-(2,3-bis(oleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium hydrochloride (DOTMA), dimyristoyloxypropyl dimethylhydroxyethylammonium
- 15 bromide salt (DMRIE), dioleoyloxypropyl dimethylhydroxyethylammonium bromide (DORIE), dimethyldidodecylammonium bromide, N-(α -trimethylammonioacetyl)didodecyl-D-glutamine hydrochloride, N-(α -trimethylammonioacetyl)-O,O'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl)-L-glutamine hydrochloride, O,O'-didodecanoyl-N-(α -
- 20 trimethylammonioacetyl)diethanolamine hydrochloride, methylallyl didodecyl ammonium bromide, N-{p-(w-trimethylammoniobutyloxy)benzoyl}-didodecyl-L-glutamine hydrochloride, 9-(w-trimethylammoniobutyl)-3,6-
- 25 bis(dodecanoyl)carbazole bromide, dimethyldioctadecyl ammonium hydrochloride, N-w-trimethylammoniodecanoyl-dihexadecyl-D-glutamine bromide, N-{p-(w-trimethylammoniohexyloxy)-benzoyl}-ditetradecyl-L-glutamine bromide, p-(w-trimethylammoniodecyloxy)-p'-octyloxyazobenzene bromide salt (MC-1-0810), p-(w-(b-
- 30 hydroxyethyl)dimethyl-ammonio-decyloxy)-p'-octyloxyazobenzene bromide salt (MC-3-0810), O,O',O''-tridodecanoyl-N-(w-trimethylammoniodecanoyl)-tris(hydroxymethyl)aminomethane bromide salt (TC-1-12), 1,2-dilauryl-glycero-3-ethylphosphocholine, 1,2-dimyristoyl-glycero-3-ethylphosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-
- 35 glycero-3-ethylphosphocholine, 1,2-distearoyl-glycero-3-

ethylphosphocholine, 1,2-dioleoyl-glycero-3-ethylphosphocholine, 1-palmitoyl-2-oreoyl-glycero-3-ethylphosphocholine, and like quaternary ammonium salt-type cationic lipids; etc.

When Carrier 1 contains a cationic lipid other than
5 Components (A) to (C), the proportion of the cationic lipid is not limited as long as the effects of the present invention are not impaired, and may be, for example, 1 to 10 parts by weight, preferably 2 to 8 parts by weight, and more preferably 4 to 6 parts by weight, per 100 parts by weight of Components (A) to (C)
10 in total.

Carrier 1 may further contain an oily base, if necessary. The addition of an oily base to use its properties enables control of the efficiency of nucleic acid introduction by Carrier 1. For example, when an oily base is added to adjust the
15 specific gravity of Carrier 1, the contact of a cell with Carrier 1 can be controlled, thereby improving the introduction efficiency in vitro. Further, for example, when an oily base with a temperature sensitivity function is added, the core of the nucleic acid carrier can be disintegrated under predetermined
20 temperature conditions to induce fluctuations in the cell surface, thereby improving the nucleic acid introduction efficiency. Furthermore, for example, when an oily base that has an ability to be disrupted by an external stimulus is added, the core of Carrier 1 can be disintegrated by an external stimulus to induce
25 fluctuations in the cell surface, thereby improving the nucleic acid introduction efficiency.

Examples of oily bases that can be added to Carrier 1 include perfluorocarbon, perfluoropentane, perfluorooctyl bromide, perfluorohexane, perfluorotributylamine, soybean oil, refined
30 soybean oil, hydrogenated soybean oil, unsaponified soybean oil, squalene, castor oil, clove oil, sorbitan trioleate, turpentine oil, safflower oil, safflower oil fatty acid, oleic acid, palm oil, rapeseed oil, fusel oil, olive oil, linseed oil, sesame oil, chlorophyll oil, croton oil, bergamot oil, cedar oil, orange oil,
35 fennel oil, eucalyptus oil, corn oil, lavender oil, marjoram oil,

lemon oil, cotton seed oil, coconut 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, ginger oil, Roman chamomile oil, snake oil, spearmint oil, 5 sunflower oil, cacao butter, wheat germ oil, zinc oxide oil, hardened oils, hydrogenated vegetable oils, light liquid paraffin, liquid paraffin, medium chain fatty acid triglycerides, mink oil, bitter orange oil, polyoxyethylene castor oil, polyoxyethylene hydrogenated castor oil, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 10, 10, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 100, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 20, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 40, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 5, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 50, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 60, polyoxyl 35 castor oil, process oils, 15 etc. Among such oily bases, perfluoropentane is temperature sensitive, and has the property of boiling at 29.5°C and thereby becoming a gas. Further, perfluorohexane, perfluorooctyl bromide, and perfluorotributylamine have an ability to be disrupted by an external stimulus, and have the property of causing cavitation in 20 the core of Carrier 1 and disintegrating it when receiving an external stimulus such as ultrasonic irradiation.

When an oily base is contained, the proportion thereof is not limited as long as the effects of the present invention are not impaired, and may be, for example, 0.1 to 50 parts by 25 weight, preferably 1 to 30 parts by weight, and more preferably 5 to 20 parts by weight, per 100 parts by weight of Components (A) to (C) in total.

Carrier 1 may further contain a membrane-fusogenic lipid (helper lipid) if necessary. When containing a membrane-fusogenic lipid, Carrier 1 has further improved intracellular 30 nucleic acid delivery efficiency. Examples of such membrane-fusible lipids include dioleoylphosphatidylethanolamine, dioleoylphosphatidylcholine, transphosphatidylphosphatidylethanolamine, 1,2-bis-(10,12-tricosadinoyl)-phosphoethanolamine, 1,2- 35

dielaidoylphosphoethanolamine, 1,2-dihexadecylphosphoethanolamine,
 1,2-dihexanoylphosphoethanolamine, 1,2-
 dilauroylphosphoethanolamine, 1,2-dilinoeoylphosphoethanolamine,
 1,2-dimyrystoylphosphoethanolamine, 1,2-
 5 dioleoylphosphoethanolamine, 1,2-
 dipalmitoleoylphosphoethanolamine, 1,2-
 dipalmitoylphosphoethanolamine, 1,2-
 diphytanoylphosphoethanolamine, 1,2-distearoylphosphoethanolamine,
 1-palmitoyl-2-oleoylphosphoethanolamine, 1-palmitoyl-2-(10,12-
 10 tricosadinoyl)phosphoethanolamine, 1,2-
 dioleoylphosphoethanolamine-N-caproylamine, 1,2-
 dipalmitoylphosphoethanolamine-N-caproylamine, 1,2-
 dioleoylphosphoethanolamine-N,N-dimethyl, 1,2-
 dipalmitoylphosphoethanolamine-N,N-dimethyl, 1,2-
 15 dipalmitoylphosphoethanolamine-N-dodecanoyl, 1,2-
 dioleoylphosphoethanolamine-N-dodecanoyl, 1,2-
 dioleoylphosphoethanolamine-N-dodecanylamine, 1,2-
 dipalmitoylphosphoethanolamine-N-dodecanylamine, 1,2-
 dioleoylphosphoethanolamine-N-glutaryl, 1,2-
 20 dipalmitoylphosphoethanolamine-N-glutaryl, 1,2-
 dioleoylphosphoethanolamine-N-lactose, 1,2-
 dioleoylphosphoethanolamine-N-[4(p-maleimidemethyl)cyclohexane-
 carboxylate], dipalmitoylphosphoethanolamine-N-[4(p-
 maleimidemethyl)cyclohexane-carboxylate], 1,2-
 25 dipalmitoylphosphoethanolamine-N-[4(p-maleimidephenyl)butylamide],
 1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-[4(p-maleimidephenyl)butyrate],
 1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-methyl,
 dipalmitoylphosphoethanolamine-N-methyl, 1,2-
 dioleoylphosphoethanolamine-N-[3-(2-pyridyldithio)propionate],
 30 1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-[3-(2-
 pyridyldithio)propionate], 1,2-dioleoylphosphoethanolamine-N-
 (succinyl), 1,2-dipalmitoylphosphoethanolamine-N-(succinyl), etc.
 Among such lipids, dioleoylphosphatidylethanolamine can be
 advantageously used in Carrier 1.

35 When such a membrane-fusogenic lipid is contained, the

35

proportion thereof is not limited as long as the effects of the present invention are not impaired, and may be, for example, 1 to 500 parts by weight, preferably 10 to 250 parts by weight, and more preferably 25 to 100 parts by weight, per 100 parts by weight of Components (A) to (C) in total.

Carrier 1 may contain various additives such as isotonizing agents, excipients, diluents, thickeners, stabilizers, buffers, preservatives, etc.; and/or aqueous vehicles such as purified water, aqueous sugar solutions, buffer solutions, physiological saline, aqueous polymer solutions, RNase free water, etc.; according to the form of use. The amounts of such additives and aqueous vehicles to be added can be suitably selected according to the form of use of the nucleic acid delivery carrier.

15 Form of Nucleic Acid Delivery Carrier

The form of the nucleic acid delivery carrier is not limited as long as the nucleic acid to be delivered into a cell can be encapsulated, but is preferably in the form of a liposome. For example, when Carrier 1 is in the form of a liposome, Components (A) to (C), and optionally used other lipids, form a liposome membrane.

When the nucleic acid delivery carrier is in the form of a liposome, it may be a small unilamellar vesicle (SUV), a large unilamellar vesicle (LUV), or a multilamellar vesicle (MLV). The particle diameter of the nucleic acid delivery carrier can be suitably selected according to the type of the cell into which the nucleic acid is delivered, and may be, for example, about 20 to about 100 nm for SUV, about 200 to about 1000 nm for LUV, and about 400 to about 3500 nm for MLV. The particle diameter of the liposome is measured using a dynamic laser light scattering method.

Methods known in the art can be used to produce the liposome and adjust the particle diameter of the liposome. For example, in the case of Carrier 1, a liposome can be formed by a thin film method, a reversed phase evaporation method, an ether

injection method, a surfactant method, and a heating method, or the like, using an oil phase containing Components (A) to (C) and an aqueous phase (aqueous vehicle). The particle diameter can be adjusted by an extrusion method, a French press method, a
5 homogenization method, or the like.

Form, Formulation, and Method of Use of the Nucleic Acid Delivery Composition

When the nucleic acid delivery carrier is in the form
10 of a liposome, the nucleic acid complex in the nucleic acid delivery composition of the present invention may be present in a state encapsulated within the internal aqueous phase of the liposome, or in a state bound to the inner or outer surface of the liposome membrane by an ionic or hydrophobic bond. When the
15 nucleic acid delivery carrier is in a form other than a liposome, the nucleic acid complex in the nucleic acid delivery composition of the present invention forms a complex with components of the nucleic acid delivery carrier through an ionic or hydrophobic bond.

20 The nucleic acid delivery composition of the present invention is produced by mixing the nucleic acid complex with the nucleic acid delivery carrier and formulating the mixture into a desired form, or by mixing the components of the nucleic acid complex and the nucleic acid delivery carrier composition in an
25 arbitrary order and formulating the mixture into a desired form.

In the nucleic acid delivery composition of the present invention, the ratio of the nucleic acid complex to the nucleic acid delivery carrier depends on the type of the nucleic acid complex, the type of the nucleic acid delivery carrier, and the
30 type of the cell into which the nucleic acid is delivered, etc. The ratio may be, for example, 1 to 100 parts by weight, preferably 10 to 100 parts by weight, and more preferably 20 to 100 parts by weight, of the nucleic acid complex per 100 parts by weight of the total amount of the nucleic acid delivery carrier.
35 More specifically, when Carrier 1 is used as the nucleic acid

delivery carrier, the ratio may be, for example, 1 to 100 parts by weight, preferably 10 to 100 parts by weight, and more preferably 20 to 100 parts by weight, of the nucleic acid complex per 100 parts by weight of the total amount of Components (A) to
5 (C) contained in Carrier 1.

Further, when Carrier 1 is used as the nucleic acid delivery carrier, the total amount of Components (A) to (C) contained in Carrier 1 may be, for example, 10 to 90 wt.%, preferably 30 to 80 wt.%, and more preferably 40 to 60 wt.%,
10 relative to the total amount of the nucleic acid delivery composition.

The nucleic acid delivery composition of the present invention may contain various additives such as isotonizing agents, excipients, diluents, thickeners, stabilizers, buffers,
15 preservatives, etc.; and/or aqueous vehicles such as purified water, aqueous glucose solutions, buffer solutions, physiological saline, etc.; according to the form of use. The amounts of such additives and aqueous vehicles can be suitably selected according to the form of use of the nucleic acid delivery composition.

20 The nucleic acid delivery composition of the present invention can be used by itself as a pharmaceutical for gene therapy, i.e., as a pharmaceutical composition. When the nucleic acid delivery composition of the present invention is used as a pharmaceutical composition, a nucleic acid delivery carrier, base,
25 vehicle, etc. that are pharmacologically acceptable are selected. The pharmaceutical composition of the present invention may be formulated into various pharmaceutical forms. Examples of the form of the pharmaceutical composition of the present invention include liquid preparations such as solutions (including syrups
30 and the like), drops, injections, etc.; and solid preparations such as tablets, pills, powders, granules, capsules (including soft capsules), etc. When the pharmaceutical composition of the present invention is a liquid preparation, it can be preserved by freezing or by lyophilization or the like to remove water.
35 Lyophilized preparations, dry syrups, etc. may be re-dissolved at

the time of use in distilled water for injection, sterilized water, etc. When the pharmaceutical composition of the present invention is a solid preparation, it may be re-dissolved at the time of use in distilled water for injection, sterilized water, etc.

In the present invention, the cell into which a nucleic acid is delivered, i.e., the cell to which the pharmaceutical composition of the present invention is applied, is not limited, and may be a cultured cell, a cell isolated from an organism (including established cell lines), a cell in vivo, etc., and may be derived from a human or a non-human animal. The pharmaceutical composition of the present invention may be applied either in vitro or in vivo.

In the present invention, a nucleic acid can be delivered into a cell through the step of bringing the pharmaceutical composition of the present invention into contact with the cell. The method for bringing the pharmaceutical composition into contact with a cell is not limited, as long as a suitable amount of the nucleic acid delivery composition is brought into contact with the cell into which the nucleic acid is to be introduced. For example, the method may be the same as a hitherto known method in gene therapy, and the same applies to the amount to be brought into contact: the method and amount are suitably selected. Thus, application of the pharmaceutical composition of the present invention to a cell enables easy intracellular delivery of a nucleic acid, and maintains the delivered nucleic acid stably and persistently in the cell.

For example, to bring the pharmaceutical composition of the present invention into contact with a cell in vitro, the cell can be cultured in the presence of a suitable amount of the pharmaceutical composition. To bring the pharmaceutical composition of the present invention into contact in vitro with a cultured cell or a cell isolated from an organism, the contact can be carried out in the presence of blood serum. When the pharmaceutical composition of the present invention is brought

into contact with a cell in vivo, the pharmaceutical composition of the present invention may be brought into contact with the cell by, for example, direct injection into a tissue; intravenous, subcutaneous, intramuscular, interperitoneal, or intraocular
 5 injection, or injection into the digestive tract, a tooth, or the like; inhalation administration to the nasal cavity, oral cavity, lungs, or the like; oral administration; transdermal administration; transmucosal administration via the oral mucosa, vaginal mucosa, ocular mucosa, rectal mucosa, or uterine mucosa;
 10 or the like.

The pharmaceutical composition of the present invention may further comprise, if necessary, a pharmacologically acceptable vehicle or base. The vehicle and base are not limited as long as the effects of the present invention are not impaired,
 15 and are suitably selected according to the form of use. Examples include those mentioned above. In this case, the proportions of the pharmaceutical composition, vehicle, and base are also not limited as long as the effects of the present invention are not impaired, and are suitably selected according to the form of use.

20 In applying the pharmaceutical composition of the present invention, an effective amount thereof is applied. For example, the pharmaceutical composition is applied in such an amount that the nucleic acid complex contained therein is applied in an amount of 0.001 to 10 pM, preferably 0.001 to 1 pM, and
 25 more preferably 0.01 to 0.1 pM, per cell.

The pharmaceutical composition of the present invention is capable of delivering a specific nucleic acid into a cell. That is, the pharmaceutical composition of the present invention is effective in delivering into a cell a specific nucleic acid
 30 that is present in the pharmaceutical composition and that forms the nucleic acid complex, by bringing the pharmaceutical composition into contact with the cell.

The present invention also provides a method for delivering a nucleic acid into a cell. The method for delivering
 35 a nucleic acid into a cell according to the present invention

comprises the step of bringing the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition described above into contact with the cell. The contact between the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition and the cell is not limited, as long as a suitable amount of the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition is brought into contact with the cell into which a nucleic acid is introduced. For example, the contact may be carried out in the same manner as a hitherto known method in gene therapy, and the same applies to the amount to be brought into contact: the manner and amount of contact are suitably selected.

By bringing the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition into contact with a cell in the above manner, the nucleic acid can be stably and persistently maintained in the cell. For contact with the cell, the nucleic acid complex may be used by itself or in combination with a vehicle or base as described above. The nucleic acid delivery composition may also be used by itself or in combination with a vehicle or base as described above. For more efficient intracellular nucleic acid delivery, it is preferable to bring the nucleic acid delivery composition into contact with the cell.

In the present invention, as mentioned above, the cell into which a nucleic acid is delivered is not limited, and may be a cultured cell, a cell isolated from an organism (including established cell lines), a cell in vivo, or the like, and may be derived from a human or a non-human animal. The above-mentioned contact may be carried out in vitro or in vivo.

For example, to bring the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition into contact with a cell in vitro, the cell can be cultured in the presence of a suitable amount of the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition. To bring the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition into contact in vitro with a cultured cell or a cell isolated from an organism, the contact can be carried out in the presence of blood serum. When the nucleic acid complex

or nucleic acid delivery composition is brought into contact with a cell in vivo, the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition may be brought into contact with the cell by, for example, direct injection into a tissue; intravenous, 5 subcutaneous, intramuscular, interperitoneal, or intraocular injection, or injection into the digestive tract, a tooth, or the like; inhalation administration to the nasal cavity, oral cavity, lungs, or the like; oral administration; transdermal administration; transmucosal administration via the oral mucosa, 10 vaginal mucosa, ocular mucosa, rectal mucosa, or uterine mucosa; or the like.

In the method for nucleic acid delivery into a cell according to the present invention, an effective amount of the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition is 15 brought into contact with a cell to introduce the nucleic acid into the cell. For example, the amount of the nucleic acid complex or nucleic acid delivery composition to be administered is selected so that 0.001 to 10 pM, preferably 0.001 to 1 pM, and more preferably 0.01 to 0.1 pM, of the nucleic acid complex is 20 administered per cell.

The method of delivering a nucleic acid into a cell according to the present invention may be performed by bringing the pharmaceutical composition into contact with the cell. When using the pharmaceutical composition, the method of the present 25 invention can be carried out in the same manner as described above.

EXAMPLES

The invention will now be described in detail based on 30 Examples and the like, but the invention is not limited thereto. In the following Examples and Test Examples, GL3-siRNA (siRNA to firefly luciferase; Dharmacon Research, Inc., (Boulder, CO), USA; sense: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT, antisense: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT) was used as siRNA. Cluster dextrin 35 (Ezaki Glico Co., Ltd.) was used as the highly branched cyclic

dextrin.

Example 1

Preparation of Complex containing siRNA and Highly-Branched

5 Cyclic Dextrin

A solution containing siRNA in a 2 μ M concentration (siRNA solution) was prepared using a Tris-EDTA (TE) buffer solution (produced by Fluka Co., Ltd. Further, a solution containing highly-branched cyclic dextrin in a 25 μ M concentration (highly-branched cyclic dextrin solution) was prepared using a Tris-EDTA (TE) buffer solution (produced by Fluka). An equal amount of these solutions were mixed for one minute to form a siRNA complex. Table 1 shows properties of the siRNA complex obtained.

15

Table 1

	Particle Diameter (nm)	Zeta Potential (mV)
Complex	31.1	-42.9

The particle diameter shown is a mean particle diameter (nm) measured using a ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT) (the volume mean particle diameter was measured using a laser diffraction method). Zeta potential was measured using a ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT).

20

Example 2

Preparation of siRNA Complex-containing Nucleic Acid Delivery

25 Composition

Distearoylphosphatidylcholine (DSPC), cholesterol, and stearylamine were weighed out in a molar ratio of 7: 3: 1, and dissolved in chloroform using an eggplant-type flask (recovery flask). The solution was dried under reduced pressure using a rotary evaporator to form a lipid thin membrane layer. The solution containing 0.028 mg/ml of a siRNA complex obtained in Example 1 was added to the resulting lipid thin membrane layer so that the solution had a DSPC concentration of 30 mg/mL, and then

30

mixed. Thereafter, the particle diameter of the solution was adjusted by passing through membranes having pore diameters of 800 nm and 200 nm using an extruder, to prepare a composition for siRNA delivery in a cationic liposome form. The resulting
 5 composition for siRNA delivery had a particle diameter of about 200 nm, and was in a liposome form in which the particles had a uniform particle size. The composition had a zeta potential of about 50 mV. The particle diameter shown is a mean particle diameter (nm) measured using a ZETASIZER 3000HSA (MALVERN
 10 INSTRUMENT) (the volume mean particle diameter was measured using a laser diffraction method). Zeta potential was measured using a ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT).

Example 3

15 Preparation of siRNA Complex-containing Nucleic Acid Delivery Composition

A nucleic acid delivery composition in a cationic liposome form was prepared in the same manner as in Example 2, except that the ratio of DSPC, cholesterol, and stearylamine was
 20 7: 3: 2. As in Example 2, the resulting composition for siRNA delivery had a particle diameter of about 200 nm, and was in a liposome form in which the particles had a uniform particle size. The composition had a zeta potential of about 50 mV.

25 Test Example 1

Evaluation of Inclusion Efficiency of siRNA

A FITC-labeled siRNA complex was prepared in the same manner as in Example 1 above, using FITC pre-labeled siRNA. Using the FITC-labeled siRNA complex, a nucleic acid delivery
 30 composition in a cationic liposome form was prepared under the same conditions as in Examples 2 and 3. The siRNA delivery composition immediately after preparation was precipitated by centrifugation (at 75,000 rpm for 1 hour), and the fluorescence intensity of FITC-labeled siRNA present in its supernatant was
 35 measured to calculate the siRNA inclusion efficiency (a rate (%))

of siRNA enveloped in the liposome to the total siRNA).

As a result, the inclusion efficiency of siRNA indicated high levels of 97.2% when prepared under the same conditions as Example 2, and 99.8% when prepared under the same conditions as Example 3. This reveals that the nucleic acid complex of the invention has the feature of being efficiently introduced into a carrier for nucleic acid delivery in a liposome form. Although a restrictive interpretation is not desired, this is presumably because highly-branched cyclic dextrin forms a compact complex with siRNA.

Test Example 2

Evaluation Test of Cellular Safety

An evaluation was conducted using an MTS assay. A CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay produced by Promega Corporation 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% of fetal bovine serum (FBS) in a 96-well plate, and incubated at 37°C for 24 hours. After rinsing with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) three times, the medium was changed to DMEM without FBS. Each of the nucleic acid delivery compositions was added in an amount of 20 μ l per 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. Twenty μ l of an MTS (tetrazolium salt) reagent and 100 μ l of a DMEM medium with 10 vol% of FBS were added to each well, and incubated for two hours. The absorbance at 492 nm was then determined, and cell viability was calculated. The cell viability was calculated by setting the absorbance at 492 nm determined without adding the nucleic acid delivery composition, which was incubated under the above conditions, as 100%.

Fig. 2 shows the results. As shown in Fig. 2, it became apparent that all nucleic acid delivery compositions of

45.

Examples 2 and 3 have low cytotoxicity and are highly safe. Particularly, it was confirmed that the nucleic acid delivery compositions of Examples 2 and 3 showed a significant high level of safety.

5

Test Example 3

Evaluation Test of siRNA Delivery Efficiency into Cells

The intracellular introduction efficiency of siRNA was evaluated by measuring the fluorescence intensity of FITC-labeled siRNA using flow cytometry. In this test, a nucleic acid delivery composition prepared with FITC pre-labeled siRNA was used. Specifically, A594 cells (ATCC, USA) were inoculated at 5×10^5 cells/well into 500 μ l of DMEM with 10 vol% of FBS in a 24-well plate, and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 24 hours. After rinsing three times with HBSS, 0.95 ml of DMEM containing no FBS was added. 0.05 ml of each of the nucleic acid delivery compositions of Examples 1 and 2 were further 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. Each well was rinsed with HBSS once, and 0.2 ml of CellScrubBuffer (produced by Gene Therapy Systems, Inc.) was added. Incubation was conducted at 37°C under 5% CO₂ for 15 minutes. Again, the wells were rinsed with HBSS twice, and cells attached to the well bottom were detached using trypsin and collected by centrifugation. The resulting cells were suspended in HBSS. The suspension was filtered through a membrane having a pore diameter of 41 μ m. The fluorescence intensity of the cells was measured using flow cytometry at 2 hours, 12 hours and 24 hours after the addition of the nucleic acid delivery compositions. As a control, the fluorescence intensity of the cells was measured in the same manner as described above, using a control nucleic acid delivery composition obtained by mixing a solution of Lipofectamine 2000™ (produced by Invitrogen Corporation), often used as a commercially-available gene vector, diluted with OptiMEM media to

-28-

0.1 mg/mL, and a siRNA solution in which siRNA was diluted with TE buffer at a concentration of 2 μ M in a volume ratio of 1:1.

FIG. 3 shows the results. It was confirmed from the results that siRNA was persistently maintained, with its concentration kept constant in the cells in any of the cases for the nucleic acid delivery compositions of Examples 1 and 2. Contrarily, the control nucleic acid delivery compositions showed not only low initial siRNA intracellular delivery efficiency, but also a decrease in intracellular siRNA with time, resulting in insufficient amounts of siRNA in the cells at 12 hours, and 24 hours after addition.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows an example of the highly branched cyclic dextrin.

Fig. 2 shows the results of Test Example 2, i.e., the results of the evaluation of the nucleic acid delivery compositions for cellular safety.

Fig. 3 shows the results of the evaluation of siRNA introduction into cells mediated by each nucleic acid delivery composition in Test Example 3. The ordinate in Fig. 3 indicates the average fluorescence intensity per one cell.

47

-29-

CLAIMS

1. A nucleic acid complex comprising a nucleic acid and a highly branched cyclic dextrin.

5

2. The nucleic acid complex according to claim 1, wherein the amount of the highly branched cyclic dextrin is 1 to 4000 parts by weight per part by weight of the nucleic acid.

10

3. The nucleic acid complex according to claim 1 or 2, wherein the nucleic acid is siRNA.

4. The nucleic acid complex according to any one of claims 1 to 3, wherein the highly branched cyclic dextrin is a glucan with a degree of polymerization of 50 to 5000 having an inner branched cyclic structure portion formed from α -1,4-glucoside bonds and at least one α -1,6-glucoside bond, and an outer branched structure portion bound to the inner branched cyclic structure portion.

20

5. The nucleic acid complex according to any one of claims 1 to 4, which is an aggregate obtained by mixing a nucleic acid with a highly branched cyclic dextrin in an aqueous solution.

25

6. A nucleic acid delivery composition comprising the nucleic acid complex according to any one of claims 1 to 5 and a nucleic acid delivery carrier.

7. The nucleic acid delivery composition according to claim 6, wherein the nucleic acid delivery carrier is a composition comprising (A) a diacylphosphatidylcholine, (B) at least one member selected from cholesterol and derivatives thereof, and (C) an aliphatic primary amine.

35

8. The nucleic acid delivery composition according to

claim 7, wherein Component (A) in the nucleic acid delivery carrier is a diacylphosphatidylcholine in which the acyl moiety has 4 to 23 carbon atoms.

5 9. The nucleic acid delivery composition according to claim 7, wherein Component (B) in the nucleic acid delivery carrier is cholesterol.

10 10. The nucleic acid delivery composition according to claim 7, wherein Component (C) in the nucleic acid delivery carrier is an alkylamine having 10 to 20 carbon atoms.

15 11. The nucleic acid delivery composition according to claim 7, wherein the molar ratio of Components (A):(B):(C) is 5-9:1-5:1.

20 12. The nucleic acid delivery composition according to claim 7, wherein the nucleic acid delivery carrier is a liposome preparation in which a liposome membrane is formed from Components (A) to (C).

 13. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid delivery composition according to any one of claims 6 to 12.

25 14. Use of the nucleic acid delivery composition according to any one of claims 6 to 12 to produce a pharmaceutical for delivering a nucleic acid into a cell.

30 15. A method for delivering a nucleic acid into a cell, the method comprising the step of bringing the nucleic acid delivery composition according to any one of claims 6 to 12 into contact with the cell.

Fig. 1

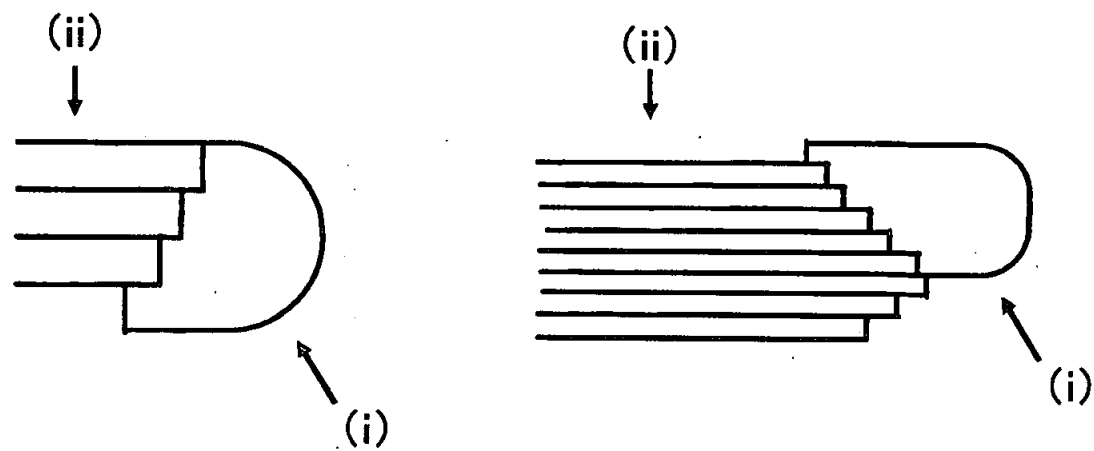
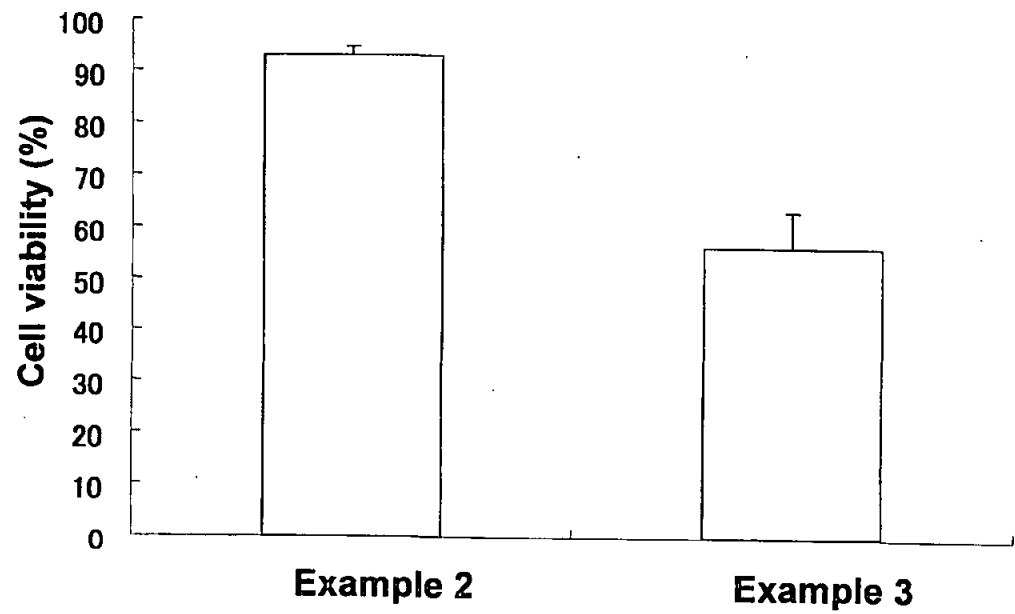
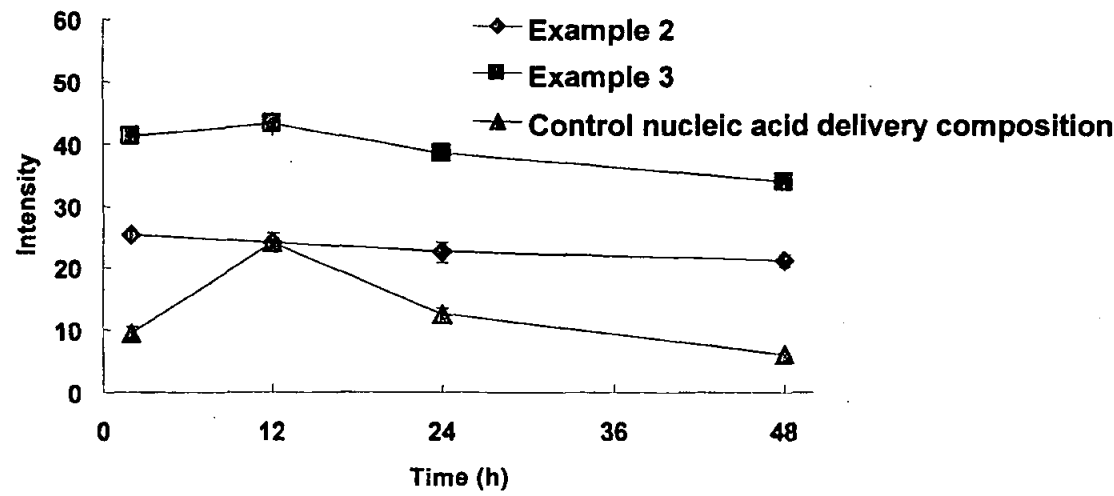


Fig. 2



So.

Fig. 3



DESCRIPCIÓN

COMPLEJO DE ÁCIDO NUCLEICO Y COMPOSICIÓN DE SUMINISTRO DE
ÁCIDOS NUCLEICOS

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona con un complejo de ácido nucleico que persistentemente puede residir en una célula y tiene baja toxicidad y alta seguridad, y una composición para el suministro de ácido nucleico.

10

TÉCNICA ANTECEDENTE

Con los recientes desarrollos en biotecnología, se ha descubierto una variedad de ácidos nucleicos que exhiben funciones fisiológicamente activas en las células. Por ejemplo, se sabe que el siARN (ARN interferente pequeño) origina la degradación del mRNA de un gen objetivo en una célula, e interfiere con la expresión del gen objetivo (interferencia de ARN). La función inhibidora en la expresión de genes objetivo debido a tal interferencia de ARN es útil para la mitigación o tratamiento de síntomas de enfermedades originados por la expresión anormal de genes específicos o grupos de genes y se espera el desarrollo de agentes terapéuticos utilizando siARN. Sin embargo, ya que los ácidos nucleicos son macromoléculas solubles en agua que tienen una carga negativa, que tienen extremadamente bajas eficiencias de suministro de genes intracelulares, resultan en efectos terapéuticos ineficientes según las terapias génicas que incluyen las terapias siARN.

25

Se ha conocido el uso de un portador (vector) por suministrar eficientemente genes en las células. Los vectores incluyen vectores víricos y vectores no víricos. Los vectores víricos tienen alta eficiencia de introducción de ácido nucleico; sin embargo, existen varios aspectos de seguridad desconocidos que incluyen patogenicidad, inmunogenicidad y citotoxicidad. Por lo tanto, se desea el uso de vectores no víricos para aplicaciones clínicas.

Ejemplos de vectores no víricos incluyen Lipofectamina TM2000, que ya está disponible comercialmente. Adicionalmente, se han reportado un lípido catiónico con una estructura específica (ver, Documento de Patente 1), y una composición (ver, Documento de Patente 2) que contiene un compuesto anfifílico y un polication. El suministro de ácidos nucleicos intracelular utilizando un vector no vírico se conduce al mezclar primero el ácido nucleico a ser suministrado con el vector no vírico para formar un complejo, luego poner el complejo en contacto con la célula objetivo. Cuando un vector no vírico puede formar un liposoma, el vector se incorpora en una célula con un ácido nucleico envuelto en el liposoma, lo que conduce por lo tanto al suministro de ácido nucleico intracelular

Los ácidos nucleicos tales como siARN, sin embargo, tienen las características específicas de pobre estabilidad y una fuerte carga eléctrica. Por lo tanto, el ácido nucleico ha reducido problemáticamente la estabilidad cuando se mezcla con un vector no vírico, que inhibe la introducción de ácido nucleico continua en una célula. Aunque se ha conocido un ejemplo en el que un ácido nucleico se entrapa en un liposoma al formar un complejo del siARN y el polímero catiónico (ver, Documento de no Patente 1), este no se puede utilizar en la práctica en vista de la citotoxicidad del polímero catiónico. Adicionalmente, aún cuando se puede formar un complejo estable utilizando un vector no vírico

conocido y un ácido nucleico, el complejo puede tener una baja capacidad de suministro intracelular o se puede suministrar rápidamente en una célula. Por lo tanto, tales vectores no víricos conocidos no pueden mantener persistentemente el ácido nucleico en la célula; lo que falla en mantener los efectos deseados
5 obtenidos mediante el ácido nucleico.

A la luz de la técnica antecedente, se ha deseado el desarrollo de técnicas para suministrar eficientemente un ácido nucleico (por ejemplo, siARN) en una célula y para mantener persistentemente el ácido nucleico con baja toxicidad y alta
10 seguridad.

Documento de Patente 1: Solicitud de Patente No examinada Japonesa No. 2002-529439

Documento de Patente 2: Solicitud de Patente No examinada Japonesa No. 2005-
15 508394

Documento de no Patente 1: Kentaro Kogure et al., Development of a non-viral-multifunctional-envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method, J. Control. Release, 98 (2004) 317-323

20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

PROBLEMAS A SER RESUELTOS POR LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es resolver los problemas de la técnica anterior. Específicamente, un objeto de la presente invención es proporcionar un
25 complejo de ácido nucleico con baja toxicidad y alta seguridad que puede mantener persistentemente un ácido nucleico, tal como siARN o similares, en una célula; y una composición de suministro de ácido nucleico que puede suministrar

eficientemente el complejo de ácido nucleico en una célula. Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una composición de suministro de ácido nucleico, y un método para suministrar un ácido nucleico en una célula al poner una composición de suministro de ácido nucleico en contacto con la célula.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Los presentes inventores conducen una investigación extensiva para resolver los problemas anteriores, y encuentran que se puede obtener un complejo de ácido nucleico con baja toxicidad y alta seguridad que persistentemente puede mantener un ácido nucleico en una célula mediante la formación de un complejo con el ácido nucleico que se introduce en la célula y una dextrina muy cíclica altamente ramificada. Los presentes inventores encuentran adicionalmente que la seguridad, la eficacia del suministro intracelular, y la persistencia intracelular de un ácido nucleico se puede mejorar adicionalmente al utilizar, como un portador de suministro de ácido nucleico para introducir el complejo de ácido nucleico en una célula, un portador que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) de colesterol y/o un derivado del mismo, y (C) una amina primaria alifática. La presente invención se lleva a cabo al conducir investigaciones adicionales basadas en estos hallazgos.

La presente invención proporciona los siguientes ítems:

Ítem 1. Un complejo de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico y una dextrina cíclica altamente ramificada.

Ítem 2. El complejo de ácido nucleico de acuerdo con el Ítem 1, en donde la cantidad de la dextrina cíclica altamente ramificada es 1 a 4000 partes en peso por parte en peso del ácido nucleico.

5 Ítem 3. El complejo de ácido nucleico de acuerdo con el Ítem 1 o 2, en donde el ácido nucleico es siARN.

10 Ítem 4. El complejo de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 1 a 3, en donde la dextrina cíclica altamente ramificada es un glucosano con un grado de polimerización de 50 a 5000 que tiene una porción de estructura cíclica ramificada interna formada de enlaces α -1,4-glucósido y por lo menos un enlace α -1,6-glucósido, y una porción de estructura ramificada externa unida a la porción de estructura cíclica ramificada interna.

15 Ítem 5. El complejo de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 1 a 4, que es un conjunto obtenido al mezclar un ácido nucleico con una dextrina cíclica altamente ramificada en una solución acuosa.

20 Ítem 6. Una composición de suministro de ácido nucleico que comprende el complejo de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 1 a 5 y un portador de suministro de ácido nucleico.

25 Ítem 7. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con el Ítem 6, en donde el portador de suministro de ácido nucleico es una composición que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un miembro seleccionado de colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática.

Ítem 8. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con el Ítem 7, en donde el Componente (A) en el portador de suministro de ácido nucleico es una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo funcional acilo tiene 4 a 23 átomos de carbono.

Ítem 9. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con el Ítem 7, en donde el Componente (B) en el portador de suministro de ácido nucleico es colesterol.

Ítem 10. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con el Ítem 7, en donde el Componente (C) en el portador de suministro de ácido nucleico es una alquilamina que tiene 10 a 20 átomos de carbono.

Ítem 11. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con el Ítem 7, en donde la relación molar de los Componentes (A):(B):(C) es 5-9:1-5:1.

Ítem 12. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con el Ítem 7, en donde el portador de suministro de ácido nucleico es una preparación de liposoma en la que una membrana de liposoma se forma de los Componentes (A) a (C).

Ítem 13. Una composición farmacéutica que comprende la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 6 a 12.

Ítem 14. La composición farmacéutica de acuerdo con el Ítem 13, en donde el ácido nucleico es siARN.

Ítem 15. Uso de la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 6 a 12 para producir un producto farmacéutico para suministrar un ácido nucleico en una célula.

5

Ítem 16. El uso de acuerdo con el Ítem 15, en donde el ácido nucleico es siARN.

Ítem 17. Un método para suministrar un ácido nucleico en una célula, el
10 método comprende la etapa de poner la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los Ítems 6 a 12 en contacto con la célula.

Ítem 18. El método de acuerdo con el Ítem 17, en donde el ácido nucleico
15 es siARN.

EFFECTOS DE LA INVENCION

El complejo de ácido nucleico de la presente invención se obtiene al formar
20 un ácido nucleico en un complejo utilizando una dextrina cíclica altamente ramificada, haciendo por lo tanto posible que el complejo de ácido nucleico sea altamente seguro sea capaz de mantener establemente el ácido nucleico en una célula durante un largo periodo de tal manera que se puedan exhibir persistentemente los efectos útiles basados en el ácido nucleico. Adicionalmente,
25 el complejo de ácido nucleico de la presente invención se puede formar fácilmente en un complejo con un portador de suministro de ácido nucleico, y se puede encapsular fácilmente aún en un portador de suministro de ácido nucleico en

forma de liposoma. El complejo de la presente invención es por lo tanto también excelente en la facilidad de formulación en una composición de suministro de ácido nucleico. Adicionalmente, la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención puede introducir el complejo de ácido nucleico en una célula.

5

Para suministrar el complejo de ácido nucleico de la presente invención en una célula, el uso de un portador que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado del mismo, y (C) una amina primaria alifática, como un portador para suministro intracelular puede incrementar la eficiencia de suministro intracelular del complejo de ácido nucleico, y puede mejorar adicionalmente la persistencia y seguridad de tal suministro intracelular.

10

Como se describió anteriormente, el complejo de ácido nucleico y la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención puede exhibir efectos útiles basados en el ácido nucleico efectivamente, persistentemente, y con alta seguridad; por lo tanto, el complejo y la composición son particularmente útiles como productos farmacéuticos para terapia génica. Así, la composición farmacéutica o método para suministrar un ácido nucleico en una célula de acuerdo con la presente invención puede suministrar un ácido nucleico en una célula más efectivamente.

15

20

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención se describe adelante en detalle.

25

(1) Complejo de Ácido Nucleico

El complejo de ácido nucleico de la presente invención comprende un ácido nucleico y una dextrina cíclica altamente ramificada.

El ácido nucleico utilizado para el complejo de ácido nucleico de la presente invención no se limita por el tipo o estructura, mientras que necesita ser suministrado en la célula. Ejemplos específicos de tales ácidos nucleicos incluyen siARN, mARN, tARN, rARN, cADN, miARN (microARN), ribozimas, oligos anticodificantes, oligonucleótidos señuelo, ADN plásmido, ácidos nucleicos de péptido, oligonucleótidos que forman triplex (TFOs), aptámeros, genes, etc., entre los que se prefiere el siARN. El siARN tiene la desventaja de baja estabilidad en la presencia de vectores no víricos conocidos hasta ahora, pero cuando se forma el siARN en el complejo de ácido nucleico de la presente invención, tiene la capacidad de ser suministrado continuamente en una célula así como también tiene excelente estabilidad. El ácido nucleico utilizado en el complejo de ácido nucleico de la presente invención se puede derivar de humanos, animales, plantas, bacterias, virus, o similares, o se puede sintetizar químicamente. Tales ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, o tricatenarios, y no se limitan por el peso molecular. Adicionalmente, en la presente invención, se pueden utilizar ácidos nucleicos modificados con químicos, enzimas, o péptidos. Adicionalmente, en la presente invención, se pueden utilizar ácidos nucleicos individualmente o en una combinación de dos o más.

La dextrina cíclica altamente ramificada utilizada en el complejo de ácido nucleico de la presente invención se produce al dejar actuar una enzima ramificada en un sacárido que tiene enlaces α -1,4-glucósido y por lo menos un enlace α -1,6-glucósido, tal como amilopectina, y es un glucosano con un grado de polimerización de 50 a 5000 que tiene una porción de estructura cíclica ramificada

interna y una porción de estructura ramificada externa. La porción de estructura cíclica ramificada interna es una porción de estructura cíclica formada de enlaces α -1,4-glucósido y por lo menos un enlace α -1,6-glucósido; y la porción de estructura ramificada externa es una porción de estructura no cíclica unida a la

5 porción de estructura cíclica ramificada interna. La porción de estructura ramificada externa se une a la porción de estructura cíclica ramificada interna a través de por lo menos un enlace α -1,6-glucósido. Las formas preferibles de la dextrina cíclica altamente ramificada incluyen el glucosano anteriormente mencionado en el que la porción de estructura cíclica ramificada interna tiene un

10 grado de polimerización de 10 a 100, el glucosano anteriormente mencionado en el que la porción de estructura ramificada externa tiene un grado de polimerización de 40 o más, y el glucosano anteriormente mencionado en el que las cadenas de unidades de la porción de estructura ramificada externa tienen un grado promedio de polimerización de 10 a 20. La dextrina cíclica altamente ramificada se puede

15 ilustra como en, por ejemplo, la Figura 1 en la que la porción de estructura cíclica ramificada interna se indica por (i) y la porción de estructura ramificada externa se indica por (ii).

El grado de polimerización se puede determinar mediante filtración de gel

20 utilizando un refractómetro diferencial, de la posición de elución de un material del que se conoce el grado de polimerización. En esta determinación, la salida de un refractómetro diferencial es proporcional a la concentración del glucosano, y la salida de un fotómetro de dispersión de luz láser de bajo ángulo es proporcional al producto del grado de polimerización y concentración del glucosano. Por lo tanto,

25 el grado de polimerización del glucosano se puede determinar al medir la relación de las salidas de los dos detectores, es decir, un refractómetro diferencial y un

fotómetro de dispersión de luz láser de bajo ángulo. Las condiciones específicas se describen en la US6248566B1 (Patente japonesa No. 3107358).

La dextrina cíclica altamente ramificada y el proceso de producción de ésta se describen en la US6248566B1 (Patente japonesa No. 3107358), y la dextrina cíclica altamente ramificada se vende bajo la marca registrada de "Cluster Dextrin" por Ezaki Glico Co., Ltd.

En el complejo de ácido nucleico de la presente invención, la relación de la dextrina cíclica altamente ramificada al ácido nucleico no se limita, pero es usualmente 1 a 4000 partes en peso, preferiblemente 10 a 1000 partes en peso, y más preferiblemente 100 a 400 partes en peso, de la dextrina cíclica altamente ramificada por parte en peso del ácido nucleico. En términos de relación molar, la relación anterior es, por ejemplo, 0.1 a 1000 mol, preferiblemente 1 a 100 mol, y más preferiblemente 10 a 20 mol, de la dextrina cíclica altamente ramificada por mol del ácido nucleico. La satisfacción de esta relación permite hacer más notable la continuidad del suministro intracelular de ácido nucleico mediante un portador de suministro de ácido nucleico, y la seguridad del mismo.

El diámetro de partícula promedio del complejo de ácido nucleico de la presente invención es usualmente 6 a 60 nm, preferiblemente 8 a 30 nm, y más preferiblemente 10 a 20 nm. El diámetro de partícula promedio del complejo de ácido nucleico se mide como un diámetro de partícula promedio en volumen utilizando un método de dispersión de luz láser dinámico.

25

El complejo de ácido nucleico de la presente invención es un complejo formado por la agregación del ácido nucleico y la dextrina cíclica altamente

ramificada. El complejo de ácido nucleico de la presente invención se produce al mezclar el ácido nucleico y la dextrina cíclica altamente ramificada en una solución que puede dispersar establemente los dos compuestos. Ejemplos específicos de soluciones que pueden dispersar establemente el ácido nucleico y la dextrina cíclica altamente ramificada incluyen amortiguadores tales como Tris y similares. Los amortiguadores pueden contener agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y similares. Las condiciones para mezclar el ácido nucleico y la dextrina cíclica altamente ramificada pueden ser tales que, en la solución mencionada anteriormente, por ejemplo, aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 100 μm , preferiblemente aproximadamente 1 μm a aproximadamente 10 μm , del ácido nucleico se mezclan con aproximadamente 1 μm a aproximadamente 1000 μm , y preferiblemente aproximadamente 10 μm a aproximadamente 100 μm , de la dextrina cíclica altamente ramificada, a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 a aproximadamente 100 minutos, y preferiblemente aproximadamente 5 a aproximadamente 10 minutos. El complejo de ácido nucleico de la presente invención así producido está presente como una dispersión en la solución. La dispersión se puede mezclar como esta es, o después de dilución o concentración si es necesario, con un portador de suministro de ácido nucleico.

(2) Composición de Suministro de Ácido Nucleico

El complejo de ácido nucleico se incorpora en un portador de suministro de ácido nucleico al ser mezclado con el portador de suministro de ácido nucleico, y de esta manera el ácido nucleico permite ser suministrado en una célula. Esto es, la presente invención también proporciona una composición de suministro de

ácido nucleico que comprende el complejo de ácido nucleico y un portador de suministro de ácido nucleico.

El portador de suministro de ácido nucleico es un vector no vírico utilizado como un portador de ácido nucleico para suministrar (introducir) un ácido nucleico en una célula. La composición de suministro de ácido nucleico es una composición utilizada para poner el ácido nucleico en contacto con la célula en la que se suministrará el ácido nucleico, con el fin de introducir el ácido nucleico contenido en la composición en la célula.

Formulación de Portador de Suministro de Ácido Nucleico

El portador de suministro de ácido nucleico utilizado en la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención no se limita mientras que éste sea capaz de incorporar un ácido nucleico en una célula. Ejemplos de portadores de suministro de ácido nucleico usables incluyen portadores conocidos tales como LipofectaminaTM 2000 y similares.

Desde el punto de vista de la mejora adicional de la persistencia intracelular del ácido nucleico contenido en el complejo de ácido nucleico, y la mejora adicional de la eficiencia y seguridad de suministro intracelular, es preferible utilizar, por ejemplo, un portador que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado del mismo, y (C) una amina primaria alifática (en lo sucesivo denominada como "Portador 1").

La diacilfosfatidilcolina (en lo sucesivo algunas veces denominada como "Componente (A)") utilizada en el Portador 1 no se limita mientras que sea

farmacológicamente aceptable, y puede ser, por ejemplo, una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo funcional acilo tiene 4 a 23 átomos de carbono. Los números de carbono de los dos grupos acilo que constituyen la diacilfosfatidilcolina pueden ser iguales o diferentes.

5

Ejemplos específicos de diacilfosfatidilcolinas incluyen dilauroilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina, palmitoilestearoilfosfatidilcolina, dibutiloilfosfatidilcolina, dihexanoilfosfatidilcolina, diheptanoilfosfatidilcolina, didecanoilfosfatidilcolina, diftanoilfosfatidilcolina, didodecilfosfatidilcolina, dieicosanoilfosfatidilcolina, dihenicosanoilfosfatidilcolina, dierucoilfosfatidilcolina, diaraquidonoilfosfatidilcolina, bis(tricosadinoil)fosfatidilcolina, etc. Entre estos, los ejemplos preferibles incluyen diacilfosfatidilcolinas en las que el grupo funcional acilo tiene 12 a 18 átomos de carbono; ejemplos más preferibles incluyen dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, miristoilpalmitoilfosfatidilcolina, miristoilestearoilfosfatidilcolina, palmitoilestearoilfosfatidilcolina, y diacilfosfatidilcolinas similares en las que el grupo funcional acilo tiene 13 a 17 átomos de carbono; particularmente ejemplos preferibles incluyen dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y diestearoilfosfatidilcolina; y los ejemplos más preferibles incluyen diestearoilfosfatidilcolina. Tales diacilfosfatidilcolinas se pueden utilizar solas o en una combinación de dos o más.

25

El colesterol y/o un derivado del mismo (en lo sucesivo algunas veces denominado como "Componente (B)") utilizado en el Portador 1 no se limita mientras este sea farmacológicamente aceptable. Los derivados de colesterol son

62

lípidos catiónicos con una cadena principal de colesterol, y ejemplos específicos incluyen 3β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Col), yoduro de 3β -[N',N',N'-trimetilaminoetano]colesterol (TC-Col), bis(guanidinio)-tren-colesterol (BGTC), N-colesteriloxycarbonil-3,7-diazanonan-1,9-diamina, β -alanina-dietanolamina-colesterol, N⁴-espermina colesteril carbamato (GL-67), N[N⁴-3-aminopropilespermidina]colesteril carbamato (GL-78), N⁴-espermina colesteril carboxamida (GL-90), N¹,N⁸-bis(arginina carboxamida)-N⁴-espermidina colesteril carbamato (GL-95), y N-[N¹,N⁴,N⁸-tris(3-aminopropil)espermidina]colesteril carbamato (GL-96). Ejemplos preferibles del Componente (B) incluyen colesterol.

10 En el Portador 1, el colesterol y los derivados del mismo se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más como Componente (B).

La amina primaria alifática (en lo sucesivo algunas veces denominada como "Componente (C)") utilizada en el Portador 1 no se limita mientras ésta sea farmacológicamente aceptable, y puede ser, por ejemplo, una alquilamina en la que el grupo funcional alquilo tiene 10 a 20 átomos de carbono.

Ejemplos específicos de aminas primarias alifáticas incluyen laurilamina, miristilamina, palmitilamina, estearilamina, oleilamina, decanoilamina, ftanoilamina, etc. Entre estas, son preferibles las alquilaminas en las que el grupo funcional alquilo tiene 12 a 18 átomos de carbono; son más preferibles la estearilamina, oleilamina, y palmitoilamina; y es especialmente preferible la estearilamina. Estas aminas primarias alifáticas se pueden utilizar solas o en una combinación de dos o más.

25

El Portador 1 comprende una combinación de los Componentes (A) a (C) descrita anteriormente. Con el fin de mejorar adicionalmente la eficiencia de

suministro intracelular de un ácido nucleico, y reducir adicionalmente la toxicidad, son preferibles las siguientes combinaciones:

(A) una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo funcional acilo tiene 4 a 23 átomos de carbono, (B) colesterol y/o un derivado del mismo, y (C) una alquilamina C10-20; y más preferiblemente, (A) dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y/o diestearoilfosfatidilcolina, (B) colesterol, y (C) estearilamina.

En el Portador 1, la relación de los Componentes (A) a (C) no se limita, y puede ser, por ejemplo, una relación molar de los Componentes (A):(B):(C) de 5-9:1-5:1, preferiblemente 6-9:1-4:1, y más preferiblemente 7-8:2-3:1. La satisfacción de tal relación hace posible alcanzar el suministro de ácido nucleico intracelular con eficiencia más mejorada y baja toxicidad.

La cantidad total de los Componentes (A) a (C) en la cantidad total del Portador 1 es, por ejemplo, 1 a 100% en peso, preferiblemente 20 a 90% en peso, y más preferiblemente 30 a 70% en peso.

El Portador 1 puede contener, en adición a los Componentes (A) a (C), otros lípidos catiónicos. Ejemplos específicos de lípidos catiónicos utilizables incluyen escualamina, 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)), 3a,7a,12a-tris(3-azidopropoxi)-5 β -colan-24-(N-(benciloxicarbonil)-N-(3-hidroxipropil)amina), y lípidos catiónicos similares a los que se unen los esteroides; los conjugados de espermina-umbrella y lípidos catiónicos similares a los que se une el ácido cólico; los lípidos catiónicos a los

que se une el esteroil glucósido; lípidos catiónicos a los que se une la saponina esteroide; sal de bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio propano, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano metilsulfato, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio propano, 1,2-distearoil-3-trimetilamonio propano, clorhidrato de N-(1-(2,3-bis(oleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), sal de bromuro de dimiristoiloxipropil dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), bromuro de dioleoiloxipropil dimetilhidroxietilamonio (DORIE), bromuro de dimetildidodecilamonio, clorhidrato de N-(a-trimetilammonioacetil)didodecil-D-glutamina, clorhidrato de N-(a-trimetilammonioacetil)-O,O'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)-L-glutamina, clorhidrato de O,O'-didodecanoil-N-(a-trimetilammonioacetil)dietanolamina, bromuro de metilalil didodecil amonio, clorhidrato de N-{p-(w-trimetilammoniobutiloxi)benzoil}-didodecil-L-glutamina, bromuro de 9-(w-trimetilammoniobutil)-3,6-bis(dodecanoil)carbazol, clorhidrato de dimetildioctadecil amonio, bromuro de N-w-trimetilammoniodecanoil-dihexadecil-D-glutamina, bromuro de N-{p-(w-trimetilammoniohexiloxi)-benzoil}-ditetradecil-L-glutamina, sal de bromuro de p-(w-trimetilammoniodeciloxi)-p'-octiloxiazobenceno (MC-1-0810), sal de bromuro de p-{w-(b-hidroxietil)dimetil-ammonio-deciloxi}-p'-octiloxiazobenceno (MC-3-0810), sal de bromuro de O,O',O''-tridodecanoil-N-(w-trimetil-ammoniodecanoil)-tris(hidroximetil)aminometano (TC-1-12), 1,2-dilauril-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dimiristoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dipalmitoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-distearoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dioleoil-glicero-3-etilfosfocolina, 1-palmitoil-2-oreoil-glicero-3-etilfosfocolina, y lípidos catiónicos del tipo sal de amonio cuaternario similares; etc.

25

Cuando el Portador 1 contiene un lípido catiónico diferente de los Componentes (A) a (C), la proporción del lípido catiónico no se limita mientras que

no se deterioran los efectos de la presente invención, y pueden ser, por ejemplo, 1 a 10 partes en peso, preferiblemente 2 a 8 partes en peso, y más preferiblemente 4 a 6 partes en peso, por 100 partes en peso de los Componentes (A) a (C) en total.

5

El Portador 1 puede contener adicionalmente una base aceitosa, si es necesario. La adición de una base aceitosa para utilizar sus propiedades capaces del control de la eficiencia de la introducción de ácido nucleico mediante el Portador 1. Por ejemplo, cuando se agrega una base aceitosa para ajustar la gravedad específica del Portador 1, se puede controlar el contacto de una célula con el Portador 1, mejorando de este modo la eficiencia de introducción in vitro. Adicionalmente, por ejemplo, cuando se agrega una base aceitosa con una función de sensibilidad a la temperatura, el núcleo del portador de ácido nucleico se puede desintegrar bajo condiciones de temperatura predeterminadas para inducir las fluctuaciones en la superficie celular, mejorando de este modo la eficiencia de la introducción del ácido nucleico. Adicionalmente, por ejemplo, cuando se agrega una base aceitosa que tiene una capacidad de ser interrumpida por un estímulo interno, el núcleo del Portador 1 se puede desintegrar mediante un estímulo externo para inducir fluctuaciones en la superficie celular, mejorando de este modo la eficiencia de la introducción del ácido nucleico.

10
15
20

Ejemplos de bases aceitosas que se pueden agregar al Portador 1 incluyen perfluorocarbono, perfluoropentano, bromuro de perfluorooctilo, perfluorohexano, perfluorotributilamina, aceite de soya, aceite de soya refinado, aceite de soya hidrogenado, aceite de soya no saponificado, escualeno, aceite de ricino, aceite de clavo, trioleato de sorbitán, aceite de trementina, aceite de cártamo, ácidos grasos de aceite de cártamo, ácido oleico, aceite de palma, aceite de colza, aceite

25

de fusel, aceite de oliva, aceite de linaza, aceite de sésamo, aceite de clorofila, aceite de crotón, aceite de bergamota, aceite de cedro, aceite de naranja, aceite de hinojo, aceite de eucalipto, aceite de maíz, aceite de lavanda, aceite de orégano, aceite de limón, aceite de algodón, aceite de coco, aceite de yema de

5 huevo, aceite de rosa, aceite de pino, aceite de almendras, aceite de cacahuete, aceite de camelia, aceite de alcanfor blanco, aceite de manzanilla, aceite de canela, aceite de menta, aceite de maíz esterificado, aceite de jengibre, aceite de manzanilla romana, aceite de serpiente, aceite de menta verde, aceite de girasol, manteca de cacao, aceite de germen de trigo, aceite de óxido de zinc, aceites

10 endurecidos, aceites vegetales hidrogenados, parafina líquida ligera, parafina líquida, triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, aceite de visón, aceite de naranja amarga, aceite de polioxietileno ricino, aceite de polioxietileno ricino hidrogenado, aceite de polioxietileno ricino hidrogenado 10, aceite de polioxietileno ricino hidrogenado 100, aceite de polioxietileno ricino hidrogenado 20, aceite de

15 polioxietileno ricino hidrogenado 40, aceite de polioxietileno ricino hidrogenado 5, aceite de polioxietileno ricino hidrogenado 50, aceite de polioxietileno ricino hidrogenado 60, aceite de polioxil ricino 35, aceites de proceso, etc. Entre tales bases aceitosas, perfluoropentano es sensible a la temperatura, y tiene la propiedad de ebullición a 29.5° C y de esta forma llega a ser un gas.

20 Adicionalmente, el perfluorohexano, bromuro de perfluorooctilo y perfluorotributilamina tienen la capacidad de ser interrumpidos por un estímulo externo, y tienen la propiedad de originar cavitación en el núcleo del Portador 1 y se desintegran cuando reciben un estímulo externo como la irradiación ultrasónica.

25 Cuando se contiene una base aceitosa, la proporción de la misma no se limita mientras que no se deterioran los efectos de la presente invención, y pueden ser, por ejemplo, 0.1 a 50 partes en peso, preferiblemente 1 a 30 partes en peso, y

más preferiblemente 5 a 20 partes en peso, por 100 partes en peso de los Componentes (A) a (C) en total.

El Portador 1 puede contener adicionalmente un lípido de membrana fusogénica (lípido auxiliar) si es necesario. Cuando contiene un lípido de membrana fusogénica, el Portador 1 tiene eficiencia de suministro de ácido nucleico intracelular mejorada adicional. Ejemplos de tales lípidos de membrana fusogénica incluyen dioleoilfosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina, transfosfatidilfosfatidiletanolamina, 1,2-bis-(10,12-tricosadinoil)-fosfoetanolamina, 1,2-dielaidoilfosfoetanolamina, 1,2-dihexadecilfosfoetanolamina, 1,2-dihexanoilfosfoetanolamina, 1,2-dilauroilfosfoetanolamina, 1,2-dilinoilfosfoetanolamina, 1,2-dimiristoilfosfoetanolamina, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoleoilfosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina, 1,2-difitanoilfosfoetanolamina, 1,2-diestearoilfosfoetanolamina, 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, 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, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-glutarilo, 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-glutarilo, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-lactosa, 1,2-dioleoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidemetil)ciclohexanocarboxilato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidemetil)ciclohexanocarboxilato], 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-[4(p-maleimidefenil)butilamida], 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-(succinil), 1,2-dipalmitoilfosfoetanolamina-N-(succinil),
etc. Entre tales lípidos, se puede utilizar ventajosamente la
5 dioleoilfosfatidiletanolamina en el Portador 1.

Cuando se contiene tal un lípido de membrana fusogénica, la proporción de
este no se limita mientras que no se deterioran los efectos de la presente
invención, y puede ser, por ejemplo, 1 a 500 partes en peso, preferiblemente 10 a
10 250 partes en peso, y más preferiblemente 25 a 100 partes en peso, por 100
partes en peso de los Componentes (A) a (C) en total.

El Portador 1 puede contener varios aditivos tales como agentes de
isotonización, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores,
15 amortiguadores, conservantes, etc.; y/o vehículos acuosos tales como agua
purificada, soluciones de azúcar acuosas, soluciones amortiguadoras, solución
salina fisiológica, solución de polímero acuosas, agua libre de RNasa, etc.; de
acuerdo con la forma de uso. Las cantidades de tales aditivos y vehículos acuosos
a ser agregada se pueden seleccionar adecuadamente de acuerdo con la forma
20 de uso del portador de suministro de ácido nucleico.

Forma del Portador de suministro de ácido nucleico

La forma del portador de suministro de ácido nucleico no se limita mientras
25 que se pueda encapsular el ácido nucleico suministrado en una célula, pero está
preferiblemente en la forma de un liposoma. Por ejemplo, cuando el Portador 1

está en la forma de un liposoma, los Componentes (A) a (C), y opcionalmente otros lípidos utilizados, forman una membrana de liposoma.

Cuando el portador de suministro de ácido nucleico está en la forma de un liposoma, este puede ser una vesícula unilamelar pequeña (SUV), una vesícula unilamelar grande (LUV), o una vesícula multilamelar (MLV). El diámetro de partícula del portador de suministro de ácido nucleico se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con el tipo de la célula en la que se suministra el ácido nucleico, y puede ser, por ejemplo, aproximadamente 20 a aproximadamente 100 nm para SUV, aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 nm para LUV, y aproximadamente 400 a aproximadamente 3500 nm para MLV. El diámetro de partícula del liposoma se mide utilizando un método de dispersión de luz láser dinámico.

Se pueden utilizar los métodos conocidos en la técnica para producir el liposoma y ajustar el diámetro de partícula del liposoma. Por ejemplo, en el caso del Portador 1, se puede formar un liposoma mediante un método de película delgada, un método de evaporación de fase inversa, un método de inyección de éter, un método de tensoactivo, y un método de calentamiento, o similares, utilizando una fase de aceite que contiene los Componentes (A) a (C) y una fase acuosa (vehículo acuoso). El diámetro de partícula se puede ajustar mediante un método de extrusión, un método de presión Francés, un método de homogenización, o similares.

Forma, Formulación, y Método de Uso de la Composición de Suministro de Ácido Nucleico

Cuando el portador de suministro de ácido nucleico está en la forma de un liposoma, el complejo de ácido nucleico en la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención puede estar presente en un estado encapsulado dentro de la fase acuosa interna del liposoma, o en un estado unido a la superficie interna o externa de la membrana del liposoma mediante un enlace iónico o hidrófobo. Cuando el portador de suministro de ácido nucleico está en una forma diferente de un liposoma, el complejo de ácido nucleico en la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención forma un complejo con componentes del portador de suministro de ácido nucleico a través de un enlace iónico o hidrófobo.

La composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención se produce al mezclar el complejo de ácido nucleico con el portador de suministro de ácido nucleico y formular la mezcla en una forma deseada, o al mezclar los componentes del complejo de ácido nucleico y la composición de portador de suministro de ácido nucleico en un orden arbitrario y formular la mezcla en una forma deseada.

En la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención, la relación del complejo de ácido nucleico al portador de suministro de ácido nucleico depende del tipo de complejo de ácido nucleico, el tipo de portador de suministro de ácido nucleico, y el tipo de la célula en la que se suministra el ácido nucleico, etc. La relación puede ser, por ejemplo, 1 a 100 partes en peso, preferiblemente 10 a 100 partes en peso, y más preferiblemente 20 a 100 partes en peso, del complejo de ácido nucleico por 100 partes en peso de la cantidad total del portador de suministro de ácido nucleico. Más específicamente, cuando el Portador 1 se utiliza como el portador de suministro de ácido nucleico, la relación

puede ser, por ejemplo, 1 a 100 partes en peso, preferiblemente 10 a 100 partes en peso, y más preferiblemente 20 a 100 partes en peso, del complejo de ácido nucleico por 100 partes en peso de la cantidad total de los Componentes (A) a (C) contenidos en el Portador 1.

5

Adicionalmente, cuando el Portador 1 se utiliza como el portador de suministro de ácido nucleico, la cantidad total de los Componentes (A) a (C) contenida en el Portador 1 puede ser, por ejemplo, 10 a 90% en peso, preferiblemente 30 a 80% en peso, y más preferiblemente 40 a 60% en peso, con
10 relación a la cantidad total de la composición de suministro de ácido nucleico.

15

La composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención puede contener varios aditivos tales como agentes de isotonización, excipientes, diluyentes, espesantes, estabilizadores, amortiguadores, conservantes, etc.; y/o
vehículos acuosos tales como agua purificada, soluciones de glucosa acuosas, soluciones amortiguadoras, solución salina fisiológica, etc.; de acuerdo con la
forma de uso. Las cantidades de tales aditivos y vehículos acuosos se pueden
seleccionar adecuadamente de acuerdo con la forma de uso de la composición de
suministro de ácido nucleico.

20

25

La composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención se puede utilizar por sí misma como un producto farmacéutico para terapia génica, es decir, como una composición farmacéutica. Cuando la composición de suministro de ácido nucleico de la presente invención se utiliza como una composición
farmacéutica, se seleccionan un portador de suministro de ácido nucleico, base, vehículo, etc. que son farmacológicamente aceptables. La composición
farmacéutica de la presente invención se puede formular en varias formas

farmacéuticas. Ejemplos de la forma de la composición farmacéutica de la presente invención incluyen preparaciones líquidas tales como soluciones (que incluyen jarabes y similares), gotas, inyecciones, etc.; y preparaciones sólidas tales como comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas (que incluyen 5 cápsulas blandas), etc. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una preparación líquida, se puede conservar al congelar o mediante liofilización o similares para remover agua. Las preparaciones liofilizadas, jarabes secos, etc. se pueden redissolver al momento de uso en el agua destilada para inyección, agua esterilizada, etc. Cuando la composición farmacéutica de la 10 presente invención es una preparación sólida, se puede redissolver al momento de uso en agua destilada para inyección, agua esterilizada, etc.

En la presente invención, la célula en la que se suministra un ácido nucleico, es decir, la célula a la que se aplica la composición farmacéutica de la 15 presente invención, no se limita, y puede ser una célula cultivada, una célula aislada a partir de un organismo (que incluyen estirpes celulares establecidas), una célula in vivo, etc., y se puede derivar de un humano o un animal no humano. La composición farmacéutica de la presente invención se puede aplicar ya sea in vitro o in vivo.

20 En la presente invención, se puede suministrar un ácido nucleico en una célula a través de la etapa de poner en contacto la composición farmacéutica de la presente invención con la célula. El método para poner en contacto la composición farmacéutica con una célula no se limita, mientras que una cantidad adecuada de 25 la composición de suministro de ácido nucleico se pone en contacto con la célula en la que se introduce el ácido nucleico. Por ejemplo, el método puede ser el mismo como un método conocido hasta ahora en la terapia génica, y la muestra

aplica a la cantidad que se pone en contacto: se seleccionan adecuadamente el método y la cantidad. Así, la aplicación de la composición farmacéutica de la presente invención a una célula permite un fácil suministro intracelular de un ácido nucleico, y mantiene el ácido nucleico suministrado establemente y
5 persistentemente en la célula.

Por ejemplo, para poner en contacto la composición farmacéutica de la presente invención con una célula in vitro, la célula se puede cultivar en la presencia de una cantidad adecuada de la composición farmacéutica. Para poner
10 en contacto la composición farmacéutica de la presente invención in vitro con una célula cultivada o una célula aislada a partir de un organismo, se puede llevar a cabo el contacto en la presencia de suero sanguíneo. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se pone en contacto con una célula in vivo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede poner en contacto
15 con la célula mediante, por ejemplo, inyección directa en un tejido; intravenosa, subcutánea, intramuscular, interperitoneal, o inyección intraocular, o inyección en el tracto digestivo, un diente, o similares; administración por inhalación a la cavidad nasal, cavidad oral, pulmones, o similares; administración oral; administración transdérmica; administración transmucosal a través de la mucosa
20 oral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa rectal, o mucosa uterina; o similares.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente, si es necesario, un vehículo o base farmacológicamente
25 aceptable. El vehículo y la base no se limitan mientras que no se deterioran los efectos de la presente invención, y se seleccionan adecuadamente de acuerdo con la forma de uso. Ejemplos incluyen aquellos mencionados anteriormente. En

este caso, las proporciones de la composición farmacéutica, vehículo, y base tampoco se limitan mientras que no se deterioran los efectos de la presente invención, y se seleccionan adecuadamente de acuerdo con la forma de uso.

5 En la aplicación de la composición farmacéutica de la presente invención, se aplica una cantidad efectiva de la misma. Por ejemplo, la composición farmacéutica se aplica en tal una cantidad que el complejo de ácido nucleico contenido allí se aplica en una cantidad de 0.001 a 10 pM, preferiblemente 0.001 a 1 pM, y más preferiblemente 0.01 a 0.1 pM, por célula.

10

La composición farmacéutica de la presente invención es capaz de suministrar un ácido nucleico específico en una célula. Esto es, la composición farmacéutica de la presente invención es efectiva en suministrar en una célula un ácido nucleico específico que está presente en la composición farmacéutica y que
15 forma el complejo de ácido nucleico, al poner en contacto la composición farmacéutica con la célula.

La presente invención también proporciona un método para suministrar un ácido nucleico en una célula. El método para suministrar un ácido nucleico en una
20 célula de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de poner en contacto el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico descrito anteriormente con la célula. El contacto entre el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico y la célula no se limita, mientras que se pone en contacto una cantidad adecuada del complejo de
25 ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico con la célula en la que se introduce un ácido nucleico. Por ejemplo, se puede llevar a cabo el contacto en la misma forma como un método conocido hasta ahora en terapia

génica, y lo mismo aplica a la cantidad a ser puesta en contacto: la forma y la cantidad de contacto se seleccionan adecuadamente.

Al poner el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de
5 ácido nucleico en contacto con una célula en la forma anterior, el ácido nucleico se puede mantener establemente y persistentemente en la célula. Para el contacto con la célula, se puede utilizar el complejo de ácido nucleico en sí mismo o en combinación con un vehículo o base como se describió anteriormente. También se puede utilizar la composición de suministro de ácido nucleico en sí misma o en
10 combinación con un vehículo o base como se describió anteriormente. Para un suministro de ácido nucleico intracelular más eficiente, es preferible poner en contacto la composición de suministro de ácido nucleico con la célula.

En la presente invención, como se mencionó anteriormente, la célula en la
15 que se suministra un ácido nucleico no se limita, y puede ser una célula cultivada, una célula aislada a partir de un organismo (que incluyen estirpes celulares establecidas), una célula in vivo, o similares, y se puede derivar de un humano o un animal no humano. El contacto mencionado anteriormente se puede llevar a cabo in vitro o in vivo.

20 Por ejemplo, al colocar el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico en contacto con una célula in vitro, la célula se puede cultivar en la presencia de una cantidad adecuada del complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico. Al poner el complejo de ácido
25 nucleico o composición de suministro de ácido nucleico en contacto in vitro con una célula cultivada o una célula aislada a partir de un organismo, se puede llevar a cabo el contacto en la presencia de suero sanguíneo. Cuando el complejo de

ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico se pone en contacto con una célula in vivo, el complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico se puede poner en contacto con la célula mediante, por ejemplo, inyección directa en un tejido; intravenosa, subcutánea, intramuscular, interperitoneal, o inyección intraocular, o inyección en el tracto digestivo, un diente, o similares; administración por inhalación a la cavidad nasal, cavidad oral, pulmones, o similares; administración oral; administración transdérmica; administración transmucosal a través de la mucosa oral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa rectal, o mucosa uterina; o similares.

10

En el método para el suministro de ácido nucleico en una célula de acuerdo con la presente invención, una cantidad efectiva del complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico se pone en contacto con una célula para introducir el ácido nucleico en la célula. Por ejemplo, la cantidad del complejo de ácido nucleico o composición de suministro de ácido nucleico a ser administrada se selecciona de tal manera que se administra 0.001 a 10 pM, preferiblemente 0.001 a 1 pM, y más preferiblemente 0.01 a 0.1 pM, del complejo de ácido nucleico por célula.

20

El método de suministro de un ácido nucleico en una célula de acuerdo con la presente invención se puede desarrollar al poner en contacto la composición farmacéutica con la célula. Cuando se utiliza la composición farmacéutica, se puede llevar a cabo el método de la presente invención en la misma manera como se describió anteriormente.

25

EJEMPLOS

La invención se describirá ahora en detalle en base en los Ejemplos y similares, pero la invención no se limita a estos. En los siguientes Ejemplos y Ejemplos de Prueba, se utiliza GL3-siARN (siARN a luciferasa de luciérnaga; Dharmacon Research, Inc., (Boulder, CO), USA; codificante: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT, anticodificante: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT) como siARN. Se utiliza dextrina Cluster (Ezaki Glico Co., Ltd.) como la dextrina cíclica altamente ramificada.

Ejemplo 1

Preparación del Complejo que contiene siARN y Dextrina Cíclica Altamente Ramificada

Una solución que contiene siARN en una concentración de 2 µM (solución siARN) se prepara utilizando una solución amortiguadora Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka Co., Ltd). Adicionalmente, una solución que contiene dextrina cíclica altamente ramificada en una concentración de 25 µm (solución de dextrina cíclica altamente ramificada) se prepara utilizando una solución amortiguadora Tris-EDTA (TE) (producida por Fluka). Una cantidad igual de estas soluciones se mezclan durante un minuto para formar un complejo siARN. La Tabla 1 muestra las propiedades del complejo siARN obtenido.

Tabla 1

	Diámetro de Partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
Complejo	31.1	-42.9

El diámetro de partícula mostrado es un diámetro de partícula medio (nm) medido utilizando un ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT) (el diámetro de partícula de volumen medio se mide utilizando un método de

difracción láser). El potencial zeta se mide utilizando un ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT).

Ejemplo 2

5 Preparación de Composición de Suministro de Ácido Nucleico que Contiene Complejo siARN

Se pesan la diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol, y estearilamina en una relación molar de 7: 3: 1, y se disuelven en cloroformo utilizando un matraz
10 tipo berenjena (matraz de recuperación). La solución se seca bajo presión reducida utilizando un evaporador rotatorio para formar una capa de membrana delgada de lípido. La solución que contiene 0.028 mg/ml de un complejo de siARN obtenido en el Ejemplo 1 se agrega a la capa de membrana delgada de lípido resultante de tal manera que la solución tiene una concentración DSPC de 30
15 mg/mL, y luego se mezcla. Después, el diámetro de partícula de la solución se ajusta al pasar a través de las membranas que tienen diámetros de poros de 800 nm y 200 nm utilizando un extrusor, para preparar una composición para suministro de siARN en una forma de liposoma catiónico. La composición resultante para el suministro de siARN tiene un diámetro de partícula de
20 aproximadamente 200 nm, y está en una forma de liposoma en la que las partículas tienen un tamaño de partícula uniforme. La composición tiene un potencial zeta de aproximadamente 50 mV. El diámetro de partícula mostrado es un diámetro de partícula medio (nm) medido utilizando un ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT) (el diámetro de partícula de volumen medio se mide
25 utilizando un método de difracción láser). El potencial zeta se mide utilizando un ZETASIZER 3000HSA (MALVERN INSTRUMENT).

Ejemplo 3

Preparación de la Composición de Suministro de Ácido Nucleico que Contiene Complejo siARN

- 5 Se prepara una composición de suministro de ácido nucleico en una forma de liposoma catiónico en la misma forma como en el Ejemplo 2, excepto que la relación de DSPC, colesterol, y estearilamina es 7: 3: 2. Como en el Ejemplo 2, la composición resultante para suministro de siARN tiene un diámetro de partícula de aproximadamente 200 nm, y está en una forma de liposoma en la que las
- 10 partículas tienen un tamaño de partícula uniforme. La composición tiene un potencial zeta de aproximadamente 50 mV.

Ejemplo de Prueba 1

Evaluación de la Eficiencia de Inclusión de siARN

15

- Un complejo de siARN etiquetado FITC se prepara en la misma forma como en el Ejemplo 1 anterior, utilizando siARN pre-etiquetado FITC. Utilizando el complejo de siARN etiquetado FITC, una composición de suministro de ácido nucleico en una forma de liposoma catiónico se prepara bajo las mismas
- 20 condiciones como en los Ejemplos 2 y 3. La composición de suministro de siARN inmediatamente después de la preparación se precipita mediante centrifugación (a 75,000 rpm durante 1 hora), y la intensidad de fluorescencia del siARN etiquetado FITC presente en su sobrenadante se mide para calcular la eficiencia de inclusión de siARN (un índice (%) de siARN envuelto en el liposoma para el siARN total).

25

 Como un resultado, la eficiencia de inclusión de siARN indica altos niveles de 97.2% cuando se prepara bajo las mismas condiciones como en el Ejemplo 2, y

83

99.8% cuando se prepara bajo las mismas condiciones como en el Ejemplo 3. Esto revela que el complejo de ácido nucleico de la invención tiene la característica de ser introducido eficientemente en un portador para suministro de ácido nucleico en una forma de liposoma. Aunque no se desea una interpretación restringida, esto se debe presumiblemente a que la dextrina cíclica altamente ramificada forma un complejo compacto con el siARN.

Ejemplo de Prueba 2

Prueba de Evaluación de Seguridad Celular

10

Se conduce una evaluación utilizando un ensayo MTS. Se utiliza un Ensayo de Proliferación de Célula de una Solución Acuosa de 96 CellTiter producida por Promega Corporation para el ensayo MTS. Específicamente, se inoculan células A594 (ATCC, USA) en 3.16×10^4 células/pozo en 200 μ l de Medio Eagle de Modificación Dulbecco(DMEM) que contiene 10% de volumen de suero bovino fetal (FBS) en una placa de 96 pozos, y se incuba a 37° C durante 24 horas. Después de enjuagar con Solución de Sal Balanceada Hank (HBSS) tres veces, el medio se cambia a DMEM sin FBS. Cada una de las composiciones de suministro de ácido nucleico se agrega en una cantidad de 20 μ l por pozo y se incuba a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 4 horas. Luego, el sobrenadante del cultivo en los pozos se cambia a DMEM con 10% de volumen de FBS y se incuba a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas de nuevo. Se agregan veinte μ l de un reactivo MTS (sal de tetrazolio) y 100 μ l de un medio DMEM con 10% de volumen de FBS a cada pozo, y se incuban durante dos horas. La absorbancia a 492 nm luego se determina, y se calcula la viabilidad de la célula. La viabilidad celular se calcula al ajustar la absorbancia a 492 nm determinada sin agregar la composición de

suministro de ácido nucleico, que se incubaba bajo las condiciones anteriores, como el 100%.

La Figura 2 muestra los resultados. Como se muestra en la Figura 2, llega a ser evidente que todas las composiciones de suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 2 y 3 tienen baja citotoxicidad y son altamente seguras. Particularmente, se confirma que las composiciones de suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 2 y 3 muestran un nivel significativamente alto de seguridad.

10 Ejemplo de Prueba 3

Prueba de Evaluación de Eficiencia de Suministro de siARN en las Células

La eficiencia de introducción intracelular del siARN se evalúa al medir la intensidad de fluorescencia de siARN etiquetado FITC utilizando citometría de flujo. En esta prueba, se utiliza una composición de suministro de ácido nucleico preparada con siARN pre-etiquetado FITC. Específicamente, se inoculan células A594 (ATCC, USA) en 5×10^5 células/pozo en 500 μ l de DMEM con 10% de volumen de FBS en una placa de 24 pozos, y se incubaba a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 24 horas. Después de enjuagar tres veces con HBSS, se agrega 0.95 ml de DMEM que no contiene FBS. Se agregan adicionalmente 0.05 ml de cada una de las composiciones de suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 1 y 2 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% de volumen de FBS y se incubaba a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 20 horas de nuevo. Cada pozo se enjuaga una vez con HBSS, y se agrega 0.2 ml de CellScrubBuffer (producido por Gene Therapy Systems, Inc.). Se conduce la incubación a 37° C bajo 5% de CO₂ durante 15 minutos. De nuevo, los pozos se enjuagan dos veces con HBSS, y

se raspan las células adheridas al fondo el pozo utilizando tripsina y se recolectan mediante centrifugación. 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 . La intensidad de fluorescencia de la células se mide utilizando citometría de flujo a 2 horas, 12 horas y 24 horas después de la adición de las composiciones de suministro de ácido nucleico. Como un control, la intensidad de fluorescencia de la células se mide en la misma manera como se describió anteriormente, utilizando una composición de suministro de ácido nucleico de control obtenida al mezclar una solución de Lipofectamina 2000TM (producida por Invitrogen Corporation), a menudo utilizada como un vector génico disponible comercialmente, diluida con medio OptiMEM a 0.1 mg/mL, y una solución de siARN en la que se diluye el siARN con amortiguador TE a una concentración de 2 μm en una relación de volumen de 1:1.

La Figura 3 muestra los resultados. Se confirma a partir de los resultados que el siARN se mantiene persistentemente, con su concentración mantenida constante en las células en cualquiera de los casos para las composiciones de suministro de ácido nucleico de los Ejemplos 1 y 2. Por el contrario, las composiciones de suministro de ácido nucleico de control no solo muestran baja eficiencia de suministro intracelular de siARN inicial, sino también una disminución en el siARN intracelular con tiempo, lo que resulta en cantidades insuficientes de siARN en la células a 12 horas, y 24 horas después de la adición.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un ejemplo de la dextrina cíclica altamente ramificada.

La Figura 2 muestra los resultados del Ejemplo de Prueba 2, es decir, los resultados de la evaluación de las composiciones de suministro de ácido nucleico para seguridad celular.

- 5 La Figura 3 muestra los resultados de la evaluación de la introducción de siARN en las células mediadas por cada composición de suministro de ácido nucleico en el Ejemplo de Prueba 3. La ordenada en la Figura 3 indica la intensidad de fluorescencia promedio por una célula.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico y una dextrina cíclica altamente ramificada.
5
2. El complejo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cantidad de la dextrina cíclica altamente ramificada es 1 a 4000 partes en peso por parte en peso del ácido nucleico.
10
3. El complejo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico es siARN.
4. El complejo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la dextrina cíclica altamente ramificada es un glucosano con un grado de polimerización de 50 a 5000 que tiene una porción de estructura cíclica ramificada interna formada de enlaces α -1,4-glucósido y por lo menos un enlace α -1,6-glucósido, y una porción de estructura ramificada externa unida a la porción de estructura cíclica ramificada interna.
15
20
5. El complejo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un conjunto obtenido al mezclar un ácido nucleico con una dextrina cíclica altamente ramificada en una solución acuosa.
25

6. Una composición de suministro de ácido nucleico que comprende el complejo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador de suministro de ácido nucleico.
- 5 7. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el portador de suministro de ácido nucleico es una composición que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un miembro seleccionado de colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática.
- 10 8. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el Componente (A) en el portador de suministro de ácido nucleico es una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo funcional acilo tiene 4 a 23 átomos de carbono.
- 15 9. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el Componente (B) en el portador de suministro de ácido nucleico es colesterol.
- 20 10. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el Componente (C) en el portador de suministro de ácido nucleico es una alquilamina que tiene 10 a 20 átomos de carbono.
- 25 11. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la relación molar de los Componentes (A):(B):(C) es 5-9:1-5:1.

12. La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el portador de suministro de ácido nucleico es una preparación de liposoma en la que se forma una membrana de liposoma de los Componentes (A) a (C).

5

13. Una composición farmacéutica que comprende la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12.

- 10 14. Uso de la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 para producir un producto farmacéutico para suministrar un ácido nucleico en una célula.

- 15 15. Un método para suministrar un ácido nucleico en una célula, el método comprende la etapa de poner en contacto la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 con la célula.

RESUMEN

La presente invención proporciona un complejo de ácido nucleico con baja toxicidad y alta seguridad que puede mantener persistentemente un ácido nucleico, tal como siARN o similares, en una célula; y una composición de suministro de ácido nucleico que puede suministrar eficientemente el complejo de ácido nucleico en una célula. Se puede obtener un complejo de ácido nucleico con baja toxicidad y alta seguridad que puede mantener persistentemente un ácido nucleico en una célula al formar un complejo utilizando un ácido nucleico para ser introducido en una célula, y una dextrina cíclica altamente ramificada. Más aún, cuando un portador que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) colesterol y/o un derivado del mismo, y (C) una amina primaria alifática se utiliza como un portador de suministro de ácido nucleico para introducir el complejo de ácido nucleico en una célula, se puede mejorar adicionalmente la seguridad, la eficiencia de suministro intracelular, y la persistencia del ácido nucleico en la célula.

Fig. 1

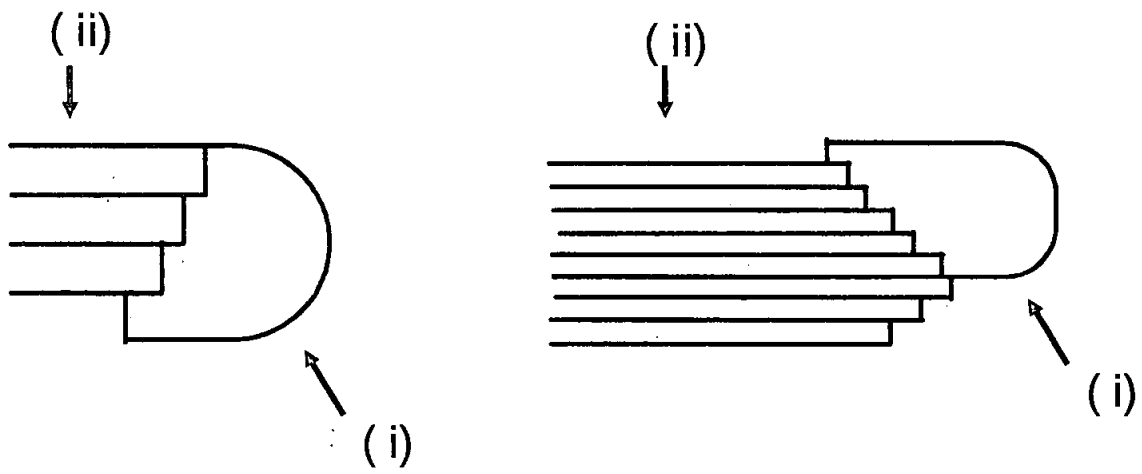


Fig. 2

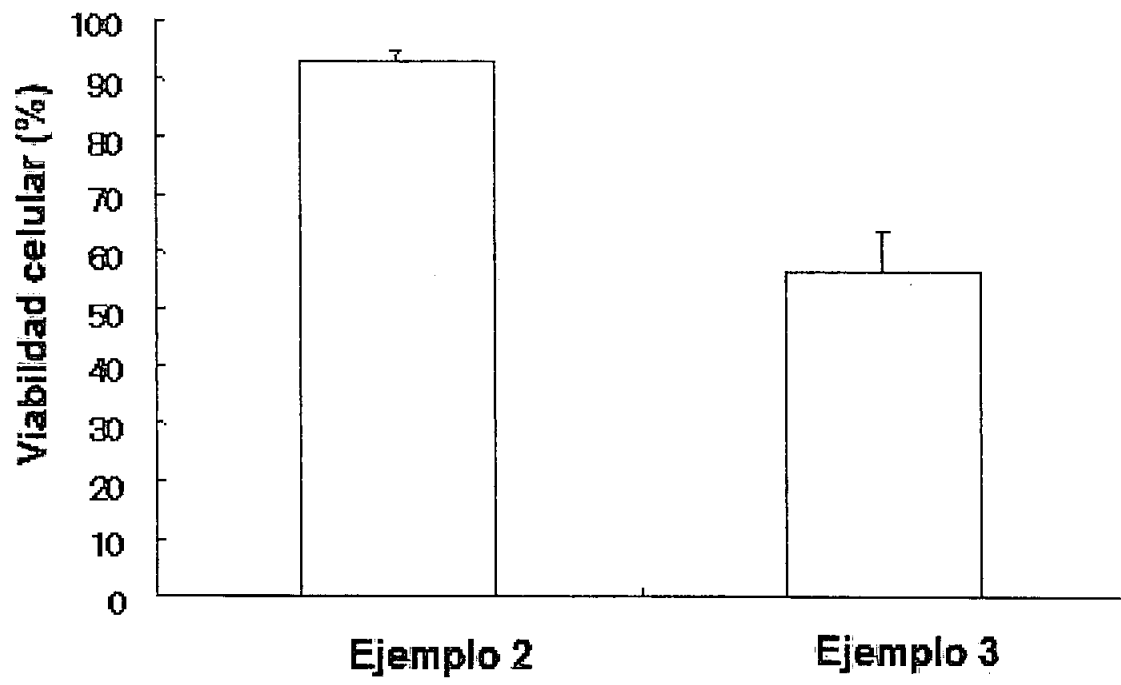
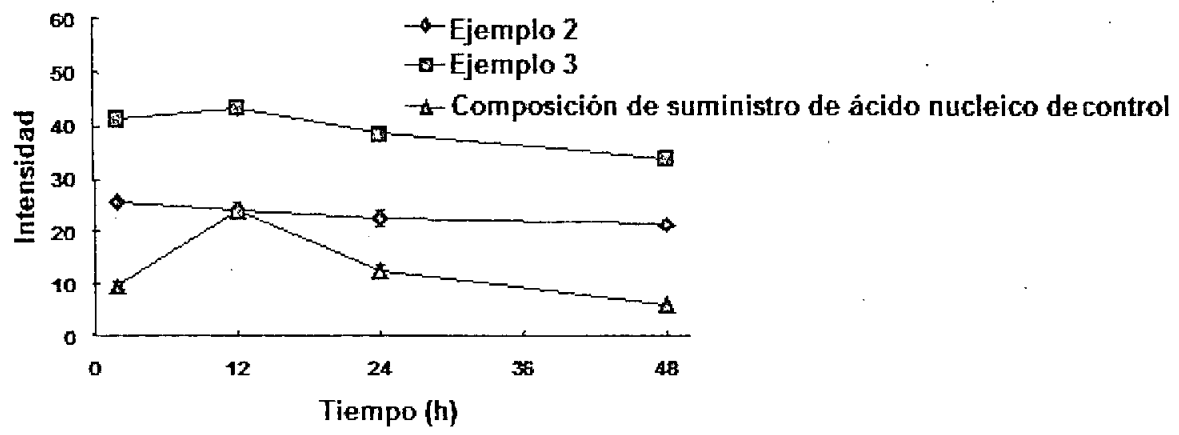


Fig. 3



94

PCT/JP 2008/070642

1/1

SEQUENCE LISTING

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

<120> NUCLEIC ACID COMPLEX AND NUCLEIC ACID DELIVERY COMPOSITION

<130> P08-118

<150> JP2007-291317
<151> 2007-11-08

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sense

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> Modified by "dTdT".

<400> 1
cuuacgcuga guacuucga 19

<210> 2
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial sequence

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> Modified by "dTdT".

<400> 2
ucgaaguacu cagcguag 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/JP2008/070642

95

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K9/127 A61K47/40 A61K47/48 A61K48/00 C12N15/87		
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) A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/033620 A2 (INSERT THERAPEUTICS INC [US]; DAVIS MARK E [US]; JENSEN GREGORY S [US]) 22 April 2004 (2004-04-22)	1-3,5-6, 13-15
Y	page 2, lines 25-31	7-12
A	page 4, line 3 - page 5, line 16	4
	page 6, line 27	
	page 58, line 19 - page 61, line 19; claim 10	
Y	EP 0 333 490 A2 (TOYO JOZO KK [JP]; TOSOH CORP [JP]) 20 September 1989 (1989-09-20) example 1	7-12
Y	JP 11 292795 A (YAMANOUCHI PHARMA CO LTD) 26 October 1999 (1999-10-26) paragraphs [0011], [0 23] - [0027]; claims 1,5	7-12
	----- -/--	
☒ 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 document 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		Date of mailing of the international search report
18 March 2010		25/03/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Marttin, Emmeline

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/JP2008/070642

96,

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 248 566 B1 (IMANAKA TADAYUKI [JP] ET AL) 19 June 2001 (2001-06-19) cited in the application the whole document -----	4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/JP2008/070642

97

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004033620	A2	22-04-2004	
		AU 2002368202 A1	04-05-2004
		CA 2465860 A1	22-04-2004
		EP 1575976 A2	21-09-2005
		HK 1091840 A1	29-05-2009
		JP 2005527639 T	15-09-2005
		US 2003157030 A1	21-08-2003
EP 0333490	A2	20-09-1989	
		DE 68908445 D1	23-09-1993
		DE 68908445 T2	21-04-1994
		JP 1238537 A	22-09-1989
JP 11292795	A	26-10-1999	
		AU 2961199 A	25-10-1999
		WO 9951751 A1	14-10-1999
US 6248566	B1	19-06-2001	
		NONE	

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

11
98.

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No. PCT/JP2008/070642	International filing date (day/month/year) 06.11.2008	Priority date (day/month/year) 08.11.2007
--	--	--

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K9/127 A61K47/40 A61K47/48 A61K48/00 C12N15/87

Applicant
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Marttin, Emmeline Telephone No. +31 70 340-2862 
---	---	---

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/JP2008/070642

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/JP2008/070642

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>4, 7-12</u>
	No: Claims	<u>1-3, 5-6, 13-15</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>4</u>
	No: Claims	<u>1-3, 5-15</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-15</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

101

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Reference is made to the following documents (for relevant passages see Search Report):

- D1 WO 2004/033620 A2 (INSERT THERAPEUTICS INC [US]; DAVIS MARK E [US]; JENSEN GREGORY S [US]) 22 April 2004 (2004-04-22)
- D2 EP 0 333 490 A2 (TOYO JOZO KK [JP]; TOSOH CORP [JP]) 20 September 1989 (1989-09-20)
- D3 JP 11 292795 A (YAMANOUCHI PHARMA CO LTD) 26 October 1999 (1999-10-26)
- D4 US 6 248 566 B1 (IMANAKA TADAYUKI [JP] ET AL) 19 June 2001 (2001-06-19) cited in the application

2 INDEPENDENT CLAIMS 1, 14 AND 15

2.1 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1, 14 and 15 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

Document D1 discloses RNAi constructs formulated as complexes including a network of beta-cyclodextrin polymers. The RNAi construct can be encapsulated in cationic liposomes. Example 1 discloses a complex of pTzU6+1/siRNA and branched PEI25k-hi-CD polymer (high degree of cyclodextrin grafting), which is considered to be a highly branched cyclic dextrin, which was delivered to cells in vitro, and in mice.

3 DEPENDENT CLAIMS 2, 3, 7-13

Dependent claims 2, 3, 7-13 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of novelty and/or inventive step (Article 33(2) and (3) PCT).

3.1 The reasons therefor are that the additional features of the said claims are either directly known from documents D2 or D3, which disclose liposomes comprising diacylphosphatidylcholine, cholesterol and stearylamine, or are a combination of features obvious to the man skilled in the art in consideration of

the disclosure of the prior art named in the present proceedings, or they concern only minor modifications which lie within the normal practice of the man skilled in the art.

4 DEPENDENT CLAIM 4

- 4.1 Document D1, which is considered to represent the most relevant state of the art, discloses RNAi constructs formulated as complexes including a network of beta-cyclodextrin polymers, from which the subject-matter of claim 4 differs in that the highly branched cyclic dextrin is a glucan with a degree of polymerization of 50 to 5000 having an inner branched cyclic structure portion formed from alpha-1,4- glucoside bonds and at least one 0-1,6-glucoside bond, and an outer branched structure portion bound to the inner branched cyclic structure portion.

The subject-matter of claim 4 is therefore novel (Article 33(2) PCT).

- 4.2 In the absence of comparative data there does not appear to be any effect resulting from the replacement of branched PEI25k-hi-CD polymer with the cyclic dextrin of claim 4. The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of an alternative cyclic dextrin that can maintain a nucleic acid in a cell and efficiently deliver the nucleic acid complex into a cell.
- 4.3 The solution to this problem proposed in claim 4 of the present application is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons: Although highly branched cyclic dextrans having a glucan with a degree of polymerization of 50 to 5000 having an inner branched cyclic structure portion formed from alpha-1,4- glucoside bonds and at least one 0-1,6-glucoside bond, and an outer branched structure portion bound to the inner branched cyclic structure portion, are known from document D4, there is no suggestion to use them for nucleic acid delivery. D4 is concerned with the provision of a glucan for the starch processing industry as a composition for drinks and foods.

5 INDEPENDENT CLAIM 15

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VII

103

Certain defects in the international application

- 1 Claims 6 and 13 comprise all the features of claim 1 and are therefore not appropriately formulated as a claim dependent on the latter (Rule 6.4 PCT).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 1 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because claims 1, 2 and 7 are not clear.
 - 1.1 The relative term "highly" used in claims 1 and 2 has no well - recognized meaning and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject - matter of said claim unclear, Article 6 PCT. The term "highly" is therefore not considered to limit the scope of the claim. The fact that there is an explicit disclosure of the meaning of such term in the description is not sufficient since the claims have to be clear in themselves.
 - 1.2 The term derivatives in claim 7 renders its scope unclear, since it is not known to the skilled reader which structures are intended to be encompassed by this term.

Terms like derivatives include compounds obtained from another compound by a chemical reaction (including compounds which are structurally remote from the starting material), functional derivatives (such as compounds, wherein hetero - atoms are exchanged by alternative atoms), compounds with numerous different types of side groups etc. Support within the meaning of Articles 6 PCT is to be found, however, only for some of the compounds claimed, namely on page 11, lines 20-30.

Consequently the subject - matter of claim 7 does not fulfil the requirements of Article 6 PCT.

204

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 009/127	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. Y HIROFUMI TAKEUCHI	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 2007-291317	(32) Fecha 08/11/2007	(33) País JP
		(72) Inventor(es) HIROFUMI TAKEUCHI Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 08/06/2010		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 14/05/2009
	Fecha de presentación de la solicitud: 06/11/2008		N° publicación: WO 2009/061003 A2
	No. de solicitud PCT/JP2008/070642		
(54) Titulo: COMPLEJO DE ÁCIDO NUCLEICO Y COMPOSICIÓN DE SUMINISTRO DE ÁCIDOS NUCLEICOS			

Reivindicación(es):

- Un complejo de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico y una dextrina ciclica altamente ramificada.
- El complejo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cantidad de la dextrina ciclica altamente ramificada es 1 a 4000 partes en peso por parte en peso del ácido nucleico.
- El complejo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico es siARN.
- El complejo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la dextrina ciclica altamente ramificada es un glucosano con un grado de polimerización de 50 a 5000 que tiene una porción de estructura ciclica ramificada interna formada de enlaces α -1,4-glucósido y por lo menos un enlace α -1,6-glucósido, y una porción de estructura ramificada externa unida a la porción de estructura ciclica ramificada interna.
- El complejo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un conjunto obtenido al mezclar un ácido nucleico con una dextrina ciclica altamente ramificada en una solución acuosa.
- Una composición de suministro de ácido nucleico que comprende el complejo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador de suministro de ácido nucleico.
- La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el portador de suministro de ácido nucleico es una composición que comprende (A) una diacilfosfatidilcolina, (B) por lo menos un miembro seleccionado de colesterol y derivados del mismo, y (C) una amina primaria alifática.
- La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el Componente (A) en el portador de suministro de ácido nucleico es una diacilfosfatidilcolina en la que el grupo funcional acilo tiene 4 a 23 átomos de carbono.

- La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el Componente (B) en el portador de suministro de ácido nucleico es colesterol.
- La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el Componente (C) en el portador de suministro de ácido nucleico es una alquilamina que tiene 10 a 20 átomos de carbono.
- La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la relación molar de los Componentes (A):(B):(C) es 5-9:1-5:1.
- La composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el portador de suministro de ácido nucleico es una preparación de liposoma en la que se forma una membrana de liposoma de los Componentes (A) a (C).
- Una composición farmacéutica que comprende la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12.
- Uso de la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 para producir un producto farmacéutico para suministrar un ácido nucleico en una célula.
- Un método para suministrar un ácido nucleico en una célula, el método comprende la etapa de poner en contacto la composición de suministro de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 con la célula.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

LGS

NIT : 200176029-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 40,445

FECHA : MAYO 19 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-068754- -00000-0000

Fecha: 2010-06-08 16:08:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664652	18/05/2010	27,147,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL C.RECARGO AÑOS 4 a 8 P	389,000.00

TOTAL :			\$ 389,000.00

SDN: TRESCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo 17257-841003-4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

106

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 40,442
FECHA : MAYO 19 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-068754- -00000-0000

Fecha: 2010-06-08 16:08:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664652	18/05/2010	27,147,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-04	PRESENTACION DE OBSERVACIONES	
12		MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	295,000.00
		TOTAL :	\$ 295,000.00

SON: DOSCIENTOS NOVENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0610 17257-841-003-4



No. 10-068754- -00000-0000

Fecha: 2010-06-08 16:08:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita 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 (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita 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 ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
HIROFUMI TAKEUCHI

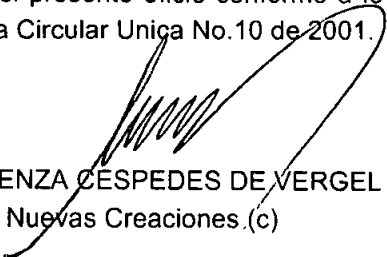
REFERENCIA	Radicación No.	10 068754
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/070642
	Fecha inicio fase nacional	08/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>07891</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones.(c)

18 JUN 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11