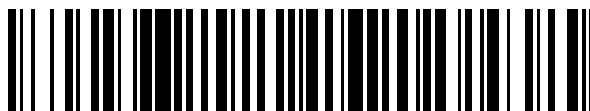


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 152**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2009 E 09803068 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2281576**

54 Título: **Micela polimérica de tipo de direccionamiento activo que porta fármaco encerrado en ella y composición medicinal**

30 Prioridad:

29.07.2008 JP 2008194825

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2013

73 Titular/es:

NANOCARRIER CO., LTD. (100.0%)
4-19, Kashiwa-no-ha 5-chome
Kashiwa-shi, Chiba 277-0882, JP

72 Inventor/es:

KATO, YASUKI;
HARADA, MITSUNORI;
SAITO, HIROYUKI y
HAYASHI, TATSUYUKI

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 432 152 T3

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

DESCRIPCIÓN

Micela polimérica de tipo de direccionamiento activo que porta fármaco encerrado en ella y composición medicinal

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una micela polimérica de direccionamiento activo que encapsula un fármaco, que se dirige a una diana de dosificación tal como una célula tumoral, una célula inflamatoria, una célula inmunocompetente, un neovaso y un endotelio vascular, y a una composición farmacéutica que utiliza la micela.

10 **Técnica antecedente**

Cuando se administra un fármaco de manera sistémica a través de la vía oral y mediante una inyección intravenosa, el fármaco se suministra no sólo a un sitio focal tal como una diana de dosificación sino también a tejido normal. Como resultado, se observan efectos adversos debido a la administración del fármaco, y en algunos casos debe cambiarse o interrumpirse el método terapéutico. Con el fin de reducir los efectos adversos, se ha desarrollado un fármaco denominado fármaco de diana molecular que tiene una capacidad de unión específica a un marcador molecular tal como un receptor, un ligando y una enzima peculiar para una diana de dosificación (véase el documento no de patente 1). Sin embargo, en la actualidad, tal fármaco de diana molecular no ha podido reducir

suficientemente los efectos adversos tal como se conoce en el caso de la aparición de pneumonitis intersticial debido a la administración de gefitinib, y además, no presenta un efecto terapéutico suficiente en un sitio focal.

Desde los puntos de vista de suministrar específicamente un fármaco a una diana de dosificación y mantener una concentración de fármaco óptima en las proximidades de la diana de dosificación, está atrayendo atracción una tecnología denominada sistema de suministro de fármaco ("*drug delivery system*", DDS). El documento de patente 1 da a conocer un DDS de conjugado de polímero de direccionamiento activo en el que se unen un fármaco y un ligando a un polímero sintético. El documento no de patente 2 da a conocer una micela que se forma mediante el autoensamblaje de un primer bloque anfifílico que consiste en folato-PEG-poli(aspartato-hidrazona-adriamicina) y un segundo copolímero de bloque anfifílico que consiste en metoxi-PEG-poli(aspartato-hidrazona-adriamicina).

[Documento patente 1] Documento WO 2002/087497

[Documento no patente 1] Asahina H, Yamazaki K, Kinoshita I, *et al.*, British Journal of Cancer, 95, 2006, págs. 998-1004

[Documento no patente 2] Bae Y *et al.*, Bioconjugate Chem., 18, 2007, págs. 1131-1139.

Sumario de la invención40 Problemas a solucionar mediante la invención

Desde el punto de vista de reducir los efectos adversos, un fármaco que no se ha suministrado apropiadamente a una diana de dosificación se elimina deseablemente del organismo antes de dañar una célula normal. En el conjugado de polímero descrito en el documento de patente 1 o en la micela descrita en el documento no de patente 2, se unen un fármaco y un ligando a una cadena de polímero sintético. Por tanto, cuando el conjugado de polímero o la micela se unen a un receptor correspondiente pero no se capta en una célula como diana de dosificación, el fármaco queda expuesto de manera continua a la sangre. Por tanto, tal DDS de direccionamiento activo convencional deja todavía espacio para la mejora con el fin de reducir los efectos adversos.

50 Medios para solucionar los problemas

La presente invención proporciona una micela polimérica de direccionamiento activo que encapsula un fármaco, que incluye una unidad polimérica de estructura principal α que tiene un sitio de unión a diana y una unidad polimérica de estructura principal β que tiene un fármaco y está libre del sitio de unión a diana, estando dispuestas la unidad polimérica de estructura principal α y la unidad polimérica de estructura principal β en una disposición radial en un estado en el que el sitio de unión a diana se dirige hacia fuera y el fármaco se dirige hacia dentro, en la que: i) cuando la micela se une a una diana mientras se mantiene la disposición radial, la micela se capta en una célula suministrando la diana a través de endocitosis, y el fármaco se libera en la célula por colapso de la disposición radial en la célula; y ii) cuando la disposición radial colapsa en la sangre antes de que la micela se una a una diana, la unidad polimérica de estructura principal β se excreta a través de metabolismo, para impedir de ese modo que una célula normal resulte dañada por el fármaco, en la que los segmentos poliméricos hidrófilos de las unidades poliméricas de estructura principal α y β son respectivamente una cadena de polietilenglicol, y los segmentos poliméricos hidrófobos de las unidades poliméricas de estructura principal α y β son respectivamente una cadena de poliaminoácido.

En la presente memoria descriptiva, el sitio de unión a diana contenido en la unidad polimérica de estructura principal α significa un sitio que tiene una función de reconocimiento biológico de poder unirse específicamente a una sustancia derivada de un organismo vivo y un virus y formar una pareja de unión biológica con la sustancia. Los ejemplos de la sustancia derivada de un organismo vivo y un virus incluyen moléculas presentes en una célula viva, una bacteria, un hongo y un virus. Los ejemplos de la célula viva incluyen una célula tumoral y una célula neovascular y sus células marginales, una célula inmunocompetente (por ejemplo, una célula B), una célula inflamatoria (por ejemplo, un leucocito), una célula endotelial vascular y células que forman diversos órganos. La unidad polimérica de estructura principal α puede contener un sitio de unión a diana incorporando compuestos tales como una proteína, un péptido y una cadena de azúcar que forman cada uno una pareja de unión con tal sustancia.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene la micela polimérica mencionada anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Efectos de la invención

En la presente invención, incorporando un fármaco y un sitio de unión a diana en unidades poliméricas separadas, se ha dotado a una micela de un mecanismo de seguridad que puede eliminar un fármaco del organismo a través del metabolismo cuando una estructura de micela colapsa antes de que la micela se capte en una célula como una diana de dosificación. Como resultado, se evita más fácilmente la aparición de efectos adversos en comparación con un DDS de direccionamiento activo convencional.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico para ilustrar un ejemplo de datos sobre la acción de daño a células cancerosas de la micela polimérica de la presente invención.

La figura 2 es un gráfico para ilustrar otro ejemplo de datos sobre la acción de daño a células cancerosas de la micela polimérica de la presente invención.

La figura 3 es un gráfico para ilustrar datos sobre el cambio temporal en el volumen tumoral debido a la administración de la micela polimérica de la presente invención.

La figura 4 es un gráfico para ilustrar datos sobre el cambio temporal en el peso corporal de animales de prueba debido a la administración de la micela polimérica de la presente invención.

La figura 5 es un gráfico para ilustrar un ejemplo de datos sobre la acción de daño a células cancerosas de una micela polimérica de direccionamiento activo que está libre de fármaco.

Las figuras 6A a 6C son cada una un diagrama conceptual para explicar la estructura y la acción de la micela polimérica de la presente invención.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Tal como se muestra en la figura 6A, una micela 100 polimérica según una realización de la presente invención tiene una unidad 10 polimérica de estructura principal α y una unidad 20 polimérica de estructura principal β . La unidad 10 polimérica de estructura principal α tiene un residuo de un compuesto que tiene un sitio 11 de unión a diana, un segmento 12 polimérico hidrófilo tipificado por una cadena de polietilenglicol y un segmento 13 polimérico hidrófobo tipificado por una cadena de poliaminoácido. El polietilenglicol puede denominarse PEG. El sitio 11 de unión a diana está unido al segmento 12 polimérico hidrófilo. La unidad 20 polimérica de estructura principal β tiene un fármaco 14, el segmento 12 polimérico hidrófilo tipificado por una cadena de polietilenglicol, y el segmento 13 polimérico hidrófobo tipificado por una cadena de poliaminoácido. El fármaco 14 está unido al segmento 13 polimérico hidrófobo a través de un enlace éster o un enlace amida. Tal como se describió anteriormente, la unidad 10 polimérica de estructura principal α tiene el sitio 11 de unión a diana y está libre del fármaco 14, y la unidad 20 polimérica de estructura principal β tiene el fármaco 14 y está libre del sitio 11 de unión a diana. Además, la unidad 10 polimérica de estructura principal α y la unidad 20 polimérica de estructura principal β están dispuestas en una disposición radial en un estado en el que el sitio 11 de unión a diana se dirige hacia fuera y el fármaco 14 se dirige hacia dentro. Tal como se muestra en la figura 6A, la micela 100 polimérica puede contener una unidad 30 polimérica de estructura principal γ que está libre del sitio 11 de unión a diana y el fármaco 14 y está constituida por el segmento 12 polimérico hidrófilo y el segmento 13 polimérico hidrófobo.

En la presente memoria descriptiva, el estado en el que la unidad 10 polimérica de estructura principal α y la unidad 20 polimérica de estructura principal β están dispuestas en una disposición radial puede ser un estado en el que las unidades están agregadas estando dirigido el sitio 11 de unión a diana hacia fuera y estando dirigido el fármaco 14 hacia dentro, y puede ser una micela que tiene una estructura de disposición radial ligeramente colapsada en la que los puntos de partida de la disposición de las unidades respectivas no coinciden entre sí. La micela 100 polimérica

puede ser un agregado polimérico secado constituido por la unidad 10 polimérica de estructura principal α y la unidad 20 polimérica de estructura principal β .

Tal como se muestra en la figura 6B, cabe la posibilidad de que, cuando la micela 100 polimérica se une a la diana 40 mientras se mantiene una disposición radial, la micela se capta en una célula 50 suministrando una diana 40 a través de endocitosis (representado en el centro en la figura 6B), y entonces se libera el fármaco 14 encapsulado en la célula 50 por el colapso de la disposición radial en la célula 50. Más específicamente, cabe la posibilidad de que la unidad 20 polimérica de estructura principal β transite a un lisosoma en la célula 50, y el fármaco 14 se libere por escisión de un enlace éster con una enzima tipificada por una esterasa.

Se sabe que, en principio, un polímero que tiene un peso molecular de varias decenas de miles o menos se excreta rápidamente en la orina a través del riñón. Por tanto, incluso si la disposición radial de la micela 100 polimérica colapsa antes de que se capte la micela en una diana de dosificación tal como se muestra en la figura 6C y el fármaco 14 se expone a la sangre 60, la unidad 20 polimérica de estructura principal β que tiene un peso molecular de varias decenas de miles o menos no se fija a la diana 40, de modo que el fármaco 14 no queda expuesto de manera continua a la sangre 60 y se elimina rápidamente del organismo a través del metabolismo. Por tanto, se ha dotado a la micela 100 polimérica de un mecanismo de seguridad para impedir que una célula normal resulte dañada por un fármaco incluso cuando una estructura de micela colapsa antes de que la micela se capte en una diana de dosificación.

Se prefiere que la unidad polimérica de estructura principal α se represente mediante la fórmula general I: $Z-A_1-B_1$ y esté constituida por un compuesto que tiene un sitio de unión a diana y un copolímero de bloque, y la unidad polimérica de estructura principal β se represente mediante la fórmula general II: $A_2-B_2(-D)$ y esté constituida por un fármaco y un copolímero de bloque. En las fórmulas: Z representa un residuo de un compuesto que tiene un sitio de unión a diana; A_1 y A_2 representan cada uno independientemente un segmento de cadena de polietilenglicol; B_1 y B_2 representan cada uno independientemente un segmento de cadena de poliaminoácido; y D representa un fármaco.

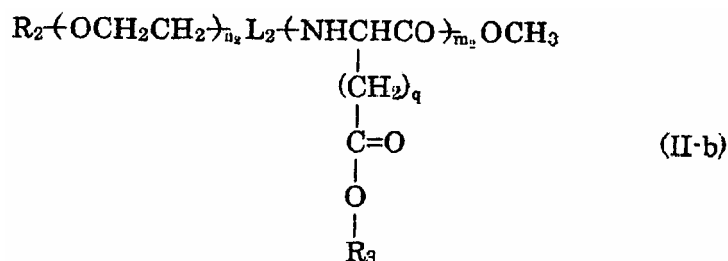
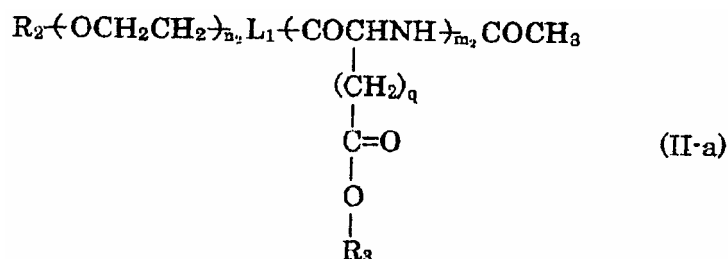
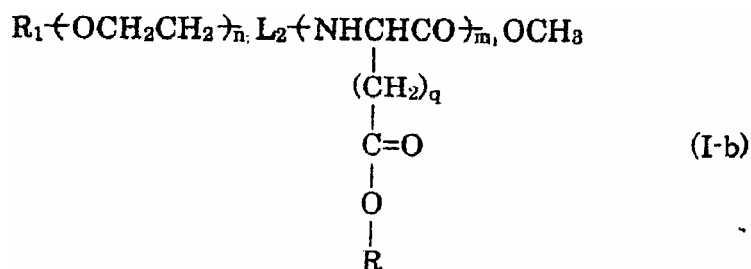
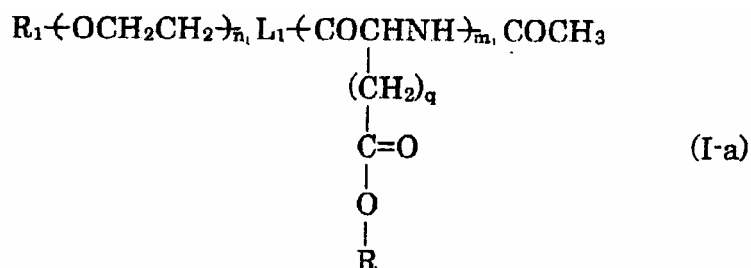
La unidad polimérica de estructura principal α puede formarse mediante una reacción de condensación o adición de un copolímero de bloque que tiene un grupo de unión tal como un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo aldehído, un grupo amino, un grupo mercapto y un grupo maleimida en el extremo terminal α del segmento de cadena de polietilenglicol, y teniendo el compuesto un sitio de unión a diana.

El extremo terminal α del segmento de cadena de polietilenglicol en la unidad polimérica de estructura principal β puede tener el grupo de unión mencionado anteriormente tal como un grupo hidroxilo, y preferiblemente tiene un grupo alcóxido o grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono (C_1 a C_{12}) o un grupo hidroxilo.

Los ejemplos del segmento de cadena de poliaminoácido incluyen poli(ácido glutámico) o su derivado de éster o amida, y poli(ácido aspártico) o su derivado de éster o amida. Tal derivado de éster o amida puede formarse dejando que un compuesto de amino o compuesto de hidroxilo correspondiente que tiene un grupo orgánico hidrófobo reaccione con un derivado reactivo (por ejemplo, un éster) de poli(ácido glutámico) o poli(ácido aspártico). Los ejemplos del grupo orgánico hidrófobo incluyen un alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (C_1 a C_6)-fenilo, colesterol y un alquilo lineal o ramificado que tiene de 8 a 18 átomos de carbono (C_8 a C_{18}).

El copolímero de bloque en la unidad polimérica de estructura principal α y la unidad polimérica de estructura principal β puede formarse mediante, por ejemplo, el método descrito en el documento JP 02-300133 A, es decir, realizando una reacción usando Y-PEG- $CH_2CH_2CH_2-NH_2$ (Y representa un grupo funcional o un sustituyente que puede estar protegido) como iniciador, y en un disolvente orgánico deshidratado, añadiendo N-carboxi- γ -bencil-L-glutamato o N-carboxi- β -bencil-L-aspartato para lograr un grado de polimerización deseado. Cuando se incorpora un grupo hidrófobo más voluminoso que un grupo bencilo, el grupo bencilo puede sustituirse por un grupo alquil C_4 -fenilo, colesterol o un grupo alquilo C_8 a C_{18} . Para tal grupo hidrófobo, puede incorporarse un grupo hidrófobo que tiene un grupo hidroxilo o un grupo amino en una cadena lateral de poli(ácido glutámico) usando un agente de condensación tal como dicitohexilcarbodiimida y diisopropilcarbodiimida en un disolvente orgánico deshidratado.

Se prefiere que la unidad polimérica de estructura principal α tenga la estructura representada por la fórmula general I-a o I-b indicada a continuación, y la unidad polimérica de estructura principal β tenga la estructura representada por la fórmula general II-a o II-b indicada a continuación:



en las que: R_1 representa un residuo de un compuesto que tiene un sitio de unión a diana; R_2 representa un grupo alquilo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono que puede tener un grupo hidroxilo en el extremo terminal; L_1 representa $O(CH_2)_pNH$; L_2 representa $O(CH_2)_pCO$; p representa un número entero que oscila entre 1 y 5; R representa un átomo de hidrógeno o un grupo orgánico hidrófobo; q representa 1 ó 2; n_1 y n_2 representan cada uno independientemente un número entero que oscila entre 40 y 450; m_1 y m_2 representan cada uno independientemente un número entero que oscila entre 20 y 80; al menos del 10% al 70% del número total m_2 de R_3 representa un residuo del fármaco que puede tener un grupo de unión; y si está presente, el resto del grupo es un átomo de hidrógeno o un grupo orgánico hidrófobo.

Tanto n_1 como n_2 representan preferiblemente un número entero que oscila entre 40 y 450, más preferiblemente un número entero que oscila entre 70 y 350, y de manera particularmente preferible un número entero que oscila entre 110 y 280. Tanto m_1 como m_2 representan preferiblemente un número entero que oscila entre 20 y 80 y más preferiblemente un número entero que oscila entre 25 y 50. Los valores numéricos de n_1 , n_2 , m_1 y m_2 son valores promedio.

En la micela 100 polimérica, la unidad 10 polimérica de estructura principal α y la unidad 20 polimérica de estructura principal β están presentes en un intervalo de 1:19 a 19:1 a una razón molar.

Tal como se describió anteriormente, los ejemplos del compuesto que tiene el sitio 11 de unión a diana incluyen una proteína, un péptido o una cadena de azúcar que forma una pareja de unión con una sustancia derivada de un organismo vivo y un virus. Los ejemplos de tal proteína incluyen un anticuerpo que se une a una sustancia derivada de un organismo vivo y un virus y un fragmento del mismo, transferrina y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los ejemplos del anticuerpo incluyen anticuerpos que reconocen antígenos tales como EGFR, Her2, CD20, VEGFR, y CD52 como receptor y antígenos de superficie celular altamente expresados en la superficie de una diana de

dosificación tipificada por una célula cancerosa. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El fragmento del anticuerpo puede ser cualquier fragmento que tenga una longitud suficiente para reconocer específicamente un antígeno, y los ejemplos del mismo incluyen (Fab')₂ y Fab. Los ejemplos del péptido incluyen insulina, LHRH, IGF y derivados de los mismos. Los ejemplos de los azúcares incluyen azúcares que tienen

5 residuos de glucosa, manosa, galactosa y fucosa.

Cuando la diana 40 con la que el residuo del compuesto que tiene el sitio 11 de unión a diana forma una pareja de unión es una sustancia derivada de un virus, la célula que suministra la sustancia está muerta por la destrucción de la membrana celular debido a un virus infectante y, por tanto, la micela 100 polimérica no puede captarse en la

10 célula a través de endocitosis. Por tanto, en la presente memoria descriptiva, cuando la diana 40 es una sustancia derivada de un virus, una célula presente alrededor de la diana 40 se considera como la célula que suministra la diana 40. Cuando la sustancia derivada de un virus está presente fuera de la célula, tal célula marginal está también infectada con el virus con una alta probabilidad y, por tanto, es significativo suministrar el fármaco a la célula marginal.

15 Los ejemplos del fármaco 14 incluyen un derivado de ácido nucleico, docetaxel, camptotecinas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D y derivados de esas epotilonas, temsirolimús, everolimús, trabectedina, vorinostat, acetato de octreotida, mitoxantrona, vincristina, cefalexina, cefaclor, ampicilina, bacampicilina, amoxicilina, kanamicina, amikacina, arbekacina, dibekacina, sisomicina, tobramicina, eritromicina, claritromicina,

20 rokitamicina, cloramfenicol, vancomicina, fluconazol, vidarabina, aciclovir, didanosina, zidovudina, zalcitabina, lamivudina, zanamivir, oseltamivir, lopinavir y ritonavir. Los ejemplos del derivado de ácido nucleico incluyen gemcitabina, nelarabina, clofarabina, decitabina, estreptozocina, doxifluridina y fludarabina. El derivado de ácido nucleico puede ser una sal. Sin embargo, se prefiere que el derivado de ácido nucleico no sea una sal cuando se deja que se una a la unidad polimérica de estructura principal β a través de un enlace éster. Para derivados de

25 epotilonas, se muestran a modo de ejemplo patupilona, ixabepilona, BMS-310705, KOS-862 y ZK-EPO.

Cuando una pluralidad de grupos hidroxilo están presentes en un fármaco, la unidad polimérica de estructura principal β puede adoptar una estructura en la que uno o más de los grupos hidroxilo está(n) unido(s) a un grupo carboxilo en una cadena lateral de poli(ácido glutámico) a través de un enlace éster. En la presente memoria

30 descriptiva, la unidad polimérica de estructura principal β también implica una estructura en la que un fármaco está unido a una pluralidad de grupos carboxilo en una cadena lateral de poli(ácido glutámico) a través de un enlace éster, y una estructura en la que dos o más restos de copolímero de bloque están reticulados mediante un fármaco.

La micela polimérica de la presente invención puede formarse, por ejemplo, mezclando la unidad polimérica de

35 estructura principal α con la unidad polimérica de estructura principal β en una disolución acuosa y dejando que la mezcla se autoensamble para dar una forma de micela. Además, la micela polimérica de la presente invención puede formarse, por ejemplo, mezclando la unidad polimérica de estructura principal β con la unidad polimérica de estructura principal γ en una disolución acuosa, dejando que la mezcla se autoensamble para dar una forma de micela y dejando entonces que un compuesto que tiene un sitio de unión a diana se una al extremo terminal α de un

40 segmento hidrófilo en la unidad polimérica de estructura principal γ . La disolución acuosa puede formarse, por ejemplo, añadiendo un disolvente orgánico compatible con agua tal como etanol y dimetilsulfóxido y un tampón convencional a agua purificada. La preparación de varias clases de unidades poliméricas de estructura principal α que tienen capacidades de unión a diana diferentes entre sí, y varias clases de unidades poliméricas de estructura principal β a las que se han unido fármacos diferentes entre sí proporciona conveniencia porque pueden formarse

45 fácilmente diversas micelas poliméricas de direccionamiento activo que encapsulan fármacos combinando apropiadamente las unidades respectivas.

Un DDS de direccionamiento activo convencional tipificado por el conjugado de polímero descrito en el documento de patente 1 se forma dejando que un compuesto que tiene un sitio de unión a diana se una a un copolímero de

50 bloque al que se ha unido un fármaco a través de un enlace éster. Sin embargo, en el proceso de dejar que un fármaco se una a un copolímero de bloque, un grupo funcional o un sustituyente al que se une un residuo del compuesto que tiene un sitio de unión a diana en el copolímero de bloque puede perder la capacidad de unión al compuesto. Además, el fármaco puede degradarse en el proceso de dejar que se una al compuesto. Por tanto, es difícil preparar el DDS de direccionamiento activo convencional de una manera sencilla. Por otro lado, tal como se

55 describió anteriormente, usando la micela polimérica de la presente invención, pueden formarse fácilmente diversas micelas poliméricas de direccionamiento activo que encapsulan fármacos mientras que se evita la desactivación del medicamento.

Según la presente invención, también puede proporcionarse una composición farmacéutica que contiene la micela polimérica mencionada anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente

60 aceptable puede ser un diluyente y un excipiente comúnmente usados en el campo técnico dependiendo de la forma farmacéutica de interés, y preferiblemente es agua purificada, agua desionizada, un agente isotónico y un ajustador del pH adecuado para la preparación de una formulación líquida y una formulación liofilizada como formulaciones parenterales.

65

La vía de administración de la composición farmacéutica de la presente invención es preferiblemente una administración parenteral tal como una administración subcutánea, una administración intravenosa, una inyección intraarterial y una administración local, y de manera particularmente preferible una inyección intravenosa. La dosis de la composición farmacéutica debe ajustarse apropiadamente dependiendo de la clase y el uso del fármaco, la edad y el género del paciente y el estado de salud del paciente, y se fija en un intervalo de 0,1 a 10.000 mg/m² y preferiblemente un intervalo de 1 a 1.000 mg/m² al día en cuanto al fármaco.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe en más detalle a modo de ejemplos.

(Ejemplo 1)

Se formó tal como sigue una micela de camptotecina unida a transferrina, que era una micela polimérica que tenía transferrina como compuesto que tiene un sitio de unión a diana, y que encapsulaba camptotecina (CPT) como fármaco.

En primer lugar, como unidad polimérica de estructura principal β , se formó un conjugado de camptotecina (PEG-pGlu-CPT) tal como sigue. Se disolvió 1 g de PEG-pGlu-Ac en 80 ml de dimetilformamida anhidra (DMF anhidra). Después de eso, se añadieron a la misma 387 mg de camptotecina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). En PEG-pGlu-Ac, PEG tiene una longitud de cadena de 12 kDa, el número promedio de residuos de ácido glutámico es de 40 y la cadena lateral de ácido glutámico es un ácido carboxílico. Posteriormente, se añadieron 823 mg de N,N'-diisopropilcarbodiimida (KOKUSAN CHEMICAL Co., Ltd.) y 136 mg de dimetilaminopiridina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en el orden establecido, y se agitó la mezcla a 4°C durante 3 días. Tras haberse elevado la temperatura hasta temperatura ambiente, se agitó adicionalmente la mezcla durante la noche. Se transfirió el líquido de reacción así obtenido a un tubo de diálisis (Spectrum Laboratories, Spectra/Por^(R) punto de corte de peso molecular 3500) y se dializó con agua purificada a 4°C. Tras la eliminación de un precipitado de color blanco, se filtró la disolución de color amarillo obtenida a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,8 μ m (Millex^(R)-AA fabricado por Millipore Corporation). Se liofilizó el filtrado proporcionando 1,1 g de PEG-pGlu-CPT como un polvo de color amarillo pálido. PEG-pGlu-CPT está en un estado (MeO-PEG-pGlu-CPT) en el que la camptotecina está unida a PEG-pGlu mediante un enlace éster. PEG-pGlu-CPT tiene una estructura representada por la fórmula general anterior II-a. PEG tiene una longitud de cadena de 12 kDa.

Se preparó un polímero (maleimida-PEG-PBLA) que tenía un grupo maleimida en el extremo terminal de PEG. En el polímero, PEG tiene una longitud de cadena de 12 kDa. Se pesaron de manera precisa 10 mg de PEG-pGlu-CPT y 10 mg de maleimida-PEG-PBLA en un vial de muestra y se complementaron con 1 ml de agua purificada. Se agitó la mezcla a 4°C durante un día y una noche completos, entonces se sometió a ultrasonificación usando un biodisruptor (High Power Unit fabricado por NISSEI Corporation) con enfriamiento con hielo durante 10 minutos, y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m (Millex^(R)GP PES fabricado por Millipore Corporation) para recuperar el filtrado. Se sometió el filtrado a filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0)] para recuperar la fracción micelar (1,5 ml). La fracción micelar contiene una micela que tiene PEG-pGlu-CPT y maleimida-PEG-PBLA dispuestos en una disposición radial.

A 40 mg de transferrina derivada de ser humano (Sigma-Aldrich Corporation) (a continuación en el presente documento, la transferrina puede denominarse Tf), se les añadieron un tampón borato 0,2 M (pH 8,0), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 100 mM y agua purificada para disolver Tf. Posteriormente, se añadieron adicionalmente 138 μ l de un reactivo de Traut 10 mg/ml (Pierce Chemical Co.) de modo que la concentración final del tampón borato sería 50 mM y la concentración final de EDTA sería 2 mM, para preparar de ese modo un total de 1 ml de un líquido mezclado. Después de eso, se dejó reposar el líquido mezclado a 30°C durante 45 minutos. Se sometió el líquido de reacción así obtenido a filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM] para recuperar la fracción de polímero (1,5 ml).

Se mezclaron 0,75 ml del líquido recuperado y 0,75 ml de la fracción micelar mencionada anteriormente entre sí y se dejaron reposar a 30°C durante 2 horas, para dejar de ese modo que el grupo maleimida en maleimida-PEG-PBLA reaccionara con Tf. Por tanto, se formó una micela que contenía un polímero unido a transferrina como unidad polimérica de estructura principal α . El polímero unido a transferrina tiene una estructura representada por la fórmula general anterior I-a. PEG tiene una longitud de cadena de 12 kDa. En el líquido de reacción, el tampón fosfato de sodio tiene una concentración final de 20 mM, y EDTA tiene una concentración final de 1 mM. Posteriormente, se añadió un tampón formiato de amonio 200 mM al líquido de reacción para ajustar el pH a 5. Después de eso, se purificó el líquido de reacción mediante filtración en gel [Sephacrose CL-4B (1 Φ X30 cm), eluyente: tampón acetato de sodio 20 mM (pH 5,0)] para eliminar Tf sin reaccionar.

Se concentró la fracción micelar recuperada hasta aproximadamente 2 ml mediante ultrafiltración (Amicon Ultra-15 fabricado por Millipore Corporation), entonces se complementó con un tampón NaHCO₃-Na₂CO₃ (pH 9,6) para ajustar el pH a 7, se complementó adicionalmente con 20 μ l de una disolución de cisteína 100 mM y se dejó reposar

a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se sometió el líquido de reacción así obtenido a filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4)] para recuperar la fracción de polímero (3 ml). A la fracción de polímero se le añadieron 30 µl de cada uno de FeCl₃ 1 M y Na₂CO₃ 100 mM (ajustado con ácido cítrico 100 mM para tener un pH de 7,0). Se dejó reposar el líquido mezclado así obtenido a 4°C durante la noche, y entonces se sometió a ultrafiltración (Amicon Ultra-15 fabricado por Millipore Corporation). Se concentró finalmente el líquido mezclado hasta aproximadamente 2 ml realizando repetidamente la dilución con un tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4) y la eliminación del ión hierro. Se filtró el líquido concentrado a través de un filtro de 0,22 µm (Millex^(R) GV fabricado por Millipore Corporation) para recuperar el filtrado. Por tanto, se obtuvo una disolución que contenía una micela de camptotecina unida a transferrina.

(Ejemplo 2)

Se formó una micela de docetaxel unida a transferrina, que era una micela polimérica que tenía transferrina como compuesto que tiene un sitio de unión a diana, y que encapsulaba docetaxel como fármaco, de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto porque la unidad polimérica de estructura principal β se cambió por un conjugado de docetaxel (PEG-pGlu-DTX) usando docetaxel (DTX) como fármaco. Los restos de copolímero de bloque que forman PEG en la unidad polimérica de estructura principal α y la unidad polimérica de estructura principal β tenían una longitud de cadena de 10 kDa en ambas unidades. PEG-pGlu-DTX está en un estado (MeO-PEG-pGlu-DTX) en el que el docetaxel está unido a PEG-pGlu mediante un enlace éster, y tiene una estructura representada por la fórmula general anterior II-a.

Se formó PEG-pGlu-DTX como unidad polimérica de estructura principal β tal como sigue. Se disolvieron 500 mg de un copolímero de bloque de polietilenglicol-poli(ácido glutámico) (PEG-pGlu-Ac) en el que el poli(ácido glutámico) se había acetilado en un extremo terminal en 10 ml de DMF anhidra (Kanto Chemical Co., Inc.). Después de eso, se añadieron al mismo 1,06 g de docetaxel (ScinoPharm Taiwan, Ltd). En PEG-pGlu-Ac, PEG tiene un peso molecular promedio de 10.000, el número promedio de residuos de ácido glutámico es de 40 y la cadena lateral de ácido glutámico es un ácido carboxílico. Posteriormente, se añadieron 160 mg de 4-dimetilaminopiridina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 210 µl de N,N'-diisopropilcarbodiimida (KOKUSAN CHEMICAL Co., Ltd.) en el orden establecido, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se hizo gotear el líquido de reacción así obtenido en 500 ml de una disolución mezclada de hexano y acetato de etilo (razón en volumen: 1:1) para cristalizar el polímero. Después de eso, se recogió el polímero mediante filtración a presión reducida. Se suspendió el polímero recogido mediante filtración en 100 ml de agua purificada para preparar una micela polimérica. Se sometió la micela polimérica a ultrafiltración (LabScale TFF System fabricado por Millipore Corporation, valor de punto de corte de peso molecular: 100.000, diluido 5 veces y entonces concentrado hasta 100 ml). Se realizó repetidamente la operación de ultrafiltración 5 veces, seguido por liofilización. El polímero obtenido mediante liofilización, que se había disuelto en 10 ml de DMF anhidra, se hizo gotear en 500 ml de una disolución mezclada de hexano y acetato de etilo (razón en volumen: 1:1) para cristalizar el polímero. Después de eso, se recogió el polímero mediante filtración a presión reducida. Se lavó el polímero recogido mediante filtración en una forma de polvo añadiendo el polímero a 100 ml de una disolución mezclada de hexano y acetato de etilo (razón en volumen: 1:1) y entonces se recogió mediante filtración a presión reducida. Se secó el polímero recogido mediante filtración a presión reducida a temperatura ambiente durante la noche proporcionando 530 mg de PEG-pGlu-DTX como un polvo de color amarillo pálido.

Se disolvió 1 mg de PEG-pGlu-DTX en 10 ml de una disolución mezclada de agua purificada y etanol (razón en volumen: 1:1). Se midió el contenido de docetaxel mediante la absorbancia de luz a una longitud de onda de 233 nm y se encontró que era de 14,3 moléculas por polímero. PEG-pGlu-DTX está en un estado (MeO-PEG-pGlu-DTX) en el que el docetaxel está unido a PEG-pGlu-Ac mediante un enlace éster. PEG-pGlu-DTX tiene una estructura representada por la fórmula general anterior II-a. PEG tiene una longitud de cadena de 10 kDa.

(Ejemplo 3)

Se formó tal como sigue una micela de docetaxel unida a EGF, que era una micela polimérica que tenía factor de crecimiento epidérmico (EGF) como compuesto que tiene un sitio de unión a diana, y que encapsulaba docetaxel (DTX) como fármaco.

Se formó un conjugado de DTX (PEG-pGlu-DTX) como unidad polimérica de estructura principal β de la misma manera que en el ejemplo 2.

Se preparó un polímero (maleimida-PEG-PBLA) que tenía una longitud de cadena de PEG de 10 kDa y que tenía un grupo maleimida en el extremo terminal de PEG. Se pesaron de manera precisa 5 mg del polímero y 5 mg de PEG-pGlu-DTX en un vial de muestra, se complementaron con 1 ml de agua purificada y entonces se trataron de la misma manera que en el ejemplo 1, para recuperar de ese modo la fracción micelar (1,5 ml). La fracción micelar contiene una micela que tiene PEG-pGlu-DTX y maleimida-PEG-PBLA dispuestos en una disposición radial.

A un vial cargado con 1 mg de EGF humano recombinante (R&D Systems, Inc.), se le añadió 1 ml de agua purificada para preparar una disolución de EGF 1 mg/ml. A 0,5 ml de la disolución de EGF, se les añadieron un

tampón borato 0,2 M (pH 8,0), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 100 mM y agua purificada, y se añadieron adicionalmente 138 µl de un reactivo de Traut 10 mg/ml (Pierce Chemical Co.) de modo que la concentración final del tampón borato sería 50 mM y la concentración final de EDTA sería 2 mM, para preparar de ese modo un total de 1 ml de un líquido mezclado. Después de eso, se dejó reposar el líquido mezclado a 30°C durante 45 minutos. Posteriormente, se sometió el líquido de reacción así obtenido a filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM] para recuperar la fracción de polímero (1,5 ml).

Se mezclaron 1,5 ml del líquido recuperado y 0,5 ml de la fracción micelar mencionada anteriormente entre sí y se dejaron reposar a 30°C durante 2 horas, para permitir de ese modo que el grupo maleimida en maleimida-PEG-PBLA reaccionara con EGF. Por tanto, se formó una micela que contenía un polímero unido a EGF como unidad polimérica de estructura principal α. El polímero unido a EGF tiene una estructura representada por la fórmula general anterior I-a. Se purificó el líquido de reacción así obtenido mediante filtración en gel [Sephacrose CL-4B (1ΦX30 cm), eluyente: tampón acetato de sodio 20 mM (pH 7,4)] para eliminar EGF sin reaccionar.

Se concentró la fracción micelar recuperada hasta aproximadamente 2 ml mediante ultrafiltración (Amicon Ultra-15 fabricado por Millipore Corporation) proporcionando una disolución que contenía una micela de docetaxel unida a EGF.

(Ejemplo 4)

Se formó tal como sigue una micela de everolímús unida a anticuerpo anti-RANKL, que era una micela polimérica que tenía un anticuerpo anti-RANKL como compuesto que tiene un sitio de unión a diana, y que encapsulaba everolímús (EVE) como fármaco.

En primer lugar, se formó un conjugado de everolímús (PEG-pGlu-EVE) como unidad polimérica de estructura principal β tal como sigue. Se disolvieron 140 mg de un copolímero de bloque de polietilenglicol-poli(ácido glutámico) (PEG-pGlu-Ac) en el que el poli(ácido glutámico) se había acetilado en un extremo terminal en 10 ml de DMF anhidra (Kanto Chemical Co., Inc.) y entonces se complementaron adicionalmente con 142 mg de everolímús (MOLCAN Co.). En PEG-pGlu-Ac, PEG tiene un peso molecular promedio de 10.000, el número promedio de residuos de ácido glutámico es de 40 y la cadena lateral de ácido glutámico es un ácido carboxílico. Posteriormente, se añadieron 16,9 mg de 4-dimetilaminopiridina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 22,0 µl de N,N'-diisopropilcarbodiimida (KOKUSAN CHEMICAL Co., Ltd.) en el orden establecido, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se hizo gotear el líquido de reacción así obtenido en 100 ml de una disolución mezclada de hexano y acetato de etilo (razón en volumen: 3:1) para cristalizar el polímero. Después de eso, se recogió el polímero mediante filtración a presión reducida. Se dializó el polímero recogido mediante filtración, que se había disuelto en DMF anhidra, con 1 l de agua destilada durante 2 días [punto de corte de peso molecular (MWCO) =3500, se intercambió el agua destilada 4 veces] y entonces se liofilizó. Se hizo gotear el polímero obtenido mediante liofilización, que se había disuelto en 10 ml de DMF anhidra, en 100 ml de una disolución mezclada de hexano y acetato de etilo (razón en volumen: 3:1) para cristalizar el polímero. Después de eso, se recogió el polímero mediante filtración a presión reducida. Se lavó el polímero recogido mediante filtración en una forma de polvo añadiendo el polímero a 100 ml de una disolución mezclada de hexano y acetato de etilo (razón en volumen: 3:1) y se recogió mediante filtración a presión reducida. Se secó el polímero recogido mediante filtración a presión reducida a temperatura ambiente durante la noche proporcionando 180 mg de PEG-pGlu-EVE como un polvo de color amarillo pálido.

Se disolvió 1 mg de PEG-pGlu-EVE en 25 ml de una disolución mezclada (razón en volumen: 1:1) de agua purificada y metanol. Se midió el contenido de everolímús mediante la absorbancia de luz a una longitud de onda de 278 nm y se encontró que era de 12,6 moléculas por polímero. PEG-pGlu-EVE está en un estado (MeO-PEG-pGlu-EVE) en el que el everolímús está unido a PEG-pGlu mediante un enlace éster. PEG-pGlu-EVE tiene una estructura representada por la fórmula general anterior II-a. PEG tiene una longitud de cadena de 10 kDa.

Se pesaron de manera precisa 5 mg de PEG-pGlu-EVE en un vial de muestra y se complementaron con 1 ml de agua purificada. Se agitó la mezcla a 4°C durante un día y una noche completos, entonces se sometió a ultrasonificación usando un biodisruptor (High Power Unit fabricado por NISSEI Corporation) con enfriamiento con hielo durante 10 minutos, y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millex[®] GP PES fabricado por Millipore Corporation) para recuperar el filtrado. El filtrado contiene PEG-pGlu-EVE como unidad polimérica de estructura principal β.

Se formó un polímero unido a anticuerpo anti-RANKL como unidad polimérica de estructura principal α tal como sigue. Se preparó un polímero (maleimida-PEG-PBLA) que tenía un grupo maleimida en el extremo terminal de PEG. En el polímero, PEG tiene una longitud de cadena de 10 kDa. Se pesaron de manera precisa 5 mg de maleimida-PEG-PBLA en un vial de muestra, y se añadió 1 ml de un tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) a la misma. Se agitó la mezcla a 4°C durante un día y una noche completos, entonces se sometió a ultrasonificación usando un biodisruptor (High Power Unit fabricado por NISSEI Corporation) con enfriamiento con hielo durante

10 minutos, y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm (Millex^(R) GP PES fabricado por Millipore Corporation) para recuperar un filtrado que contenía maleimida-PEG-PBLA.

A un vial cargado con 500 μg de un anticuerpo anti-RANKL (R&D Systems, Inc.), se le añadieron 0,5 ml de PBS para preparar una disolución de anticuerpo anti-RANKL 1 mg/ml. A 0,4 ml de la disolución de anticuerpo anti-RANKL, se les añadieron un tampón borato 0,2 M (pH 8,0), EDTA 100 mM y agua purificada, y se añadieron adicionalmente 2 μl de un reactivo de Traut 10 mg/ml (Pierce Chemical Co.) de modo que la concentración final del tampón borato sería 50 mM y la concentración final de EDTA sería 2 mM, para preparar de ese modo un total de 0,6 ml de un líquido mezclado. Después de eso, se dejó reposar el líquido mezclado a 30°C durante 45 minutos. Posteriormente, se sometió el líquido de reacción así obtenido a filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM] para recuperar la fracción de polímero (1,5 ml).

Se mezclaron 1,5 ml del líquido recuperado y 38 μl del filtrado mencionado anteriormente que contenía maleimida-PEG-PBLA entre sí, se dejaron reposar a 30°C durante 2 horas, y se dejaron reposar adicionalmente a 4°C durante la noche, para permitir de ese modo que el grupo maleimida en maleimida-PEG-PBLA reaccionara con un anticuerpo anti-RANKL. Por tanto, se formó un polímero unido a anticuerpo anti-RANKL como unidad polimérica de estructura principal α . El polímero unido a anticuerpo anti-RANKL tiene una estructura representada por la fórmula general anterior I-a. Se purificó el líquido de reacción así obtenido mediante filtración en gel [Sephacrose CL-4B (1 Φ X30 cm), eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4)] para eliminar el anticuerpo modificado con SH sin reaccionar.

Se concentró la fracción micelar recuperada hasta aproximadamente 1 ml mediante ultrafiltración (Amicon Ultra-15 fabricado por Millipore Corporation, valor de punto de corte de peso molecular: 100.000) proporcionando una disolución que contenía un polímero unido a anticuerpo anti-RANKL.

Se mezclaron 36 μl del filtrado que contenía PEG-pGlu-EVE y 500 μl de la disolución que contenía un polímero unido a anticuerpo anti-RANKL entre sí y se dejaron reposar a 4°C durante 3 días, para proporcionar de ese modo una disolución que contenía una micela de everolimús unida a anticuerpo anti-RANKL. La micela de everolimús unida a anticuerpo anti-RANKL tenía un diámetro de partícula promedio de 119 nm, que se midió con un instrumento Zetasizer (Malvern Instruments Ltd.).

(Ejemplo 5)

Se formó tal como sigue una micela de everolimús unida a transferrina, que era una micela polimérica que tenía transferrina como compuesto que tiene un sitio de unión a diana, y que encapsulaba everolimús (EVE) como fármaco.

De la misma manera que en el ejemplo 4, se obtuvo un filtrado que contenía PEG-pGlu-EVE como unidad polimérica de estructura principal β .

Se formó un polímero unido a transferrina como unidad polimérica de estructura principal α tal como sigue. En primer lugar, de la misma manera que en el ejemplo 4, se obtuvo un filtrado que contenía maleimida-PEG-PBLA. Se disolvieron 10 mg de transferrina humana (Sigma-Aldrich Corporation) en 1 ml de agua purificada para preparar una disolución de transferrina. A 696 μl de la disolución transferrina, se les añadieron un tampón borato 0,2 M (pH 8,0), EDTA 100 mM y agua purificada, y se añadieron adicionalmente 34 μl de un reactivo de Traut 10 mg/ml (Pierce Chemical Co.) de modo que la concentración final del tampón borato sería 50 mM y la concentración final de EDTA sería 2 mM, para preparar de ese modo un total de 1 ml de un líquido mezclado. Después de eso, se dejó reposar el líquido mezclado a 30°C durante 45 minutos. Posteriormente, se sometió el líquido de reacción así obtenido a filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM] para recuperar la fracción de polímero (1,5 ml).

Se mezclaron 1,5 ml del líquido recuperado y 0,9 ml del filtrado mencionado anteriormente que contenía maleimida-PEG-PBLA (concentración de polímero: 5 mg/ml) entre sí, se dejaron reposar a 30°C durante 2 horas (concentración final de tampón fosfato de sodio (pH 7,0): 20 mM, concentración final de EDTA: 1 mM), y se dejaron reposar adicionalmente a 4°C durante la noche, para dejar de ese modo que el grupo maleimida en maleimida-PEG-PBLA reaccionara con transferrina. Por tanto, se formó un polímero unido a transferrina como unidad polimérica de estructura principal α . El polímero unido a transferrina tiene una estructura representada por la fórmula general anterior I-a.

Se purificó el líquido de reacción así obtenido mediante filtración en gel [Sephacrose CL-4B (1 Φ X30 cm), eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4)] para eliminar la transferrina modificada con SH sin reaccionar. Se concentró la fracción micelar recuperada hasta aproximadamente 2 ml mediante ultrafiltración (Amicon Ultra-15 fabricado por Millipore Corporation, valor de punto de corte de peso molecular: 100.000), entonces se complementó con un tampón $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ (pH 9,6) para ajustar el pH a 7, y se complementó adicionalmente con 20 μl de una disolución de cisteína 100 mM, y se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se sometió

el líquido de reacción así obtenido a filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4)] para recuperar la fracción de polímero (3 ml). A la fracción de polímero, se le añadieron 30 µl cada uno de FeCl₃ 1 M y Na₂CO₃ 100 mM (ajustados a pH de 7,0 con ácido cítrico 100 mM). Se dejó reposar el líquido mezclado así obtenido a 4°C durante la noche y entonces se sometió a

5 ultrafiltración (Amicon Ultra-15 fabricado por Millipore Corporation, valor de punto de corte de peso molecular: 100.000). Se concentró finalmente el líquido mezclado hasta aproximadamente 3 ml realizando repetidamente la dilución con un tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4) y la eliminación del ión hierro, para proporcionar de ese modo una disolución que contenía un polímero unido a transferrina.

10 Se mezclaron 200 µl del filtrado que contenía PEG-pGlu-EVE y 500 µl de la disolución que contenía un polímero unido a transferrina entre sí y se dejaron reposar a 4°C durante 3 días, para proporcionar de ese modo una disolución que contenía una micela de everolimús unida a transferrina. La micela de everolimús unida a transferrina tenía un diámetro de partícula promedio de 106 nm, que se midió con un instrumento Zetasizer (Malvern Instruments Ltd.).

15 (Ejemplo comparativo 1)

Se formó tal como sigue una micela polimérica que estaba libre de un residuo de un compuesto que tiene un sitio de unión a diana y docetaxel encapsulado como fármaco (a continuación en el presente documento, denominada micela de DTX no unida a Tf para facilidad de explicación). Se pesaron de manera precisa 10 mg de PEG-pGlu-DTX formado en el ejemplo 2 en un vial de muestra, se complementaron con 1 ml de un tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) y se suspendieron. Se agitó la suspensión a 4°C durante un día y una noche completos y entonces se sometió a ultrasonificación con un biodisruptor (High Power Unit fabricado por NISSEI Corporation) con enfriamiento con hielo durante 10 minutos, y se filtró a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm [Millex^(R)GP PES fabricado por Millipore Corporation] para recuperar el filtrado. Se sometió el filtrado a filtración en gel (PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: disolución de sacarosa al 10%) proporcionando una fracción de polímero que contenía una micela de DTX no unida a Tf.

30 (Ejemplo comparativo 2)

Se formó tal como sigue una micela polimérica que estaba libre de un residuo de un compuesto que tiene un sitio de unión a diana y camptotecina encapsulada como fármaco (a continuación en el presente documento, denominada micela de CPT no unida a Tf para facilidad de explicación). Se pesaron de manera precisa 10 mg de PEG-pGlu-CPT formado en el ejemplo 1 en un vial de muestra, se complementaron con 1 ml de agua purificada y se suspendieron. Se agitó la suspensión a 4°C durante un día y una noche completos, entonces se sometió a ultrasonificación con un biodisruptor (High Power Unit fabricado por NISSEI Corporation) con enfriamiento con hielo durante 10 minutos, y se filtró a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm [Millex^(R)GP PES fabricado por Millipore Corporation] para recuperar el filtrado. Se sometió el filtrado a filtración en gel (PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0)) proporcionando una fracción de polímero que contenía una micela de CPT no unida a Tf.

40 (Ejemplo comparativo 3)

Se formó tal como sigue una micela polimérica que tenía Tf como compuesto que tiene un sitio de unión a diana y estaba libre de un fármaco (a continuación en el presente documento, denominada micela vacía unida a Tf para facilidad de explicación).

Se preparó un polímero (maleimida-PEG-PBLG) que tenía un grupo maleimida en el extremo terminal de PEG. En el polímero, PEG tiene una longitud de cadena de 10 kDa. Se pesaron de manera precisa 5 mg de maleimida-PEG-PBLG en un vial de muestra y se complementaron con 1 ml de un tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0). Se agitó la mezcla a 4°C durante un día y una noche completos, entonces se sometió a ultrasonificación usando un biodisruptor (High Power Unit fabricado por NISSEI Corporation) con enfriamiento con hielo durante 10 minutos, y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millex^(R)GP PES fabricado por Millipore Corporation), para recuperar de ese modo un filtrado que contenía maleimida-PEG-PBLG.

55 A 10 mg de Tf derivada de ser humano (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), se les añadieron un tampón borato 0,2 M (pH 8,0), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 100 mM y agua purificada para disolver Tf. Posteriormente, se añadieron adicionalmente 34 µl de un reactivo de Traut 10 mg/ml (Pierce Chemical Co.) de modo que la concentración final del tampón borato sería 50 mM y la concentración final de EDTA sería 2 mM, para preparar de ese modo un total de 1 ml de un líquido mezclado. Después de eso, se dejó reposar el líquido mezclado a 30°C durante 45 minutos. Se sometió el líquido de reacción así obtenido a filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM] para recuperar la fracción de polímero (1,5 ml).

65 Se mezclaron 1,5 ml del líquido recuperado y 0,9 ml del filtrado mencionado anteriormente que contenía maleimida-

PEG-PBLG entre sí, se dejaron reposar a 30°C durante 2 horas, y se dejaron reposar adicionalmente a 4°C durante la noche, para dejar de ese modo que el grupo maleimida en maleimida-PEG-PBLG reaccionara con Tf. Se purificó el líquido de reacción así obtenido mediante filtración en gel [Sephacrose CL-4B (2ΦX30 cm), eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0)] para eliminar Tf modificada con SH sin reaccionar.

Se sometió la fracción de polímero recuperada mediante filtración en gel a ultrafiltración (Amicon Ultra-15 fabricado por Millipore Corporation, valor de punto de corte de peso molecular: 100.000) para recuperar la fracción de polímero (4 ml). Con 0,5 ml de la fracción de polímero, se mezclaron 50 µl de FeCl₃ 100 mM (ácido cítrico 100 mM ajustado con Na₂CO₃ 1 M para tener un pH de 7,0). Se dejó reposar el líquido mezclado así obtenido a 4°C durante 2 horas. Después de eso, se eliminó el ión hierro en exceso mediante filtración en gel [PD-10 fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd., eluyente: tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0)] proporcionando una disolución que contenía una micela vacía unida a Tf.

[Prueba de citotoxicidad 1]

Se comparó la citotoxicidad de la micela de DTX unida a Tf en el ejemplo 2 con la citotoxicidad de la micela de DTX no unida a Tf en el ejemplo comparativo 1. Se evaluó la citotoxicidad de cada micela basándose en un método de WST usando una célula MDA-MB-231 de cáncer de mama humano adquirida de la Colección Europea de Cultivo Celular (ECACC) a través de DS Pharma Biomedical Co., Ltd. tal como se describe a continuación.

Se sembró la célula MDA-MB-231 de cáncer de mama humano, que se había suspendido en 90 µl de un medio, en una placa de 96 pocillos de modo que la célula estuviese contenida a una concentración de aproximadamente 5000 células por pocillo, y se cultivó bajo una atmósfera de 37°C y un 5% de CO₂ durante la noche. El medio estaba formado por RPMI1640 (Gibco™, Invitrogen) y suero bovino fetal al 10% (FBS, Biowest). Posteriormente, se añadió a cada pocillo (10 µl por pocillo) cada uno de los líquidos de muestra a diversas concentraciones de DTX obtenidos diluyendo la disolución micelar en el ejemplo 2 y la disolución micelar en el ejemplo comparativo 1 con el medio, y se realizó el cultivo bajo una atmósfera de 37°C y un 5% de CO₂ durante 2 horas. Después de eso, se eliminó el medio del pocillo, se lavó el pocillo dos veces con solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBS) y se complementó con un medio nuevo (100 µl por pocillo), y se continuó el cultivo hasta que el tiempo de cultivo total alcanzó 72 horas. Después de eso, se añadió un reactivo de WST (Dojindo Laboratories) (10 µl por pocillo), y se continuó el cultivo bajo una atmósfera de 37°C y un 5% de CO₂ durante aproximadamente 2 horas. A partir de cada pocillo, se midió la absorbancia (Abs450) de luz a una longitud de onda de 450 nm, y se calculó la tasa de crecimiento celular (% de crecimiento celular) basándose en la ecuación matemática indicada a continuación. Debe indicarse que “valor de Abs450 de control” en la ecuación matemática significa una absorbancia obtenida a partir de un pocillo en el que se ha realizado el cultivo mencionado anteriormente usando un líquido de cultivo libre de DTX.

$$\% \text{ de crecimiento celular} = \frac{[(\text{valor de Abs450 tras la adición de líquido de muestra}) - (\text{valor de Abs450 de blanco})]}{[(\text{valor de Abs450 de control}) - (\text{valor de Abs450 de blanco})]} \times 100$$

La figura 1 es un gráfico que ilustra una tasa de crecimiento celular de una célula MDA-MB-231 frente a una concentración de docetaxel. El eje horizontal en el gráfico representa un valor de la cantidad de una micela en un líquido de muestra expresada en una concentración de docetaxel. Los cuadrados negros son datos en el caso de añadir la micela de DTX no unida a Tf, y los triángulos negros son datos en el caso de añadir la micela de DTX unida a Tf. La barra de error en cada uno de los datos es la desviación estándar (DE). Tal como se muestra en el gráfico de la figura 1, la citotoxicidad de la micela de DTX unida a Tf sobre la célula MDA-MB-231 se presentó a partir de una concentración de DTX notablemente baja en comparación con la de la micela de DTX no unida a Tf.

[Prueba de citotoxicidad 2]

En la prueba de citotoxicidad 2, se examinó la citotoxicidad de cada una de la micela de DTX unida a Tf en el ejemplo 2 y la micela de DTX no unida a Tf en el ejemplo comparativo 1 de la misma manera que en la prueba de citotoxicidad 1 excepto porque el tiempo de cultivo que va a realizarse con la adición del líquido de muestra se cambió a 72 horas, inmediatamente después de eso, se añadió un reactivo de WST en una cantidad de 10 µl por pocillo, y se continuó el cultivo bajo una atmósfera de 37°C y un 5% de CO₂ durante aproximadamente 2 horas.

Se calculó la concentración de DTX en cada micela basándose en la absorbancia de luz a una longitud de onda de 233 nm. Se restó la contribución de Tf (tipo apo) en la absorbancia de luz a una longitud de onda de 233 nm en el caso de la micela de DTX unida a Tf.

La figura 2 es un gráfico que ilustra una tasa de supervivencia de una célula MDA-MB-231 frente a una concentración de docetaxel. El eje longitudinal, el eje horizontal, los cuadrados negros y los triángulos negros en el gráfico tienen los mismos significados que los del gráfico de la figura 1. La barra de error en cada uno de los datos es la desviación estándar (DE). Tal como se muestra en el gráfico de la figura 2, la citotoxicidad de la micela de DTX unida a Tf sobre la célula MDA-MB-231 se presentó a partir de una concentración de DTX notablemente baja en comparación con la de la micela de DTX no unida a Tf.

[Prueba de citotoxicidad 3]

En la prueba de citotoxicidad 3, se examinó la citotoxicidad de cada micela de la misma manera que en la prueba de citotoxicidad 1 excepto porque se usó como célula una célula DU145 de cáncer de próstata humano adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) a través de Summit Pharmaceuticals International Corporation, y se usaron como micelas la micela de CPT unida a Tf en el ejemplo 1 y la micela de CPT no unida a Tf en el ejemplo comparativo 2, y el tiempo de cultivo que va a realizarse con la adición del líquido de muestra se cambió a 8 horas.

[Prueba de citotoxicidad 4]

En la prueba de citotoxicidad 4, se examinó la citotoxicidad de cada micela de la misma manera que en la prueba de citotoxicidad 3 excepto porque se usó como célula una célula HepG2 de cáncer de hígado humano adquirida de la ECACC a través de DS Pharma Biomedical Co., Ltd.

[Prueba de citotoxicidad 5]

En la prueba de citotoxicidad 5, se examinó la citotoxicidad de cada micela de la misma manera que en la prueba de citotoxicidad 3 excepto porque se usó como célula una célula MDA-MB-231 de cáncer de mama humano.

La tabla 1 muestra los resultados de las pruebas de citotoxicidad 3 a 5. Los datos sobre la "disolución" en la tabla 1 son los datos sobre el líquido de muestra preparado añadiendo directamente CPT a un líquido de cultivo sin dejar que CPT se encapsule en una micela.

[Tabla 1]

		GI50 (µg/ml)			
Nombre de la célula	Origen	Disolución	Micela no unida a Tf	Micela unida a Tf	Efecto de Tf
DU145	Cáncer de próstata humano	0,01	1,0	0,2	5,0
HepG2	Cáncer de hígado humano	0,04	1,0	0,1	10,0
MDA-MB-231	Cáncer de mama humano	1,0	2,0	0,03	67,0

Efecto de Tf: GI50 de micela no unida a Tf/GI50 de micela unida a Tf

Se midió la concentración de CPT en cada micela tal como sigue.

a) Método para la medición de la concentración de CPT

A 100 µl de una muestra de micelas, se les añadieron 200 µl de HCl 6 N, y se calentó la mezcla en un criotubo (Leda Chemical Co., Ltd.) a 100°C durante 1 hora. Se recuperaron 75 µl del líquido de reacción obtenido, se neutralizaron con la adición de 50 µl de NaOH 6 N y entonces se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm (MILLEX^(R)-GV fabricado por Millipore Corporation). Se diluyó el filtrado 10 veces con un tampón formiato de amonio 25 mM (pH 3,0), y se llenó un vial de muestra de HPLC con el líquido de muestra tratado y se midió para determinar su concentración de CPT mediante análisis de HPLC en las siguientes condiciones de análisis.

b) Condiciones de análisis de HPLC

Sistema: Waters Alliance System

Columna: Tosoh TSK-gel ODS-80TM (4,6ΦX150 mm) (40°C)

Fase móvil: Formiato de amonio 25 mM (pH 3,0)/acetonitrilo=70/30

Velocidad de flujo: 1 ml/min.

Detección: Fluorescencia (ex: 370 nm, em: 420 nm)

Volumen de inyección: 20 µl

[Prueba de citotoxicidad 6]

En la prueba de citotoxicidad 6, se examinó la citotoxicidad de cada micela de la misma manera que en la prueba de citotoxicidad 3 excepto porque se usó como célula una célula MDA-MB-231 de cáncer de mama humano adquirida de la ECACC a través de DS Pharma Biomedical Co., Ltd., se usó como micela la micela vacía unida a Tf en el

ejemplo comparativo 3 y se extendió el tiempo de contacto de un medicamento y una célula hasta 72 horas.

La figura 5 es un gráfico que ilustra una tasa de crecimiento celular de una célula MDA-MB-231 frente a una concentración de Tf. El eje horizontal en el gráfico representa un valor de la cantidad de una micela en una disolución de muestra expresada en una concentración de Tf. Los cuadrados negros son los datos en el caso de añadir la micela vacía unida a Tf, los triángulos negros son los datos en el caso de añadir la micela de DTX unida a Tf y los círculos blancos son los datos en el caso de añadir la disolución de Tf. La barra de error en cada uno de los datos es la desviación estándar (DE). Tal como se muestra en el gráfico de la figura 5, la micela de docetaxel unida a Tf presentaba una citotoxicidad excelente sobre la célula MDA-MB-231, mientras que la disolución de Tf y la micela vacía unida a Tf no tenían citotoxicidad.

[Prueba de evaluación del efecto medicinal]

Se cultivó una célula MDA-MB-231 de cáncer de mama humano usando un medio formado por RPMI1640 y FBS al 10% bajo una atmósfera de 37°C y un 5% de CO₂ hasta que el número de células en crecimiento alcanzó el número de células requerido para el trasplante. Después de eso, se suspendió la célula en 100 µl de solución salina fisiológica, y se inoculó en el tejido subcutáneo dorsal de un ratón desnudo hembra [Balb nu/nu, 5 semanas de edad, fabricado por Charles River Laboratories Japan Inc.]. El número de células inoculadas por ratón es de 3×10^6 . Después de eso, se alimentó el ratón desnudo durante 21 días, y se inició la administración de una micela que encapsulaba un fármaco en el momento en el que el volumen tumoral era de $70,8 \pm 3,7 \text{ mm}^3$ (promedio $\pm$ DE).

El programa de administración incluía administración intravenosa mediante la vena de la cola en un total de 3 veces cada 4 días, y para los 3 grupos indicados anteriormente, se midieron el volumen tumoral y el peso corporal del ratón 3 veces a la semana. El número de ratones era de 8 para cada grupo.

(1) Control (sin tratamiento)

(2) Micela de DTX no unida a Tf en el ejemplo comparativo 1 (dosis de DTX por administración: 10 mg por kg de peso corporal del ratón)

(3) Micela de DTX unida a Tf en el ejemplo 2 (dosis de DTX por administración: 10 mg por kg de peso corporal del ratón)

La figura 3 es un gráfico que ilustra un cambio dependiente del tiempo en el volumen tumoral. En el gráfico, el eje longitudinal representa valores relativos para el volumen tumoral al inicio de la prueba, y el eje horizontal representa el tiempo transcurrido (días) desde el inicio de la prueba. En el gráfico, las flechas representan cada una el momento en el que se ha administrado una micela que encapsula un fármaco. Los círculos negros son datos para un grupo control, los triángulos negros son datos para un grupo de micela de DTX no unida a Tf, y los cuadrados negros son datos para un grupo de micela de DTX unida a Tf. La figura 4 es un gráfico que ilustra un cambio en el peso corporal del ratón. En el gráfico de la figura 4, el eje longitudinal representa valores relativos para el peso corporal del ratón al inicio de la prueba. En el gráfico de la figura 4, el eje horizontal, las flechas, los círculos negros, los triángulos negros y los cuadrados negros tienen los mismos significados que los del gráfico de la figura 3. La barra de error en cada dato es el error estándar (EE).

Tal como se muestra en los gráficos en las figuras 3 y 4, la administración de la micela de DTX unida a Tf permitió que el crecimiento de la célula MDA-MB-231 de cáncer de mama humano se suprimiese notablemente sin provocar ninguna diferencia en el cambio en peso corporal del ratón, en comparación con la administración del control y la micela de DTX no unida a Tf. Cuando se administró la micela de DTX unida a Tf, el valor de T/C (razón de volumen tumoral del grupo tratado con fármaco (T) y el grupo control (C)) pudo reducirse hasta 0,33 en el día 29 tras la administración, lo que no se mostró en el gráfico de la figura 3.

REIVINDICACIONES

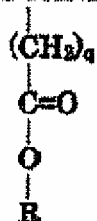
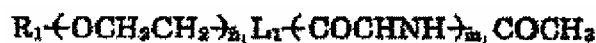
1. Micela polimérica de direccionamiento activo que encapsula un fármaco, que comprende una unidad polimérica de estructura principal α que tiene un segmento polimérico hidrófilo, un segmento polimérico hidrófobo y un sitio de unión a diana unido al segmento polimérico hidrófilo y está libre de un fármaco, y una unidad polimérica de estructura principal β que tiene un segmento polimérico hidrófilo, un segmento polimérico hidrófobo y un fármaco unido al segmento polimérico hidrófobo y está libre del sitio de unión a diana, estando dispuestas la unidad polimérica de estructura principal α y la unidad polimérica de estructura principal β en una disposición radial en un estado en el que el sitio de unión a diana se dirige hacia fuera y el fármaco se dirige hacia dentro, en la que:

i) cuando la micela se une a una diana mientras se mantiene la disposición radial, la micela se capta en una célula suministrando la diana a través de endocitosis, y el fármaco se libera en la célula por colapso de la disposición radial en la célula, y

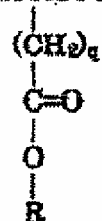
ii) cuando la disposición radial colapsa en la sangre antes de que la micela se una a una diana, la unidad polimérica de estructura principal β se excreta a través del metabolismo, para impedir de ese modo que una célula normal resulte dañada por el fármaco;

en la que los segmentos poliméricos hidrófilos de las unidades poliméricas de estructura principal α y β son respectivamente una cadena de polietilenglicol, y los segmentos poliméricos hidrófobos de las unidades poliméricas de estructura principal α y β son respectivamente una cadena de poliaminoácido.

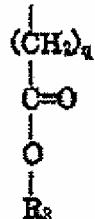
2. Micela polimérica según la reivindicación 1, en la que la unidad polimérica de estructura principal α se representa mediante la siguiente fórmula general I-a o I-b, y la unidad polimérica de estructura principal β se representa mediante la siguiente fórmula general II-a o II-b:



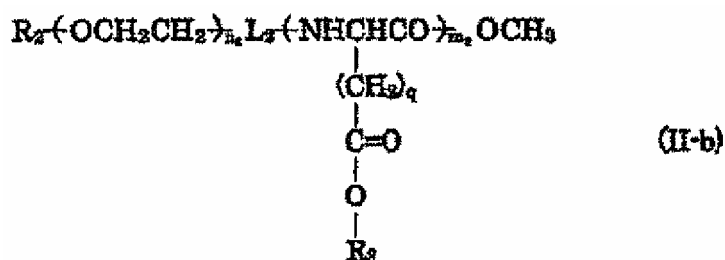
(I-a)



(I-b)



(II-a)



en las que: R_1 representa el residuo del compuesto que tiene un sitio de unión a diana; R_2 representa un grupo alquilo C_1 a C_{12} que puede tener un grupo hidroxilo en un extremo terminal; L_1 representa $O(CH_2)_pNH$; L_2 representa $O(CH_2)_pCO-$; p representa un número entero que oscila entre 1 y 5; R representa un átomo de hidrógeno o un grupo orgánico hidrófobo; q representa 1 ó 2; n_1 y n_2 representan cada uno independientemente un número entero que oscila entre 40 y 450; m_1 y m_2 representan cada uno independientemente un número entero que oscila entre 20 y 80; al menos del 10% al 70% de un número total m_2 de R_3 representa un residuo del fármaco que puede tener un grupo de ligador; y si está presente, el resto del grupo es un átomo de hidrógeno o un grupo orgánico hidrófobo.

3. Composición farmacéutica, que comprende la micela polimérica según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1

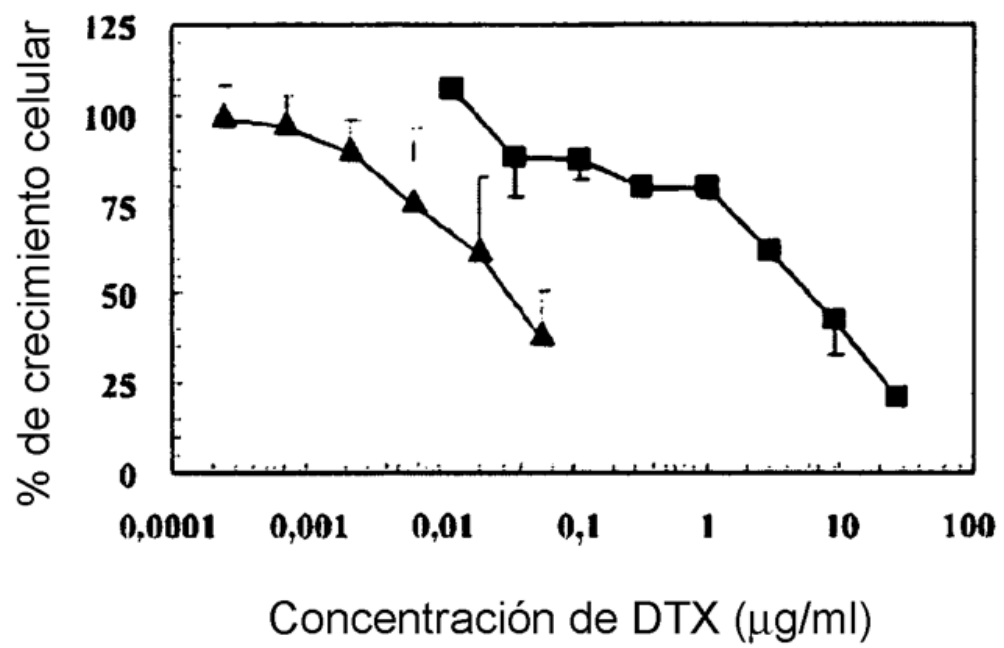


FIG. 2

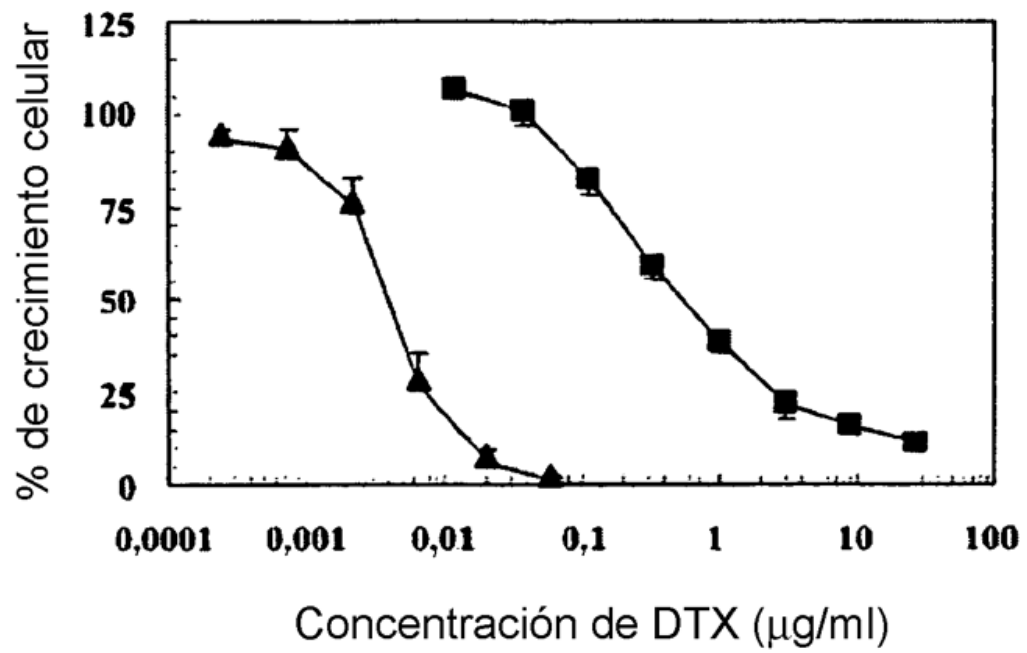


FIG. 3

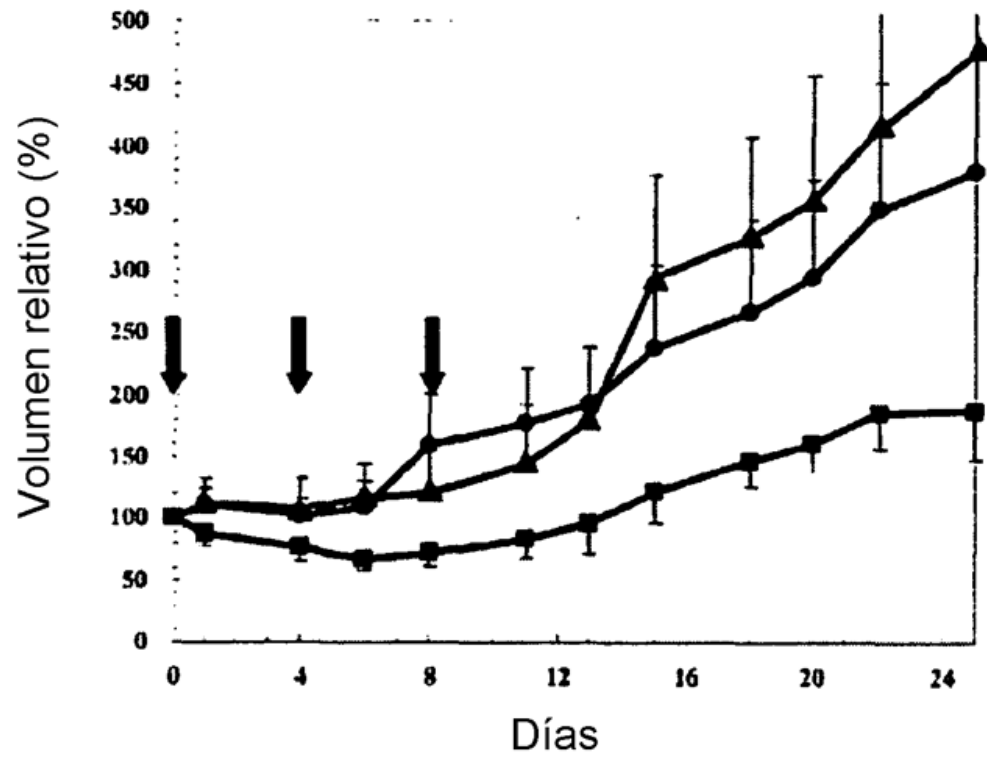


FIG. 4

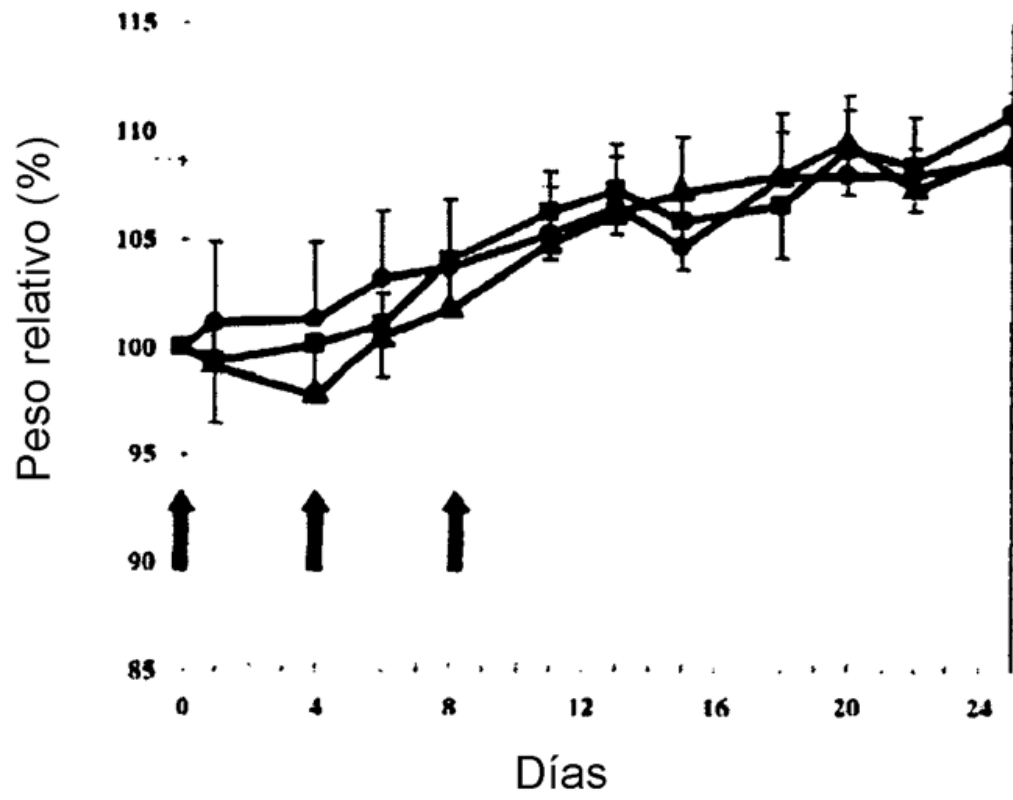


FIG. 5

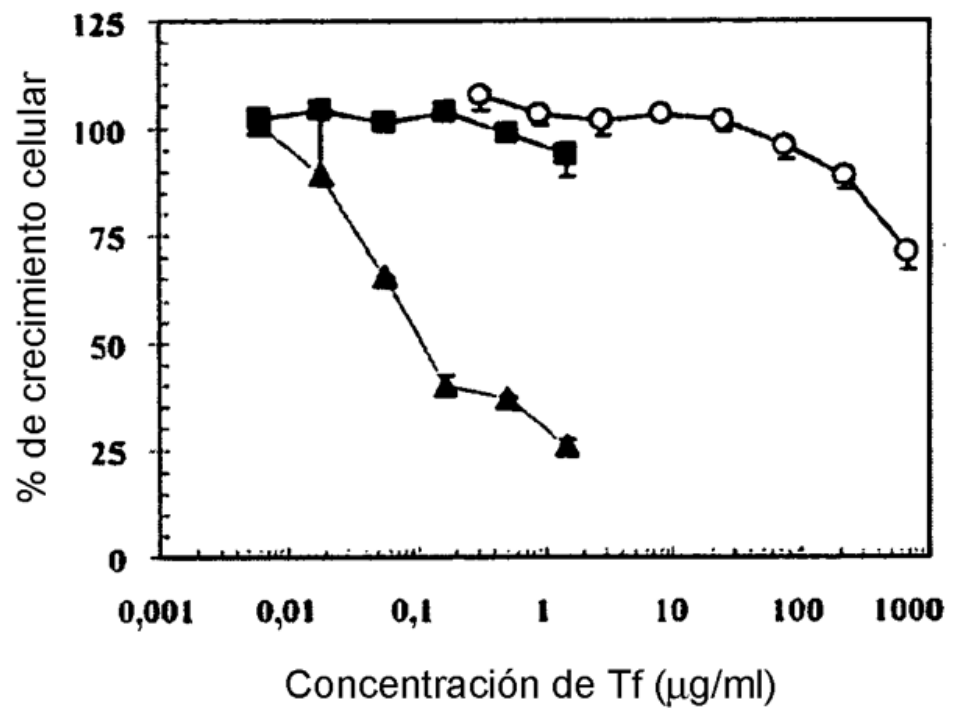


FIG. 6A

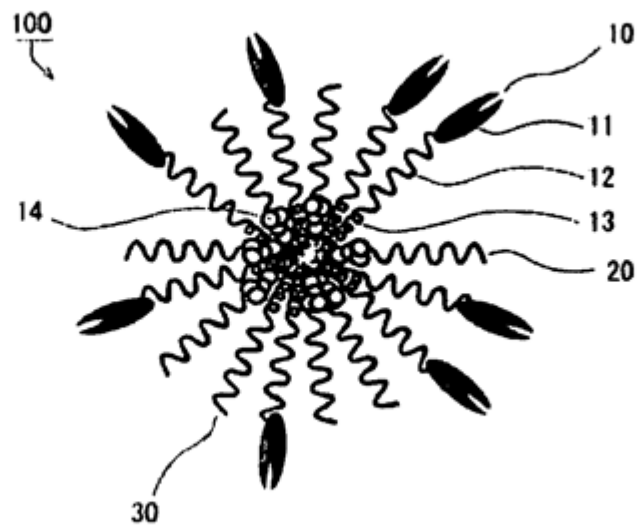


FIG. 6B

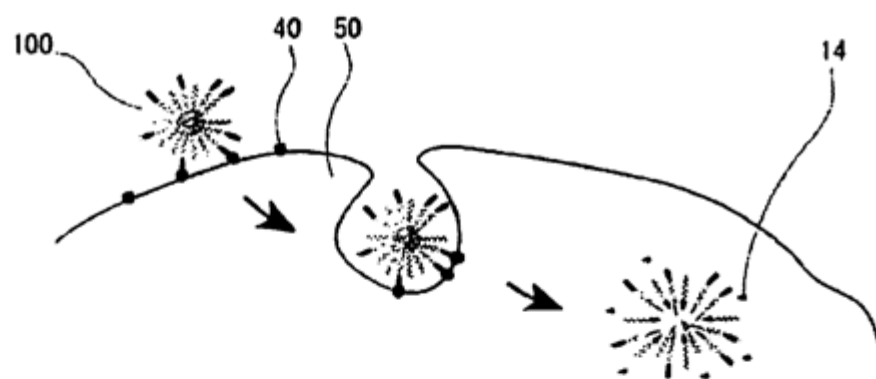


FIG. 6C

