

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 616**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 47/34** (2006.01)

**A61K 47/42** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2011 E 11739905 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2433618**

54 Título: **Composición de micelas poliméricas de fácil disgregación**

30 Prioridad:

**05.02.2010 JP 2010024323**

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

**11.02.2015**

73 Titular/es:

**NANOCARRIER CO., LTD. (100.0%)  
144-15 Chuo, 226-39 Wakashiba, Kashiwa  
Chiba 277-0871, JP**

72 Inventor/es:

**KATO, YASUKI;  
HARADA, MITSUNORI y  
OHUCHI, MIHO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 528 616 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Composición de micelas poliméricas de fácil disgregación

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que usa una composición de micelas de polímero.

**Antecedentes de la técnica**

10 Se conoce el uso de copolímeros de bloque que tienen cada uno un segmento de cadena de polímero hidrófilo y un segmento de cadena de polímero hidrófobo como portador para fármacos, y un método que encapsula un fármaco predeterminado en una micela de polímero formada por los copolímeros (por ejemplo, el documento de patente 1 ó 2). También se conoce una composición que incluye una micela de polímero homogénea que encapsula un fármaco escasamente soluble en agua y un método de preparación para la misma (el documento de patente 3).

15 El documento de patente 1 ó 2 describe un método de encapsulación de un fármaco en una micela formada de manera preliminar a partir de copolímeros de bloque en un medio acuoso añadiendo el fármaco a la disolución de micelas, y opcionalmente, mezclando y agitando lo resultante con calentamiento y ultrasonificación. Además, el documento de patente 3 describe un método para preparar una micela de polímero que encapsula un fármaco disolviendo copolímeros de bloque y fármacos en un disolvente polar miscible en agua y luego sometiendo lo resultante a diálisis frente a agua.

20 El documento de patente 4 da a conocer micelas que comprenden copolímeros de bloque en las que se modificaron poliaminoácidos con grupos bencilo, octilo, dodecilo o hexadecilo.

25 Según esos documentos de la técnica anterior, se entiende que el uso de la micela de polímero como portador para fármacos tiene diversas ventajas incluyendo una liberación sostenida del fármaco. Sin embargo, en una micela de polímero convencional, un fármaco se encapsula en la micela de manera muy estable, lo que puede inhibir que el fármaco se libere de manera adecuada.

**Documentos de la técnica anterior**

35 Documentos de patente

[Documento de patente 1] Documento JP 06-107565 A

[Documento de patente 2] Documento US 5449513 A

40 [Documento de patente 3] Documento JP 11-335267 A

[Documento de patente 4] Documento US 2009291130 A

**Sumario de la invención**

45 Problemas que han de resolverse mediante la invención

50 Un objeto principal de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que use una composición de micelas de polímero que pueda encapsular de manera estable y liberar de manera adecuada un fármaco.

Medios para resolver los problemas

55 La presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende:

una composición de micelas de polímero y un fármaco encapsulado en la composición de micelas de polímero, siendo el fármaco de una clase seleccionada del grupo que consiste en proteínas y polipéptidos fisiológicamente activos solubles en agua que tienen cada uno un peso molecular de 1.500 o más,

60 caracterizada porque:

la composición de micelas de polímero, comprende copolímeros de bloque que tienen cada uno un segmento de cadena de polímero hidrófobo y un segmento de cadena de polímero hidrófilo, disponiéndose una pluralidad de los copolímeros de bloque de manera radial en un estado en el que el segmento de cadena de polímero hidrófobo está dirigido hacia dentro y el segmento de cadena de polímero hidrófilo está dirigido hacia fuera;

la composición de micelas de polímero comprende, como los copolímeros de bloque, un copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL y un copolímero de bloque que tiene afinidad por una lipoproteína excluyendo HDL;

5 el copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL tiene un segmento de cadena de polímero hidrófobo formado por un poliaminoácido que incluye unidades de repetición derivadas de un derivado hidrófobo de un aminoácido, incluyendo el derivado hidrófobo de un aminoácido, un derivado obtenido introduciendo un residuo de esteroles en una cadena lateral del aminoácido;

10 el copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL tiene un segmento de cadena de polímero hidrófilo de poli(etilenglicol);

15 el copolímero de bloque que tiene afinidad por una lipoproteína excluyendo HDL tiene un segmento de cadena de polímero hidrófobo formado por un poliaminoácido que incluye unidades de repetición derivadas de un derivado hidrófobo de un aminoácido, incluyendo el derivado hidrófobo de un aminoácido, un derivado obtenido introduciendo un grupo hidrófobo que tiene una estructura lineal o ramificada en una cadena lateral del aminoácido, en el que el grupo hidrófobo se selecciona de un grupo alquilo  $C_4$  a  $C_{18}$ , lineal o ramificado, no sustituido o sustituido, un grupo alqueno  $C_4$  a  $C_{18}$ , lineal o ramificado, no sustituido o sustituido y un grupo alquilo  $C_4$  a  $C_{18}$ , lineal o ramificado, no sustituido o sustituido; y

20 se induce el desprendimiento del copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL mediante la adhesión de HDL atribuida a la afinidad, un hueco formado a través del desprendimiento provoca el fomento de la liberación de una clase seleccionada del grupo que consiste en proteínas y polipéptidos fisiológicamente activos solubles en agua que tienen cada uno un peso molecular de 1.500 o más como fármaco que va a encapsularse.

25 Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, puede proporcionarse una composición farmacéutica que usa la composición de micelas de polímero que puede encapsular de manera estable y liberar de manera adecuada un fármaco.

30 **Breve descripción de los dibujos**

[Figuras 1] Las figuras 1 son diagramas conceptuales que ilustran las interacciones entre una composición de micelas de polímero y lipoproteínas.

35 [Figura 2] La figura 2 es un gráfico que ilustra las razones de contenido de polímeros en las fracciones de lipoproteínas respectivas.

[Figura 3] La figura 3 es un gráfico que ilustra los transcurros temporales de la concentración de G-CSF en plasma en el ejemplo 1.

40 [Figura 4] La figura 4 es un gráfico que ilustra los transcurros temporales de la concentración de G-CSF en plasma en el ejemplo 4.

**Descripción de las realizaciones**

45 A. Composición de micelas de polímero

Una composición de micelas de polímero usada en la composición farmacéutica de la presente invención incluye copolímeros de bloque que tienen cada uno un segmento de cadena de polímero hidrófobo y un segmento de cadena de polímero hidrófilo. Una pluralidad de los copolímeros de bloque se disponen de manera radial en un estado en el que el segmento de cadena de polímero hidrófobo está dirigido hacia dentro y el segmento de cadena de polímero hidrófilo está dirigido hacia fuera. La composición de micelas de polímero incluye un copolímero de bloque que tiene afinidad por la lipoproteína de alta densidad (HDL) (a continuación en el presente documento, denominado algunas veces "copolímero de bloque con afinidad por HDL") como uno de los copolímeros de bloque. Según la composición de micelas de polímero, se induce el desprendimiento del copolímero de bloque con afinidad por HDL mediante la adhesión de HDL atribuida a la afinidad, y un hueco formado a través del desprendimiento provoca el fomento de la liberación de un fármaco que va a encapsularse. La propiedad de adhesión de la micela polimérica a HDL puede confirmarse observando la presencia de copolímeros de bloque en una fracción de HDL en el caso de incubar la composición de micelas de polímero en presencia de HDL (por ejemplo, en plasma) y luego purificar la fracción de HDL. El "segmento de cadena de polímero hidrófobo" y el "segmento de cadena de polímero hidrófilo" pueden tener cualquier grado de hidrofobicidad y grado de hidrofiliidad adecuados, respectivamente, siempre que pueda formarse en un medio acuoso una micela en la que una pluralidad de copolímeros de bloque que tienen cada uno esos dos segmentos están dispuestos en el estado mencionado anteriormente.

65 Un posible motivo por el que se fomenta la liberación de un fármaco desde la composición de micelas de polímero es tal como se describe a continuación. Tal como se ilustra en la figura 1(A), en sangre, HDL 20, que tiene un

diámetro de partícula promedio de tan sólo aproximadamente 10 nm, puede entrar fácilmente en el interior (región de segmento de cadena de polímero hidrófobo) de una micela de polímero que incluye copolímeros 10 de bloque con afinidad por HDL que tienen cada uno un segmento 11 de cadena de polímero hidrófilo y un segmento 12 de cadena de polímero hidrófobo. Cada uno de los copolímeros 10 de bloque con afinidad por HDL interacciona con HDL 20, que ha entrado en la región de segmento de cadena de polímero hidrófobo, basándose en la afinidad por HDL, y se desprende de manera preferente de la micela de polímero a través de la adhesión de HDL 20. Como resultado, se forman huecos en una estructura de micela de polímero, lo que facilita la liberación del fármaco 50 encapsulado. Además, se produce fácilmente la disgregación de la micela de polímero, lo que fomenta la liberación del fármaco 50. Mientras tanto, tal como se ilustra en la figura 1(B), es difícil que la lipoproteína 30 de baja densidad (LDL), que tiene un diámetro de partícula promedio relativamente de hasta aproximadamente 26 nm, y la lipoproteína 40 de muy baja densidad (VLDL), que tiene un diámetro de partícula igual a o mayor que el diámetro de la LDL, entren en el interior de la micela de polímero. Por tanto, cuando también se tiene en cuenta el hecho de que los copolímeros 10 de bloque con afinidad por HDL tienen intrínsecamente interacciones débiles con las lipoproteínas excluyendo HDL, apenas debe producirse el desprendimiento de los copolímeros de bloque de la micela de polímero que va a inducirse mediante la adhesión de una lipoproteína excluyendo HDL.

El fármaco que va a encapsularse en la composición de micelas de polímero es de una clase seleccionada del grupo que consiste en proteínas y polipéptidos fisiológicamente activos solubles en agua que tienen cada uno un peso molecular de 1.500 o más. El fármaco tiene un tamaño relativamente grande y por tanto apenas se escapa de los huecos pequeños entre copolímeros de bloque en una micela de polímero de tipo convencional. Por tanto, el fármaco no se libera lo suficiente y se elimina de la circulación sanguínea junto con la micela en algunos casos. Por otro lado, la composición de micelas de polímero según la presente invención ejerce un acción de liberación sostenida de un fármaco a través de la formación de micelas, a la vez que también es excelente para su uso en el fomento de la liberación de tal fármaco que tiene un tamaño relativamente grande en comparación con la micela de polímero de tipo convencional. Además, tal como se describe más adelante, en la composición de micelas de polímero usada en la composición farmacéutica según la presente invención, también se incorpora un copolímero de bloque que tiene afinidad por una lipoproteína excluyendo HDL tal como LDL o VLDL (a continuación en el presente documento, denominado algunas veces "copolímero de bloque sin afinidad por HDL") para controlar el grado de liberación de un fármaco.

El segmento de cadena de polímero hidrófobo en el copolímero de bloque con afinidad por HDL puede estar formado por un poliaminoácido. El poliaminoácido incluye unidades de repetición derivadas de un derivado hidrófobo de un aminoácido obtenido introduciendo un grupo hidrófobo que tiene una estructura cíclica en una cadena lateral del aminoácido. El derivado hidrófobo de un aminoácido que tiene una estructura cíclica es preferiblemente un derivado hidrófobo de un aminoácido ácido tal como ácido aspártico y ácido glutámico, y un grupo hidrófobo que tiene una estructura cíclica puede introducirse en un grupo carboxilo en una cadena lateral del aminoácido ácido.

El grupo hidrófobo que tiene una estructura cíclica puede ser un grupo que tiene una estructura monocíclica o un grupo que tiene una estructura policíclica, y por ejemplo, puede ser un grupo aromático, un grupo alicíclico o un residuo de esteroil. El grupo hidrófobo es preferiblemente un grupo alquilo C<sub>4</sub> a C<sub>16</sub> que tiene una estructura cíclica, un grupo arilo C<sub>6</sub> a C<sub>20</sub>, un grupo aralquilo C<sub>7</sub> a C<sub>20</sub> y un residuo de esteroil. Un esteroil significa un compuesto natural, semisintético o sintético basado en un anillo de ciclopentanona-hidrofenantreno (C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>) y derivados del mismo. Por ejemplo, se ejemplifica un esteroil natural mediante colesterol, colestanol, dihidrocolesterol, ácido cólico, campesterol y sitosterol. Los compuestos semisintéticos o sintéticos pueden ser, por ejemplo, precursores sintéticos del esteroil natural (según sea necesario, abarcando un compuesto en el que una parte o la totalidad de, si están presentes, determinados grupos funcionales, se han protegido los grupos hidroxilo con un grupo protector de hidroxilo conocido en la técnica, o un compuesto en el que se ha protegido un grupo carboxilo con un grupo protector de carboxilo). El derivado de esteroil puede tener un grupo alquilo C<sub>6</sub> a C<sub>12</sub> o un átomo de halógeno tal como cloro, bromo y flúor introducido en un anillo de ciclopentanona-hidrofenantreno siempre que el objeto de la presente invención no se vea afectado adversamente. El anillo de ciclopentanona-hidrofenantreno puede estar saturado o parcialmente insaturado.

El segmento de cadena de polímero hidrófobo en el copolímero de bloque con afinidad por HDL puede tener no sólo unidades de repetición derivadas de un derivado hidrófobo de un aminoácido que tiene una estructura cíclica sino que también otras unidades de repetición siempre que se ejerzan los efectos de la presente invención. Los ejemplos de las otras unidades de repetición incluyen: unidades de repetición derivadas de un aminoácido ácido tal como ácido glutámico y ácido aspártico, y por ejemplo, un derivado hidrófobo obtenido introduciendo un grupo alquilo C<sub>4</sub> a C<sub>16</sub>, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido en el aminoácido ácido.

El contenido de las unidades de repetición derivadas del derivado hidrófobo de un aminoácido que tiene una estructura cíclica es preferiblemente del 10 al 100% molar, más preferiblemente del 20 al 80% molar con respecto al total (100% molar) de las unidades de repetición para formar el segmento de cadena de polímero hidrófobo en el copolímero de bloque con afinidad por HDL. El contenido mencionado anteriormente puede proporcionar la afinidad por HDL de manera más segura.

Los ejemplos del segmento de cadena de polímero hidrófilo en el copolímero de bloque con afinidad por HDL

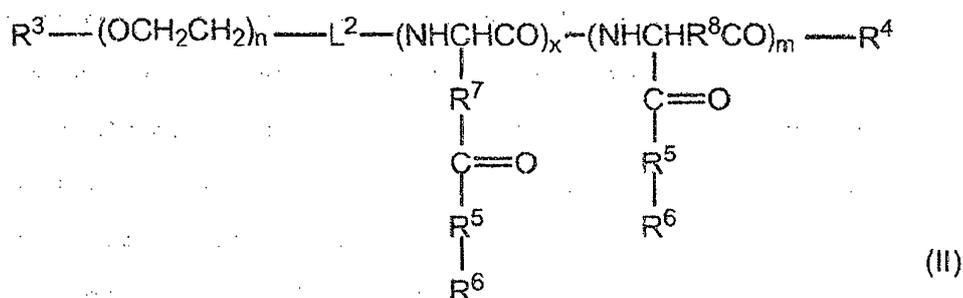
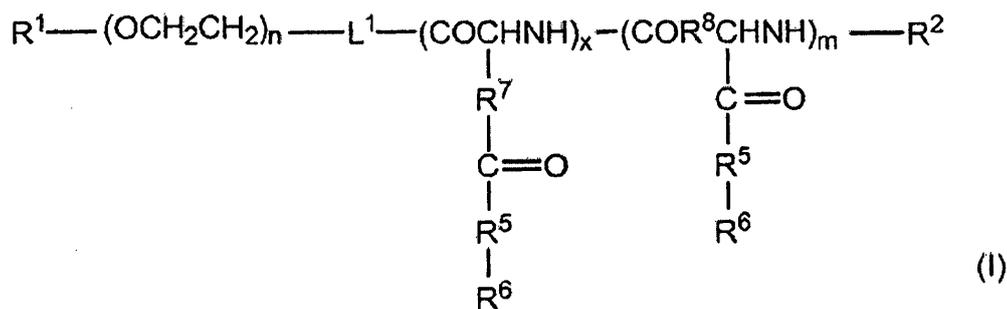
incluyen poli(etilenglicol), polisacárido, poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(amida acrílica), poli(ácido acrílico), poli(amida metacrílica), poli(ácido metacrílico), poli(éster de ácido metacrílico), poli(éster de ácido acrílico), poliaminoácido, poli(ácido málico), y derivados de los mismos. Los ejemplos específicos del polisacárido incluyen almidón, dextrano, fructano y galactano.

En el copolímero de bloque con afinidad por HDL, el segmento de cadena de polímero hidrófilo y el segmento de cadena de polímero hidrófobo están unidos entre sí a través de un grupo de unión conocido. Los ejemplos del grupo de unión incluyen un enlace éster, un enlace amida, un grupo imino, un enlace carbono-carbono y un enlace éter. El extremo opuesto al extremo en el lado del segmento de cadena de polímero hidrófilo en el segmento de cadena de polímero hidrófobo y el extremo opuesto al extremo en el lado del segmento de cadena de polímero hidrófobo en el segmento de cadena de polímero hidrófilo pueden someterse a cualquier modificación química adecuada siempre que la formación de una micela de polímero no se vea afectada adversamente.

El copolímero de bloque con afinidad por HDL tiene un segmento de cadena de polímero hidrófilo de poli(etilenglicol) y un segmento de cadena de polímero hidrófobo formado por un poliaminoácido que incluye unidades de repetición derivadas de un derivado hidrófobo de un aminoácido. El derivado hidrófobo de un aminoácido puede ser un derivado obtenido introduciendo un residuo de esterol en una cadena lateral del aminoácido.

El copolímero de bloque con afinidad por HDL puede representarse mediante cada una de las siguientes fórmulas generales (I) y (II). La composición de micelas de polímero de la presente invención puede incluir dos o más clases de copolímeros de bloque con afinidad por HDL.

[Quím. 1]



En cada una de las fórmulas mencionadas anteriormente, R<sup>1</sup> y R<sup>3</sup> representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior sustituido o no sustituido con un grupo funcional opcionalmente protegido;

R<sup>2</sup> representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático C<sub>1</sub> a C<sub>29</sub>, saturado o insaturado, o un grupo arilcarbonilo;

R<sup>4</sup> representa un grupo hidroxilo, un grupo oxi alifático C<sub>1</sub> a C<sub>30</sub>, saturado o insaturado, o un grupo aril-alquiloxilo inferior;

los R<sup>5</sup> representan cada uno -O- o -NH-;

los R<sup>6</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>4</sub> a C<sub>16</sub> que tiene una estructura cíclica no sustituida o sustituida con un grupo amino o un grupo carboxilo, un grupo arilo C<sub>6</sub> a C<sub>20</sub>, un grupo aralquilo C<sub>7</sub> a C<sub>20</sub> o un grupo esterilo;

R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> representan cada uno independientemente un grupo metileno o un grupo etileno;

n representa un número entero en el intervalo de 10 a 2.500;

x representa un número entero en el intervalo de 10 a 300;

m representa un número entero en el intervalo de 0 a 300 (siempre que, cuando m representa 1 o más, una unidad de repetición con el número de repeticiones de x y una unidad de repetición con el número de repeticiones de m están unidas entre sí en cualquier orden adecuado, los  $R^6$  se seleccionan cada uno independientemente en las unidades de repetición respectivas en un copolímero de bloque y están presentes al azar, y el 10% o más de un total de  $R^6$  se seleccionan cada uno independientemente de un grupo alquilo  $C_4$  a  $C_{16}$  que tiene una estructura cíclica no sustituida o sustituida con un grupo amino o un grupo carboxilo, un grupo arilo  $C_6$  a  $C_{20}$ , un grupo aralquilo  $C_7$  a  $C_{20}$  y un grupo esterilo);

$L^1$  representa un grupo de unión seleccionado del grupo que consiste en -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, -CH<sub>2</sub>-, -O-Z-S-Z- y -OCO-Z-NH- (en los que los las Z representan independientemente un grupo alquileo  $C_1$  a  $C_6$ ); y

$L^2$  representa un grupo de unión seleccionado de -OCO-Z-CO- y -NHCO-Z-CO- (en los que Z representa un grupo alquileo  $C_1$  a  $C_6$ ).

El grupo arilo  $C_6$  a  $C_{20}$  y el grupo aralquilo  $C_7$  a  $C_{20}$  se ejemplifican preferiblemente mediante un grupo fenilo, un grupo naftilo, un grupo tolilo, un grupo xililo, un grupo bencilo y un grupo fenetilo, más preferiblemente un grupo bencilo. Además, un esterol del que se deriva el grupo esterilo se ejemplifica preferiblemente mediante colesterol, colestanol y dihidroxicolesterol, más preferiblemente colesterol.

n en cada una de las fórmulas mencionadas anteriormente representa un número entero en el intervalo preferiblemente de 10 a 1.000, más preferiblemente de 20 a 600, de manera particularmente preferible de 50 a 500. x y m en cada una de las fórmulas mencionadas anteriormente, representan cada uno un número entero en el intervalo preferiblemente de 20 a 200, más preferiblemente de 30 a 100.

Los ejemplos del grupo funcional opcionalmente protegido incluyen un grupo hidroxilo, un acetal, un cetal, un aldehído, un residuo de azúcar, un grupo maleimida, un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo tiol y un éster activo. Puede prepararse el segmento de cadena de polímero hidrófilo en el caso en el que  $R^1$  y  $R^3$  representan cada uno un grupo alquilo inferior sustituido con un grupo funcional opcionalmente protegido, por ejemplo, según los métodos descritos en los documentos WO 96/33233 A1, WO 96/32434 A1 y WO 97/06202 A1. El grupo alquilo inferior significa un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene, por ejemplo, 7 átomos de carbono o menos, preferiblemente 4 o menos.

El copolímero de bloque con afinidad por HDL puede obtenerse, por ejemplo, mediante el acoplamiento de un polímero que tiene una cadena de polímero hidrófilo y un polímero que tiene una cadena de poliaminoácido mediante un método conocido, cada uno de los cuales no se ha sometido a ningún tratamiento ni se ha purificado para conseguir una distribución de peso molecular estrecha según sea necesario. El copolímero de bloque de fórmula general (I) también puede formarse, por ejemplo, llevando a cabo una polimerización viva aniónica usando un iniciador que puede proporcionar  $R^1$  para formar una cadena de polietilenglicol, luego introduciendo un grupo amino en el lado del extremo creciente, y polimerizando un anhídrido N-carboxílico (NCA) de un aminoácido protegido tal como L-aspartato de  $\beta$ -bencilo o L-glutamato de  $\gamma$ -bencilo del extremo amino.

A continuación se describe un ejemplo específico de un método de fabricación del copolímero de bloque con afinidad por HDL. Se añaden (i) anhídrido N-carboxi- $\beta$ -bencil-L-aspartico (BLA-NCA) o (ii) anhídrido N-carboxi- $\gamma$ -bencil-L-glutámico (BLG-NCA) y se someten a una reacción usando, como iniciador, polietilenglicol, que está protegido en un extremo y tiene un grupo amino en el otro extremo, tal como MeO-PEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, en un disolvente orgánico deshidratado para conseguir un grado de polimerización deseado (número de unidades de aminoácido), para producir de ese modo (i) polietilenglicol-co-poli(éster bencilico del ácido aspártico) o (ii) polietilenglicol-co-poli(éster bencilico del ácido glutámico). Además, el copolímero de bloque resultante se acetila en el extremo con cloruro de acetilo o anhídrido acético, luego se somete a hidrólisis alcalina para eliminar un grupo bencilo, y se convierte en polietilenglicol-co-poli(ácido aspártico) o polietilenglicol-co-poli(ácido glutámico). Después de eso, se añade alcohol bencilico en un disolvente orgánico para conseguir una razón de esterificación deseada, y se lleva a cabo una reacción en presencia de un agente de condensación tal como N-N'-diclohexil-carbodiimida (DCC) y N-N'-diisopropil-carbodiimida (DIPCI) para producir un copolímero de bloque que tiene parcialmente un éster bencilico.

Cuando se realiza una reacción usando colesterol en lugar de alcohol bencilico, pueden prepararse polietilenglicol-co-poli(éster de colesterol de ácido aspártico) y polietilenglicol-co-poli(éster de colesterol de ácido glutámico).

Otro ejemplo específico del método de fabricación del copolímero de bloque con afinidad por HDL es un método que implica introducir una cadena lateral hidrófoba a través de un enlace amida. En el método de fabricación, se acetila polietilenglicol-co-poli(éster bencilico del ácido aspártico) o polietilenglicol-co-poli(éster bencilico del ácido glutámico)

en el extremo de la misma manera descrita anteriormente. Luego, se elimina un grupo bencilo mediante hidrólisis alcalina y el grupo carboxilo generado se somete a una reacción con una cadena lateral hidrófoba que tiene un grupo amino. Alternativamente, se someten a una reacción polietilenglicol-co-poli(éster bencilico del ácido aspártico) o polietilenglicol-co-poli(éster bencilico del ácido glutámico) y un compuesto que tiene una amina primaria y luego se someten a aminólisis para convertir un enlace éster en un enlace amida. Esto permite la introducción de una cadena lateral hidrófoba a través de un enlace amida. Además, también puede obtenerse un segmento de poli(derivado de aminoácido) que incluye una cadena lateral hidrófoba que tiene un grupo hidrófobo cuyo extremo se ha sustituido con un grupo amino y una cadena lateral hidrófoba sin sustitución de grupo amino, añadiendo una amina primaria tal como 1-octilamina al polietilenglicol-co-poli(éster bencilico del ácido aspártico) en un disolvente orgánico para conseguir una razón de amidación deseada, sometiendo la mezcla a una reacción durante un periodo de tiempo predeterminado, y luego añadiendo una gran cantidad en exceso de 1,8-diaminooctano o similar a un éster bencilico sin convertir.

El copolímero de bloque con afinidad por HDL tiene una tasa de transferencia de HDL, que se determina tal como se describe a continuación, del 30% o más debido a su afinidad por HDL. El copolímero de bloque con afinidad por HDL tiene una tasa de transferencia de HDL preferiblemente del 40% o más, más preferiblemente del 45% o más, de manera particularmente preferible del 50% o más.

[Método de determinación de la tasa de transferencia de HDL]

Se usan copolímeros de bloque como micelas de polímero que encapsulan lisozima, y las micelas de polímero se incuban en plasma a 37°C durante 24 horas. Después de eso, se purifican y se recogen las fracciones de lipoproteínas respectivas. Se mide la concentración de los copolímeros de bloque en cada una de las fracciones de VLDL, LDL, HDL y residuales recogidas. Luego, se calcula el contenido (basado en el peso) de los copolímeros de bloque en cada una de las fracciones basándose en el volumen y concentración de copolímeros de bloque en cada una de las fracciones. El valor resultante se sustituye en la siguiente ecuación para determinar una tasa de transferencia de HDL.

$$\text{Tasa de transferencia de HDL (\%)} = \frac{\text{Contenido de copolímeros de bloque en la fracción de HDL}}{\text{total de contenido de copolímeros de bloque en las fracciones respectivas}} \times 100$$

En la determinación de la tasa de transferencia de HDL, el copolímero de bloque con afinidad por HDL está presente preferiblemente en una fracción de HDL en la mayor cantidad entre otras fracciones de lipoproteínas (excluyendo una fracción de quilomicrones). Es decir, se prefiere que el contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL en la fracción de HDL sea la mayor entre los contenidos del copolímero de bloque con afinidad por HDL en las fracciones respectivas, es decir, fracciones de VLDL, LDL, HDL y residuales.

La composición de micelas de polímero puede incluir además un copolímero de bloque sin afinidad por HDL como uno de los copolímeros de bloque que tienen cada uno un segmento de cadena de polímero hidrófobo y un segmento de cadena de polímero hidrófilo. Es difícil desprender el copolímero de bloque sin afinidad por HDL de manera preferente de la micela de polímero. Esto es debido a que es difícil una entrada al interior de la micela de polímero para las lipoproteínas excepto HDL. Por tanto, cuando la composición de micelas de polímero se prepara como un tipo mixto de un copolímero de bloque con afinidad por HDL y un copolímero de bloque sin afinidad por HDL, puede suprimirse la formación de huecos debido al desprendimiento de los copolímeros de bloque con afinidad por HDL, y en algunos casos, por el contrario, puede fomentarse la formación de huecos debido a una reducción en la interacción hidrófoba entre los copolímeros de bloque para formar la composición de micelas de polímero. Tal como se describió anteriormente, la velocidad de liberación de un fármaco desde la composición de micelas de polímero puede controlarse ajustando el contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL y el del copolímero de bloque sin afinidad por HDL. Es decir, según la presente invención, puede proporcionarse una micela de polímero que tiene una propiedad disruptiva, lo que ha sido difícil de conferir de manera convencional, y además, también puede facilitarse el control de la velocidad de disgregación de la micela de polímero.

El segmento de cadena de polímero hidrófobo en el copolímero de bloque sin afinidad por HDL puede estar formado por un poliaminoácido que incluye unidades de repetición derivadas de un derivado hidrófobo de un aminoácido obtenido introduciendo un grupo hidrófobo que tiene una estructura lineal o ramificada en una cadena lateral del aminoácido. El derivado hidrófobo de un aminoácido es un derivado hidrófobo preferiblemente de un aminoácido ácido, más preferiblemente de ácido aspártico y/o ácido glutámico.

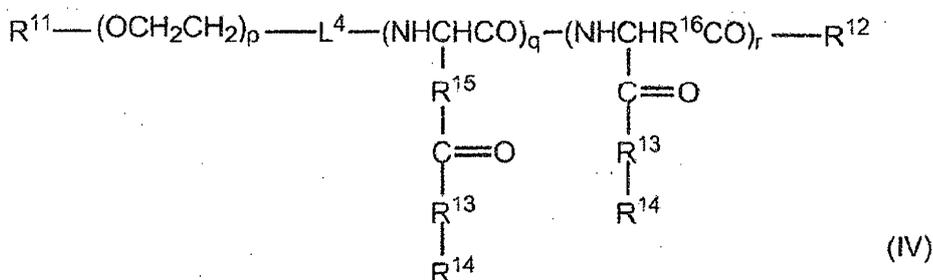
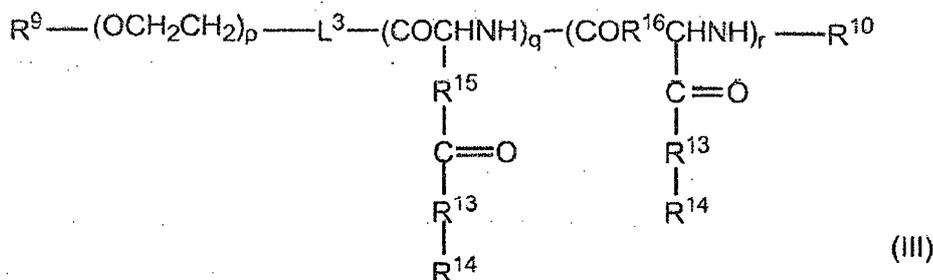
El grupo hidrófobo que tiene una estructura lineal o ramificada se ejemplifica mediante un grupo alquilo C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub>, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido, un grupo alqueno C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub>, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido y un grupo alquínico C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub>, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido, preferiblemente un grupo alquilo C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub>, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido.

En cuanto al segmento de cadena de polímero hidrófilo en el copolímero de bloque sin afinidad por HDL, puede seleccionarse el mismo polímero hidrófilo que en el caso con el segmento de cadena de polímero hidrófilo en el copolímero de bloque con afinidad por HDL. Además, la modificación de extremos de cada uno del segmento de

cadena de polímero hidrófilo y el segmento de cadena de polímero hidrófobo en el copolímero de bloque sin afinidad por HDL y la unión de esos segmentos también son tal como se describen en el párrafo relativo al copolímero de bloque con afinidad por HDL.

- 5 El copolímero de bloque sin afinidad por HDL puede representarse mediante cada una de las siguientes fórmulas generales (III) y (IV):

[Quím. 2]



10 En cada una de las fórmulas mencionadas anteriormente,  $R^9$  y  $R^{11}$  representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior sustituido o no sustituido con un grupo funcional opcionalmente protegido;

15  $R^{10}$  representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático  $C_1$  a  $C_{29}$ , saturado o insaturado, o un grupo arilcarbonilo;

20  $R^{12}$  representa un grupo hidroxilo, un grupo oxi alifático  $C_1$  a  $C_{30}$ , saturado o insaturado, o un grupo aril-alquiloilo inferior;

los  $R^{13}$  representan cada uno -O- o -NH-;

25 los  $R^{14}$  representan cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo  $C_4$  a  $C_{18}$ , lineal o ramificado, no sustituido o sustituido con un grupo amino o un grupo carboxilo;

$R^{15}$  y  $R^{16}$  representan cada uno independientemente un grupo metileno o un grupo etileno;

30 p representa un número entero en el intervalo de 10 a 2.500;

q representa un número entero en el intervalo de 10 a 300;

35 r representa un número entero en el intervalo de 0 a 300 (siempre que, cuando r representa 1 o más, una unidad de repetición con el número de repeticiones de q y una unidad de repetición con el número de repeticiones de r están unidas entre sí en cualquier orden adecuado, los  $R^{14}$  se seleccionan cada uno independientemente en las unidades de repetición respectivas en un copolímero de bloque y están presentes al azar, y el 40% o menos de un total de  $R^{14}$  son un átomo de hidrógeno);

40  $L^3$  representa un grupo de unión seleccionado del grupo que consiste en -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, -CH<sub>2</sub>-, -O-Z-S-Z- y -OCO-Z-NH- (en los que las Z representan independientemente un grupo alquileo  $C_1$  a  $C_6$ ); y

$L^4$  representa un grupo de unión seleccionado de -OCO-Z-CO- y -NHCO-Z-CO- (en los que Z representa un grupo alquileo  $C_1$  a  $C_6$ ).

45 p en cada una de las fórmulas mencionadas anteriormente representa un número entero en el intervalo

preferiblemente de 10 a 1.000, más preferiblemente de 20 a 600, de manera particularmente preferible de 50 a 500. q y r en cada una de las fórmulas mencionadas anteriormente representan cada uno un número entero en el intervalo preferiblemente de 20 a 200, más preferiblemente de 30 a 100.

5 El grupo funcional opcionalmente protegido es tal como se describe en el párrafo relativo a cada una de las fórmulas (I) y (II).

La tasa de transferencia de HDL del copolímero de bloque sin afinidad por HDL puede ser de menos del 30%, preferiblemente del 25% o menos, más preferiblemente del 20% o menos.

10 La razón de contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL con respecto al copolímero de bloque sin afinidad por HDL en la composición de micelas de polímero de la presente invención (copolímero de bloque con afinidad por HDL:copolímero de bloque sin afinidad por HDL, razón en peso) puede fijarse dependiendo del uso pretendido de la composición de micelas de polímero, la tasa de transferencia de HDL de cada uno de los copolímeros de bloque, y similares. La razón de contenido (copolímero de bloque con afinidad por HDL:copolímero de bloque sin afinidad por HDL, razón en peso) puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1:99 a 99:1, en el intervalo de 3:97 a 97:3, en el intervalo de 15:85 a 85:15, o en el intervalo de 40:60 a 60:40. Tal como se describió anteriormente, la razón en peso del copolímero de bloque con afinidad por HDL con respecto al peso total del copolímero de bloque con afinidad por HDL y el copolímero de bloque sin afinidad por HDL en la composición de micelas de polímero puede ser, por ejemplo, del 60% o menos, del 50% o menos, del 40% o menos, del 20% o menos, del 10% o menos, del 5% o menos, del 2% o menos o del 1% o menos. Existe una tendencia a que se induzca la disgregación de la micela de polímero para fomentar la liberación de un fármaco cuando la razón de contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL es grande. Al mismo tiempo, existe una tendencia a que se supriman la disgregación de la micela de polímero y la liberación acompañante de un fármaco cuando la razón de contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL es pequeña.

#### B. Composición farmacéutica

30 Una composición farmacéutica de la presente invención incluye la composición de micelas de polímero descrita en la sección A mencionada anteriormente y un fármaco encapsulado en la composición de micelas de polímero. El fármaco es de manera deseable de una clase seleccionada del grupo que consiste en proteínas y polipéptidos fisiológicamente activos solubles en agua. Además, el fármaco tiene un peso molecular de 1.500 o más, preferiblemente de 2.000 o más. Los ejemplos preferidos de las proteínas y los polipéptidos fisiológicamente activos incluyen: interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; eritropoyetina; G-CSF; hormona del crecimiento; interleucinas; factor de necrosis tumoral; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; factor estimulante de colonias de macrófagos; factor del crecimiento de hepatocitos; la superfamilia de TGF- $\beta$ ; EGF; FGF; IGF-I; y factores de coagulación sanguínea tipificados por el factor VII. Además, siempre que las actividades no se vean alteradas, pueden usarse como medicamentos derivados de las proteínas mencionadas anteriormente, más específicamente, proteínas que tienen sustituciones, adiciones o deleciones en uno o más aminoácidos.

40 El fármaco puede ser un fármaco escasamente soluble en agua que tiene una solubilidad en agua de 100  $\mu\text{g/ml}$  o menos. Los ejemplos del fármaco escasamente soluble en agua incluyen: agentes anticancerígenos tales como paclitaxel, topotecán, camptotecina, cisplatino, clorhidrato de daunorubicina, metotrexato, mitomicina C, docetaxel, sulfato de vincristina, y derivados de los mismos; antibióticos poliénicos tales como anfotericina B y nistatina; y fármacos lipófilos tales como prostaglandinas y derivados de las mismas. El fármaco escasamente soluble en agua tiene un tamaño relativamente pequeño pero puede ser difícil que se libere desde una composición de micelas de polímero de tipo convencional debido a su alta hidrofobicidad. Por otro lado, la composición farmacéutica de la presente invención también es excelente para su uso en el fomento de la liberación de tal fármaco escasamente soluble en agua en comparación con la composición de micelas de polímero de tipo convencional.

50 La cantidad del fármaco que va a encapsularse puede fijarse dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica, y similares. La cantidad del fármaco que va a usarse es generalmente del 0,01 al 50% en peso, preferiblemente del 0,1 al 10% en peso con respecto al total de los copolímeros de bloque en la composición de micelas de polímero.

55 El diámetro de partícula de la micela de polímero que encapsula un fármaco no está particularmente limitado siempre que sea de un tamaño que pueda administrarse a un organismo vivo. El diámetro de partícula es preferiblemente de 10  $\mu\text{m}$  o menos, más preferiblemente de 5  $\mu\text{m}$  o menos. En particular, cuando la micela de polímero se usa en administración intravenosa, el diámetro de partícula es preferiblemente de 500 nm o menos, más preferiblemente de 300 nm o menos.

65 La composición farmacéutica puede prepararse tal como se describe a continuación, por ejemplo. En primer lugar, los copolímeros de bloque mencionados anteriormente se disuelven en un disolvente orgánico. Según sea necesario, el disolvente orgánico puede eliminarse sometiendo la disolución resultante a un secado al aire, por ejemplo, secado para formar una película bajo una atmósfera de una corriente de gas nitrógeno y secado adicional a presión reducida según sea necesario. A los copolímeros de bloque así tratados se les añadió y se mezclaron con

una disolución que contenía un fármaco que iba a encapsularse. Luego, se forma una micela de polímero a partir de la disolución mezclada resultante mientras se encapsula el fármaco.

5 Los ejemplos del disolvente orgánico incluyen: disolventes orgánicos no miscibles en agua tales como diclorometano, cloroformo, dietil éter, dibutil éter, acetato de etilo y acetato de butilo; disolventes orgánicos miscibles en agua tales como metanol, etanol, alcohol propílico, alcohol isopropílico, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida, acetonitrilo, acetona y tetrahidrofurano; y disolventes mixtos de los mismos.

10 La micela de polímero que encapsula un fármaco puede formarse, por ejemplo, agitando una disolución mezclada de copolímeros de bloque y un fármaco mientras se aplica a la disolución energía mediante irradiación ultrasónica. La irradiación ultrasónica puede realizarse, por ejemplo, usando un biodisruptor (fabricado por NIHONSEIKI KAISHA LTD.).

15 C. Método de control de la velocidad de liberación del fármaco desde la composición farmacéutica

El método implica cambiar la razón de contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL con respecto al total de los copolímeros de bloque en la composición de micelas de polímero en la composición farmacéutica descrita en la sección B mencionada anteriormente. El copolímero de bloque con afinidad por HDL puede ejercer un efecto de fomento de la liberación de un fármaco desde una micela de polímero. Por tanto, puede cambiarse la razón de contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL para controlar la velocidad de liberación de un fármaco desde una micela de polímero.

20 Por ejemplo, la razón de contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL con respecto al total de los copolímeros de bloque en la composición de micelas de polímero (contenido de copolímero de bloque con afinidad por HDL/total de contenidos de copolímeros de bloque, razón en peso) se fija en el intervalo de más de 0/100 a 100/100 o menos, preferiblemente de 1/100 a 100/100. Más específicamente, la razón de contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL con respecto al copolímero de bloque sin afinidad por HDL en la composición de micelas de polímero (copolímero de bloque con afinidad por HDL:copolímero de bloque sin afinidad por HDL, razón en peso) se fija, por ejemplo, en el intervalo de 1:99 a 99:1, en el intervalo de 3:97 a 97:3, en el intervalo de 15:85 a 85:15 o en el intervalo de 40:60 a 60:40. Existe una tendencia a que pueda fomentarse la liberación de un fármaco cuando la razón de contenido del copolímero de bloque con afinidad por HDL es grande, mientras que pueda suprimirse la liberación de un fármaco cuando la razón de contenido es pequeña.

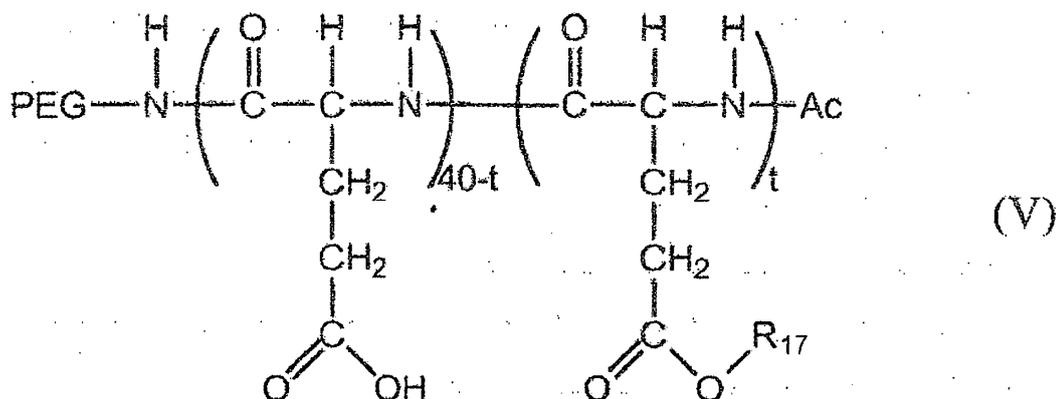
### 35 Ejemplos

En la siguiente descripción, para el fin de una expresión simplificada, por ejemplo, cuando un copolímero de bloque tiene un segmento de cadena de polímero hidrófilo formado por una cadena de PEG que tiene un peso molecular promedio de 10.000 y un segmento de cadena de polímero hidrófobo formado por una cadena de poliaminoácido que tiene 40 residuos de aminoácido en promedio, y tiene una tasa de introducción de un grupo bencilo en una cadena lateral de la cadena de poliaminoácido de aproximadamente el 65%, se usa la expresión "copolímero de bloque (10-40, 65% de Bn)". De manera similar, cuando los grupos hidrófobos que van a introducirse en una cadena lateral de la cadena de poliaminoácido son un grupo octilo y un grupo colesterilo, se usan las expresiones "copolímero de bloque (10-40, 65% de C8)" y "copolímero de bloque (10-40, 65% de Chol)", respectivamente. La tasa de introducción de un grupo hidrófobo de aproximadamente el 65% incluye del 62 al 68%.

45 [Ejemplo de referencia 1] Preparación de una micela de polímero que encapsula lisozima

Se usaron los copolímeros de bloque descritos en la siguiente fórmula general (V) y la tabla 1 como copolímeros de bloque. Se pesó cada uno de los copolímeros de bloque en un vial y se añadió agua purificada a los mismos para conseguir una concentración de polímero de 5 mg/ml. Luego, se agitaron vigorosamente las disoluciones de polímero a 4°C durante la noche. Se sometieron las disoluciones de polímero a irradiación ultrasónica (en un baño de hielo y agua, baja, intervalo de 1 segundo, 10 minutos) usando un biodisruptor (unidad de alta potencia fabricado por NIHONSEIKI KAISHA LTD.) y luego se trataron con un filtro de membrana de 0,22 µm. Por tanto, se obtienen disoluciones de micelas vacías que tienen cada una, una concentración de polímero de 5 mg/ml. A cada una de las disoluciones de micelas vacías (0,6 ml) se les añadió una disolución de lisozima 1 mg/ml (0,15 ml) para conseguir una concentración del 5% (p/p) con respecto al polímero, un tampón fosfato de sodio 200 mM (pH 6) y agua purificada. Se ajustaron las mezclas resultantes con HCl 0,1 N para conseguir finalmente una concentración de polímero de 3 mg/ml, una concentración de lisozima de 0,15 mg/ml y una composición de un tampón fosfato de sodio 20 mM así como un pH de 6. Se invirtieron las disoluciones y se sometieron a agitación por vórtice dos o tres veces y luego se dejaron en reposo a 4°C durante la noche. Se calentaron hasta temperatura ambiente las micelas que encapsulaban cada una lisozima, preparadas tal como se describió anteriormente, y luego se usaron.

[Quím. 3]



5 En la fórmula mencionada anteriormente, una unidad de ácido glutámico y su unidad de derivado hidrófobo están unidas entre sí en cualquier orden adecuado y están presentes al azar en un copolímero de bloque.

[Tabla 1]

Copolímero de bloque	Peso molecular de PEG	R <sub>17</sub>	t
PEG-pGlu (10-40, 60% de Bn)	10.000	Grupo bencilo	24
PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol)	10.000	Grupo colesterilo	12
PEG-pGlu (10-40, 60% de C8)	10.000	Grupo octilo	24
PEG-pGlu (10-40, 60% de C12)	10.000	Grupo dodecilo	24
PEG-pGlu (10-40, 60% de C16)	10.000	Grupo hexadecilo	24

10 [Ejemplo de referencia 2] Tasa de transferencia de HDL

Se usaron las micelas de polímero que encapsulaban cada una lisozima, preparadas en el ejemplo de referencia 1, para determinar una tasa de transferencia de HDL de cada uno de los copolímeros de bloque. A continuación se describe un método experimental específico. A 810  $\mu$ l de plasma de rata almacenado a -80°C tras la centrifugación de la sangre extraída con heparina de cada una de las ratas Wistar macho de 8 semanas se le añadieron 90  $\mu$ l de cada una de las micelas de polímero que encapsulaban cada una lisozima, y se incubó la mezcla a 37°C durante 24 horas (concentración de lisozima final: 15  $\mu$ g/ml, concentración de polímero final: 300  $\mu$ g/ml). Luego se sometió la mezcla a ultracentrifugación en las condiciones de 45.000 rpm (aproximadamente 100.000 g), 15 minutos y 4°C (rotor: MLA-130, tubo de centrifuga: tubo de polialómero de pared gruesa) usando una centrífuga "OptimaMAX" (nombre comercial) (fabricada por Beckman) según el protocolo de Axis-Shield Density Gradient Media descargable de <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/CD2009/macromol/M07.pdf>. Luego, se eliminó una fracción de quilomicrones como la fase superior del plasma tras la ultracentrifugación. Después de eso, se añadieron 180  $\mu$ l de un medio "Optiprep (marca registrada)" (nombre comercial) (fabricado por Axis-Shield) en un 1/4 de volumen del plasma y se mezclaron con respecto a 720  $\mu$ l del plasma, y se sometió la mezcla a ultracentrifugación en las condiciones de 85.000 rpm (aproximadamente 350.000 g), 3 horas y 16°C. Durante la ultracentrifugación, se llevó a cabo un ajuste del equilibrio usando un tampón NaCl al 0,85% (p/v)/ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-etanosulfónico (HEPES) 10 mM (pH 7,4). Tras la ultracentrifugación, se recogieron las fracciones de VLDL, LDL, HDL y residuales (otras) y se midió la concentración de copolímero de bloque en cada una de las fracciones usando un kit de PEG-ELISA (fabricado por Life Diagnostics). Basándose en la concentración de polímero resultante y el volumen de cada una de las fracciones, se calculó el contenido del copolímero de bloque en cada una de las fracciones y su razón (es decir, la tasa de transferencia de copolímero de bloque a cada fracción). La figura 2 muestra los resultados.

Tal como puede observarse a partir de la figura 2, tanto PEG-pGlu (10-40, 60% de Bn) como PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol) tenían una tasa de transferencia de HDL del 50% o más y mostraron alta afinidad por HDL. Por otro lado, todos de PEG-pGlu (10-40, 60% de C8), PEG-pGlu (10-40, 60% de C12) y PEG-pGlu (10-40, 60% de C16) tenían una tasa de transferencia de HDL de menos del 20% y mostraron una mayor afinidad por otras lipoproteínas tales como LDL y VLDL que por HDL.

40 [Ejemplo 1] Prueba de administración intravenosa a ratas de una micela de polímero que encapsula G-CSF

(1) PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol)

Se usó PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol) como copolímero de bloque. Se pesó el copolímero de bloque en un vial. Se

añadió al mismo un tampón ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) monohidratado 20 mM (pH 5) para conseguir una concentración de polímero de 2 mg/ml y se agitó vigorosamente la mezcla a 4°C durante la noche. Se sometió la disolución de polímero a irradiación ultrasónica (en un baño de hielo y agua, baja, intervalo de 1 segundo, 10 minutos) usando un biodisruptor (unidad de alta potencia fabricado por NIHONSEIKI KAISHA LTD.) y luego se trató con un filtro de membrana de 0,22 µm. Por tanto, se obtuvo una disolución de micelas vacías que tenía una concentración de polímero de 2 mg/ml. A la disolución de micelas vacías resultante (6 ml) se le añadió una disolución de G-CSF 300 µg/ml (2 ml) para conseguir una concentración del 5% (p/p) con respecto al polímero y se invirtió la mezcla y se sometió a agitación por vórtice y luego se dejó en reposo a 4°C durante la noche. Después de eso, se purificó la disolución y se concentró mediante ultrafiltración usando un filtro "Amicon Ultra (marca registrada)" (nombre comercial) (fabricado por Millipore Corporation, peso molecular de corte: 100.000), y se reemplazó el medio por una disolución acuosa de sacarosa al 10% (p/p). Se almacenó la micela de polímero recogida que encapsulaba G-CSF a -80°C y descongeló a temperatura ambiente antes de su uso.

Se administró la disolución de la micela de polímero que encapsulaba G-CSF obtenida anteriormente a ratas Wistar macho a través de la vena de la cola. La dosificación fue de 100 µg/kg de peso corporal y el número de animales para la muestra fue de tres. Se extrajo sangre con una jeringa tratada con heparina de la vena yugular con anestesia de éter a los 5 minutos, 1 hora, 6 horas, 1 día, 2 días y 3 días tras la administración. Se midió la concentración de G-CSF en plasma usando un kit de G-CSF-ELISA (fabricado por RayBiotech, Inc.).

#### (2) PEG-pGlu (10-40, 60% de C8)

Se preparó una micela de polímero que encapsulaba G-CSF de la misma manera que en el ejemplo de prueba que usa PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol) excepto porque se usó PEG-pGlu (10-40, 60% de C8) como copolímero de bloque y el número de animales para la muestra fue de nueve. Se examinaron los transcurros temporales de la concentración de G-CSF en plasma.

#### (3) Micela de polímero mixta

Se pesaron cada uno de PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol) y PEG-pGlu (10-40, 60% de C8) en una cantidad igual y se disolvieron ambos polímeros en diclorometano y se homogeneizaron completamente. Después de eso, se eliminó el disolvente usando un concentrador vibratorio para producir una película. Luego se obtuvo una micela vacía según un método convencional. Luego se encapsuló G-CSF en la micela vacía para conseguir una concentración del 5% (p/p) con respecto a los polímeros según un método convencional. Se administró la micela de polímero resultante que encapsulaba G-CSF a ratas para examinar los transcurros temporales de la concentración de G-CSF en plasma.

#### (4) Administración directa de G-CSF

Se examinaron los transcurros temporales de la concentración de G-CSF en plasma de la misma manera que en el ejemplo de prueba que usa PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol) excepto porque se usó una disolución de G-CSF (100 µg/ml) en lugar de la disolución de la micela de polímero que encapsulaba G-CSF y el número de animales para la muestra fue de cinco.

La figura 3 ilustra los resultados del ejemplo 1 (promedio ± DE). La figura 3 también ilustra valores teóricos para los transcurros temporales de la concentración en plasma de una micela de polímero mixta (1:1), que se calculan a partir de los resultados de los transcurros temporales de la concentración en plasma de los ejemplos de prueba que usan PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol) y PEG-pGlu (10-40, 60% de C8).

Tal como se ilustra en la figura 3, cuando se administró directamente G-CSF, se degradó o metabolizó G-CSF muy rápidamente y el tiempo de retención en plasma fue extremadamente corto. Por otro lado, cuando se administró G-CSF encapsulado en micelas de polímero, se prolongó enormemente el tiempo de retención en plasma. Además, la micela de polímero formada por un copolímero de bloque con afinidad por HDL fomentó la liberación de G-CSF en comparación con la micela de polímero formada por un copolímero de bloque sin afinidad por HDL. Además, en la micela de polímero mixta que incluía PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol) y PEG-pGlu (10-40, 60% de C8) a 1:1, los valores observados para la concentración de G-CSF en plasma eran notablemente inferiores a los valores teóricos para los mismos. Esto reveló que una mezcla de una pluralidad de copolímeros de bloque de afinidades por una lipoproteína diferentes entre sí proporcionan una sorprendente acción de fomento de la liberación del fármaco inesperada a partir de su razón mixta de polímero.

#### [Ejemplo 2] (que no es según la invención)

##### (1) Micela de tipo C8

Se usó PEG-pGlu (10-40, 90% de C8) como copolímero de bloque. Se pesó el copolímero de bloque en un vial. Se añadió al mismo un tampón MES 20 mM (pH 5) que incluía sacarosa al 13,3% para conseguir una concentración de

polímero de 10 mg/ml, y se agitó vigorosamente la mezcla a 4°C durante la noche. Se sometió la disolución de polímero a irradiación ultrasónica (en un baño de hielo y agua, alta, intervalo de 1 segundo, 15 minutos 3 veces) usando un biodisruptor (NIHONSEIKI KAISHA LTD., unidad de alta potencia) y luego se trató con un filtro de membrana de 0,22 µm. A la disolución se le añadió el tampón MES 20 mM (pH 5) mencionado anteriormente que incluía sacarosa y se ajustó la concentración de polímero a 2 mg/ml para obtener una disolución de micelas vacías. A la disolución de micelas vacías resultante (1,2 ml) se le añadió una disolución de G-CSF 300 µg/ml (0,4 ml) para conseguir una concentración del 5% (p/p) con respecto al polímero, y se invirtió la mezcla y se sometió a agitación por vórtice, se dejó en reposo a 4°C durante la noche, y luego se almacenó a -80°C. Se descongeló la mezcla almacenada a temperatura ambiente antes de su uso.

(2) Micela de tipo Bn

Se preparó una micela de polímero que encapsulaba G-CSF de la misma manera que en el ejemplo de prueba de la micela de tipo C8 excepto porque se usó PEG-pGlu (10-40, 100% de Bn) como copolímero de bloque.

(3) Micela de tipo mixto

Se pesaron cada uno de PEG-pGlu (10-40, 90% de C8) y PEG-pGlu (10-40, 100% de Bn) en un vial y se disolvieron completamente con acetona para conseguir una concentración de polímero de 10 mg/ml. Se mezclaron las disoluciones entre sí de modo que las razones en peso de PEG-pGlu (10-40, 90% de C8) con respecto a PEG-pGlu (10-40, 100% de Bn) fuesen de 19:1, 4:1 y 1:1. Después de eso, se eliminó el disolvente usando un concentrador vibratorio para producir una película. Luego, se obtuvo una micela vacía según un método convencional. Luego, se encapsuló G-CSF en la micela vacía para conseguir una concentración del 5% (p/p) con respecto a los polímeros según un método convencional.

Se administraron esas disoluciones de las micelas de polímero que encapsulaban cada una G-CSF a ratas Wistar macho (de 6 semanas) a través de la vena de la cola con anestesia de éter ligera. La dosificación fue de 100 µg/kg de peso corporal y el número de animales para la muestra fue de tres para cada disolución. Se extrajo sangre con una jeringa tratada con heparina 24 horas tras la administración, y se añadió EDTA-2Na de modo que la concentración final fuese de 1 mg/ml. En este estado, se midió el número de neutrófilos usando un analizador hematológico automatizado múltiple para uso veterinario (pochH-1000iV Diff fabricado por SYSMEX CORPORATION). Basándose en los valores medidos resultantes, se calcularon los coeficientes de liberación del fármaco (%) de la micela de tipo Bn y diversas micelas de tipo mixto según la siguiente ecuación. La tabla 2 muestra los coeficientes de liberación del fármaco calculados de las micelas de polímero. Es concebible que el coeficiente mayor debe significar que la micela de polímero tiene una acción más fuerte de liberación de manera activa de un fármaco que la micela de tipo C8.

$$\text{Coeficiente de liberación de fármaco (\%)} = 100 \times (A - B) / (A - C)$$

A: Número de neutrófilos en los animales a los que se les administró la micela de tipo C8

B: Número de neutrófilos en los animales a los que se les administró cada una de las diversas micelas de tipo mixto

C: Número de neutrófilos en animales no tratados

[Tabla 2]

	Coeficiente de liberación del fármaco
Micela de tipo Bn	30%
Micela de tipo mixto (C8:Bn = 1:1)	20%
Micela de tipo mixto (C8:Bn = 4:1)	15%
Micela de tipo mixto (C8:Bn = 19:1)	19%

Tal como se describió anteriormente, también en el caso en el que se seleccionó un polímero de tipo bencilo como copolímero de bloque con afinidad por HDL, puede controlarse la velocidad de liberación de un fármaco empleando una micela de tipo mixto.

[Ejemplo 3]

(1) Micela de tipo C8

Se preparó una micela de polímero que encapsulaba G-CSF de la misma manera que en el ejemplo de prueba de la micela de tipo C8 del ejemplo 2.

(2) Micela de tipo Chol

Se preparó una micela de polímero que encapsulaba G-CSF de la misma manera que en el ejemplo de prueba de PEG-pGlu (10-40, 30% de Chol) excepto porque se usó PEG-pGlu (10-40, 25% de Chol) como copolímero de bloque.

5 (3) Micela de tipo mixto

Se encapsuló G-CSF en una micela vacía de la misma manera que en el ejemplo 2 excepto porque: se usó PEG-pGlu (10-40, 25% de Chol) en lugar de PEG-pGlu (10-40, 100% de Bn); se usó diclorometano como disolvente para disolver PEG-pGlu (10-40, 90% de C8); y se mezclaron entre sí PEG-pGlu (10-40, 90% de C8) y PEG-pGlu (10-40, 25% de Chol) a razones en peso de 19:1 y 4:1.

Se midió el número de neutrófilos de la misma manera que en el ejemplo 2 excepto porque el número de animales para la muestra fue de seis. Basándose en los valores medidos resultantes, se calcularon los coeficientes de liberación del fármaco (%) de la micela de tipo Chol y diversas micelas de tipo mixto de la misma manera que en el ejemplo 2. La tabla 3 muestra los coeficientes de liberación de fármaco calculados de las micelas de polímero.

[Tabla 3]

	Coeficiente de liberación del fármaco
Micela de tipo Chol	55%
Micela de tipo mixto (C8:Chol = 4:1)	51%
Micela de tipo mixto (C8:Chol = 19:1)	26%

20 Tal como se describió anteriormente, también en el caso en el que se seleccionó un polímero de tipo colesterol como copolímero de bloque con afinidad por HDL, puede controlarse la velocidad de liberación de un fármaco empleando una micela de tipo mixto.

25 [Ejemplo 4] Prueba de administración intravenosa a ratas de una micela de polímero que encapsula G-CSF

(1) Micela de tipo C8

Se preparó una micela de polímero que encapsulaba G-CSF de la misma manera que en el ejemplo de prueba de la micela de tipo C8 del ejemplo 2.

(2) Micela de tipo Chol

Se preparó una micela de polímero que encapsulaba G-CSF de la misma manera que en el ejemplo de prueba de la micela de tipo Chol del ejemplo 3.

(3) Micela de polímero mixta

Se prepararon micelas de polímero que encapsulaban cada una G-CSF mezclando PEG-pGlu (10-40, 90% de C8) y PEG-pGlu (10-40, 25% de Chol) a razones en peso de 19:1, 4:1 y 1:1 de la misma manera que en el ejemplo de prueba de la micela de polímero mixta del ejemplo 3.

Se administraron las disoluciones de las micelas de polímero que encapsulaban cada una G-CSF obtenidas anteriormente a ratas Wistar macho a través de la vena de la cola. La dosificación era de 100 µg/kg de peso corporal y el número de animales para la muestra fue de tres para cada disolución. Se extrajo sangre con una jeringa tratada con heparina de la vena yugular con anestesia de éter a los 5 minutos, 1 hora, 6 horas, 1 día, 2 días y 3 días tras la administración, y se midió la concentración de G-CSF en plasma usando un kit de G-CSF-ELISA (fabricado por RayBiotech, Inc.).

La figura 4 ilustra los resultados del ejemplo 4. Tal como puede observarse a partir de la figura 4, también en este ejemplo, puede controlarse el tiempo de retención de un fármaco en plasma, en otras palabras, puede controlarse la velocidad de liberación de un fármaco empleando una micela de tipo mixto. Debe observarse que, también en este ejemplo, los valores observados para la concentración de G-CSF en plasma eran notablemente inferiores a los valores teóricos para los mismos en cualquiera de las micelas de tipo mixto.

55

## REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica, que comprende:
  - 5 una composición de micelas de polímero y un fármaco encapsulado en la composición de micelas de polímero, siendo el fármaco de una clase seleccionada del grupo que consiste en proteínas y polipéptidos fisiológicamente activos solubles en agua que tienen cada uno un peso molecular de 1.500 o más, caracterizada porque:
    - 10 la composición de micelas de polímero, comprende copolímeros de bloque que tienen cada uno un segmento de cadena de polímero hidrófobo y un segmento de cadena de polímero hidrófilo, disponiéndose una pluralidad de los copolímeros de bloque de manera radial en un estado en el que el segmento de cadena de polímero hidrófobo está dirigido hacia dentro y el segmento de cadena de polímero hidrófilo está dirigido hacia fuera;
    - 15 la composición de micelas de polímero comprende, como los copolímeros de bloque, un copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL y un copolímero de bloque que tiene afinidad por una lipoproteína excluyendo HDL;
      - 20 el copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL tiene un segmento de cadena de polímero hidrófobo formado por un poliaminoácido que incluye unidades de repetición derivadas de un derivado hidrófobo de un aminoácido, incluyendo el derivado hidrófobo de un aminoácido, un derivado obtenido introduciendo un residuo de esterol en una cadena lateral del aminoácido;
      - 25 el copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL tiene un segmento de cadena de polímero hidrófilo de poli(etilenglicol);
      - 30 el copolímero de bloque que tiene afinidad por una lipoproteína excluyendo HDL tiene un segmento de cadena de polímero hidrófobo formado por un poliaminoácido que incluye unidades de repetición derivadas de un derivado hidrófobo de un aminoácido, incluyendo el derivado hidrófobo de un aminoácido, un derivado obtenido introduciendo un grupo hidrófobo que tiene una estructura lineal o ramificada en una cadena lateral del aminoácido, en el que el grupo hidrófobo se selecciona de un grupo alquilo C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub>, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido, un grupo alqueno C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub>, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido y un grupo alquino C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub>, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido; y
      - 35 se induce el desprendimiento del copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL mediante la adhesión de HDL atribuida a la afinidad, un hueco formado a través del desprendimiento provoca el fomento de la liberación de una clase seleccionada del grupo que consiste en proteínas y polipéptidos fisiológicamente activos solubles en agua que tienen cada uno un peso molecular de 1.500 o más como fármaco que va a encapsularse.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el derivado hidrófobo de un aminoácido comprende un derivado de un aminoácido ácido seleccionado de ácido aspártico y ácido glutámico.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que un contenido del copolímero de bloque que tiene afinidad por HDL en una fracción de HDL es mayor que el de otra fracción de lipoproteína excluyendo una fracción de quilomicrones, determinándose el contenido tras la encapsulación de lisozima y la incubación en plasma a 37°C durante 24 horas.
4. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el derivado hidrófobo de un aminoácido en el copolímero de bloque que tiene afinidad por una lipoproteína excluyendo HDL comprende un derivado de un aminoácido ácido seleccionado de ácido aspártico y ácido glutámico.

FIG. 1

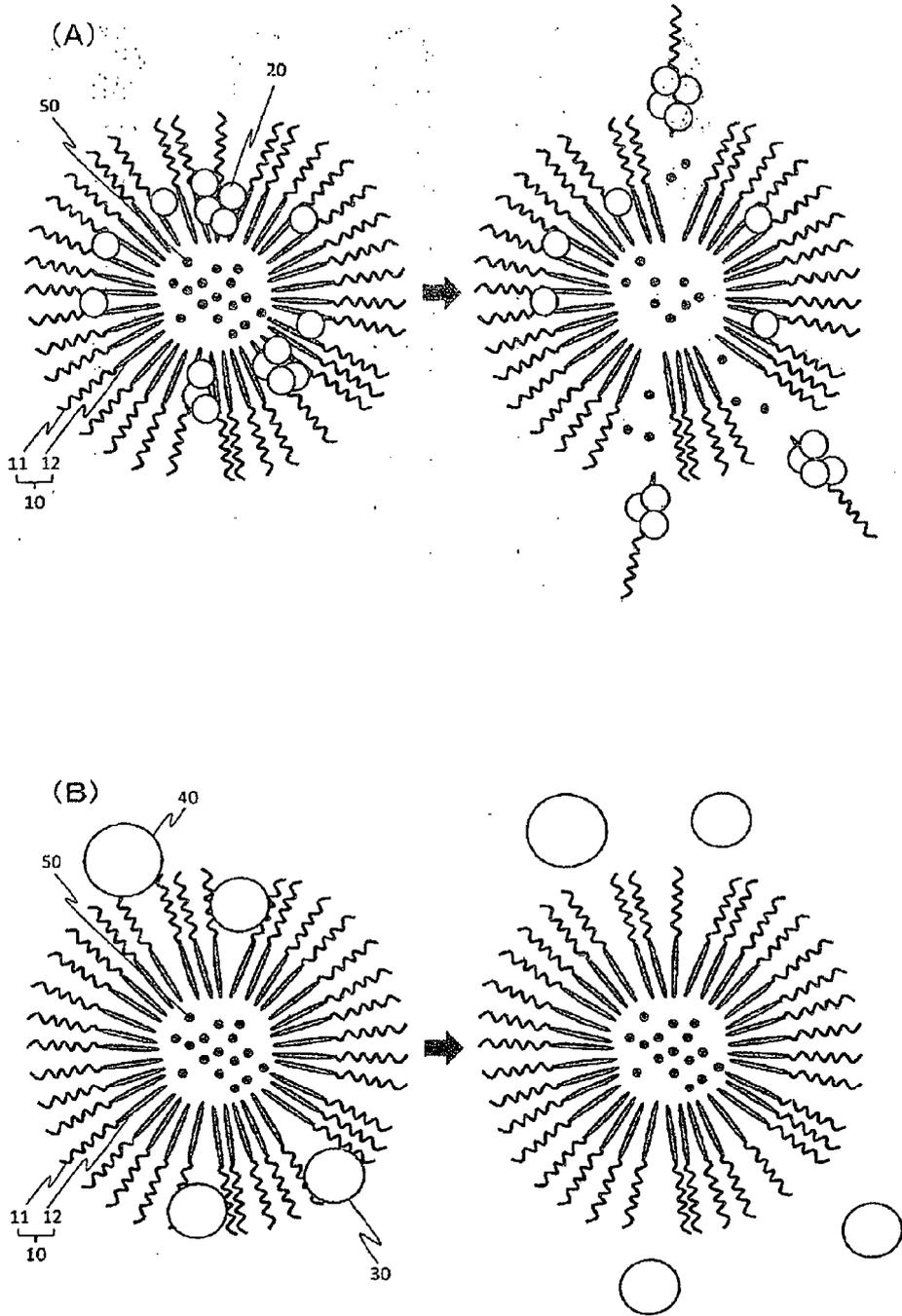


FIG. 2

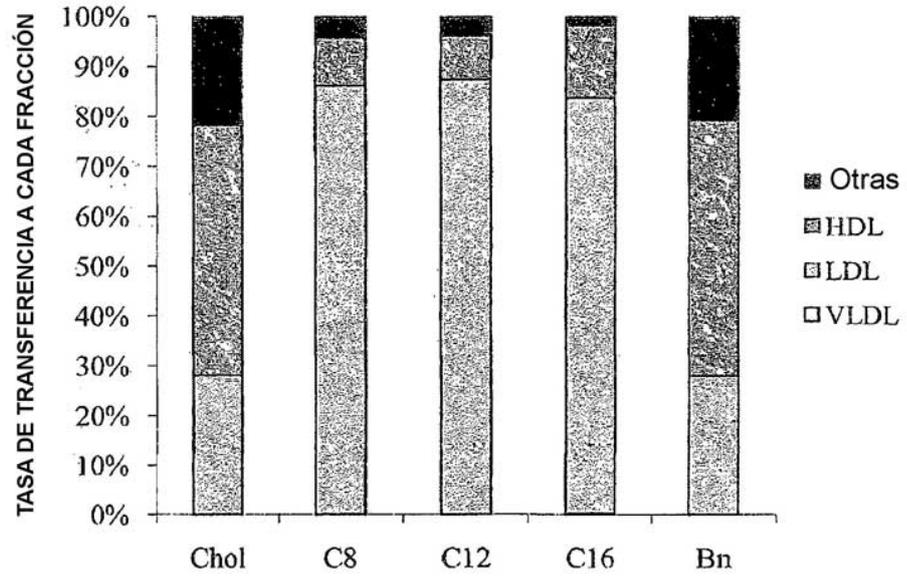


FIG. 3

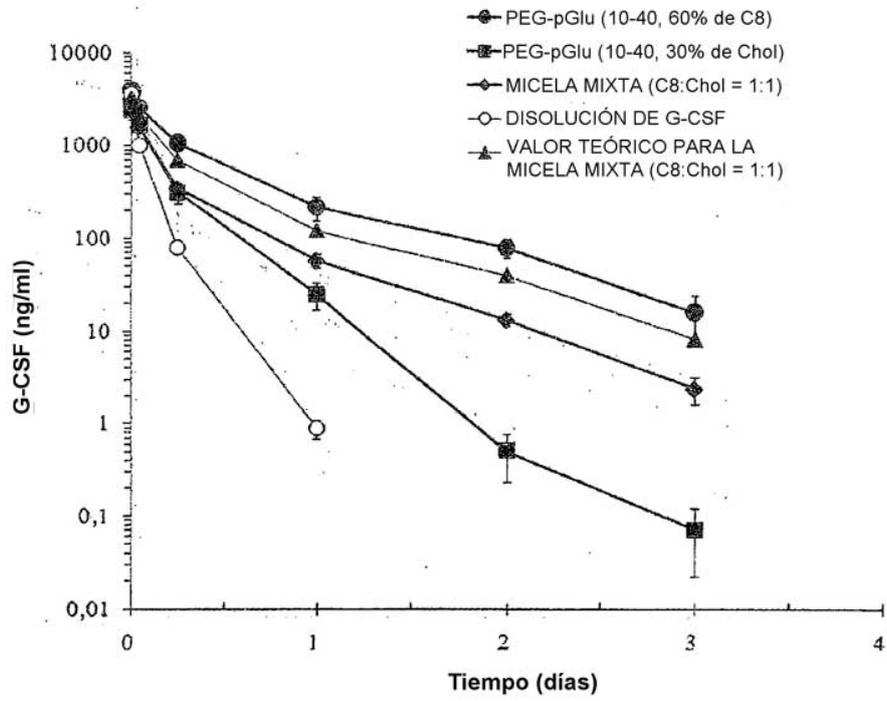


FIG. 4

