

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 632**

51 Int. Cl.:

**C08G 81/00** (2006.01)

**C08G 69/40** (2006.01)

**C08G 69/42** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2012 PCT/JP2012/079897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13073697**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2012 E 12850688 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2781536**

54 Título: **Copolímero en bloque que tiene un grupo ácido fenilborónico introducido en el mismo, y usos del mismo**

30 Prioridad:

**17.11.2011 US 201161561022 P**

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

**28.02.2017**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (33.3%)  
3-1, Hongo 7-chome  
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, JP;  
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO  
MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY (33.3%) y  
NANOCARRIER CO., LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**KATAOKA, KAZUNORI;  
ISHII, TAKEHIKO;  
NAITO, MITSURU;  
MATSUMOTO, AKIRA y  
KATO, YASUKI**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 603 632 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

Copolímero en bloque que tiene un grupo ácido fenilborónico introducido en el mismo, y usos del mismo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un copolímero en bloque que tiene un grupo ácido fenilborónico introducido, y a un complejo que incluye el copolímero en bloque y un fármaco.

Antecedentes de la técnica

10 Los productos farmacéuticos biológicos que incluye cada uno un biopolímero tal como una proteína o un ácido nucleico se descomponen fácilmente con una enzima o se eliminan por un sistema inmune en comparación con los productos farmacéuticos relacionados con la técnica que incluye cada uno un compuesto de bajo peso molecular. Los presentes inventores de la presente invención han desarrollado un sistema de transporte de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés) usando un copolímero en bloque basado en poliaminoácido desde el punto de vista de mejorar el transporte de tales fármacos basados en biotecnología a un área afectada. Un objeto del desarrollo es proporcionar un vehículo que logre simultáneamente la estabilidad en sangre (propiedad de retención de los fármacos basados en biotecnología) y la propiedad de liberación de fármacos en un área afectada.

15 Mientras tanto, para un fin diferente del desarrollo de DDS, los presentes inventores de la presente invención han realizado además estudios básicos sobre un material biocompatible aplicable a un sensor sacárido o a un actuador que responda a sacáridos. Por ejemplo, se ha desarrollado, como el material biocompatible, un compuesto basado en ácido fenilborónico que tiene un anillo fenilo fluorado (Bibliografía de Patentes 1).

20 Nótese que la Bibliografía de Patentes 2 es la técnica relacionada con respecto a un reactivo que se obtiene uniendo un ácido nucleico a un derivado basado en poliaminoácido usando un grupo ácido fenilborónico y se aplica a los análisis de comportamientos y estructuras de ácidos nucleicos y sustancias relacionadas con los ácidos nucleicos.

Lista de citas

Bibliografía de Patentes

[Bibliografía de Patentes 1] JP 2011-140537 A

25 [Bibliografía de Patentes 2] JP 2002-179683 A

Sumario de la invención

Problema técnico

30 Es un objeto principal de la presente invención proporcionar un vehículo que logre simultáneamente la estabilidad de un ensayo basado en biotecnología en sangre y en una propiedad liberadora del fármaco del fármaco en un área afectada. Nótese que la Bibliografía de Patentes 2 describe que la aplicación de un reactivo que lleva una sustancia relacionada con ácidos nucleicos se desarrolla como un DDS. Sin embargo, el DDS desarrollado de esta manera es meramente un profármaco como un imitador del ARN y forma fácilmente precipitados. La tecnología descrita en la Bibliografía de Patentes 2 pretende proporcionar un DDS diferente del DDS desarrollado por los presentes inventores de la presente invención, y no puede aplicarse fácilmente como un vehículo excelente en estabilidad en sangre.

35

Solución al problema

40 Los presentes inventores han descubierto que un material biocompatible creado para un fin diferente al desarrollo del DDS puede mejorar significativamente la estabilidad en sangre de un fármaco basado en biotecnología que incluye un copolímero en bloque basado en poliaminoácidos, y la presente invención se ha completado. Esto es, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un copolímero en bloque que incluye un segmento de cadena de poliaminoácido y un segmento de cadena de polímero hidrófilo en el que el segmento de cadena de poliaminoácido incluye un resto de aminoácido que tiene un grupo catiónico en una cadena lateral y un resto de aminoácido que tiene un grupo ácido fenilborónico sustituido en una cadena lateral, teniendo el grupo ácido fenilborónico un anillo fenilo en el que al menos un átomo de hidrógeno se sustituye para tener un pKa de menos de 7,5; tal como se describe adicionalmente en las reivindicaciones.

45

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un complejo. El complejo es un complejo que

incluye el copolímero en bloque y un ácido nucleico.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un vehículo capaz de lograr simultáneamente la estabilidad en sangre de un fármaco basado en biotecnología y la propiedad de liberación del fármaco en una célula diana.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra una relación entre los contenidos de un grupo FPBA y la estabilidad del complejo.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de toxicidad de los copolímeros en bloque.

10 La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de toxicidad de los complejos.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la estabilidad del pH de un complejo.

La Figura 5 es un gráfico que muestra las propiedades liberadoras de ARNip de los complejos.

La Figura 6 es un gráfico que muestra una capacidad de tomar un complejo dentro de las células.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la capacidad de retención de un complejo en sangre.

15 La Figura 8 es un gráfico que muestra las actividades anticancerígenas de los complejos.

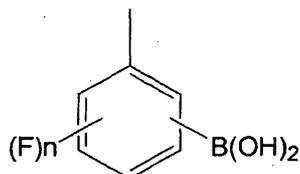
Descripción de las realizaciones

[A. Copolímero en bloque]

Un copolímero en bloque de la presente invención incluye un segmento de cadena de poliaminoácido y un segmento de cadena de polímero hidrófilo. El segmento de cadena de poliaminoácido incluye un resto de aminoácido que tiene un grupo catiónico en una cadena lateral (en lo sucesivo en el presente documento a veces denominado "resto de aminoácido catiónico") y un resto de aminoácido que tiene un grupo fenilborónico sustituido (en lo sucesivo en el presente documento a veces denominado "grupo PBA sustituido") en una cadena lateral, teniendo el grupo ácido fenilborónico sustituido un anillo fenilo en el que al menos un átomo de hidrógeno se sustituye por un halógeno o un grupo nitro para tener un pKa de menos de 7,5 (en lo sucesivo en el presente documento a veces denominado "resto de aminoácido que contiene un grupo PBA sustituido"). En el contexto, el resto de aminoácido catiónico puede ser diferente de o el mismo que el resto de aminoácido que contiene un grupo PBA sustituido. Específicamente, el segmento de cadena de poliaminoácido puede incluir un resto de aminoácido catiónico libre del grupo PBA sustituido en una cadena lateral y un resto de aminoácido que contiene un grupo PBA sustituido libre del grupo catiónico en una cadena lateral. Alternativamente, en lugar de uno o ambos de los restos de aminoácidos o además de los restos de aminoácidos, el segmento de cadena de poliaminoácido puede incluir un resto de aminoácido que tenga tanto el grupo catiónico como el grupo PBA sustituido en una cadena lateral.

Desde el punto de vista de la compatibilidad con un cuerpo ambientalmente tipificado por la sangre (menos de pH 7,5), en el grupo PBA sustituido, al menos un átomo de hidrógeno de un anillo fenilo que constituye un grupo ácido fenilborónico se sustituye por un grupo halógeno o uno nitro de tal manera que el grupo ácido fenilborónico sustituido tenga un pKa de menos de 7,5. El número de los átomos de hidrógeno sustituidos es 1, 2, 3 o 4. Cuando solo se sustituye un átomo de hidrógeno, el sustituyente y B(OH)<sub>2</sub> pueden introducirse en una cualquiera de las posiciones orto, meta y para. Los ejemplos del sustituyente incluyen un halógeno tal como flúor, cloro o bromo; y un grupo nitro. De estos, desde el punto de vista de potenciar la hidrofiliidad del copolímero en bloque y el punto de vista de ajustar el pKa a menos de 7,5, el grupo PBA sustituido es preferentemente un grupo ácido fenilborónico fluorado representado por la fórmula (I) siguiente (en lo sucesivo a veces denominado "grupo PBA"). El pKa del grupo PBA sustituido se especifica a partir de un grupo PBA sustituido que contiene un aminoácido sintetizado como un monómero. El límite inferior del pKa del grupo PBA sustituido no se limita particularmente, y puede ser 2 o 3, por ejemplo.

[Quím. 1]



(I)

(En la fórmula (I): Las F están presentes independientemente; n representa 1, 2, 3 o 4; y cuando n representa 1, F y B(OH)<sub>2</sub> pueden introducirse en una cualquiera de las posiciones orto, meta y para).

5 El copolímero en bloque de la presente invención tiene un grupo catiónico en un resto de la cadena lateral del segmento de cadena de poliaminoácido, y por lo tanto puede asociarse a un biopolímero para formar un complejo, por ejemplo, un complejo poliónico (PIC).

10 Además, el copolímero en bloque de la presente invención tiene el grupo PBA sustituido en un resto de cadena lateral del segmento de cadena de poliaminoácido y por lo tanto puede mostrar los siguientes efectos. En primer lugar, la hidrofobicidad del segmento de cadena de poliaminoácido se potencia y de esta manera se provoca adecuadamente una interacción hidrófoba así como una interacción electrostática entre una pluralidad de copolímeros en bloque de la presente invención en un disolvente acuoso. Como resultado, la fuerza de asociación entre los polímeros se potencia y de esta manera el copolímero en bloque de la presente invención puede formar una micela polimérica muy estable en un disolvente acuoso. Nótese que el copolímero en bloque de la presente invención en la micela polimérica se estima que se disponga de forma radial de tal manera que el segmento de cadena de poliaminoácido esté hacia dentro y el segmento de cadena de polímero hidrófilo esté hacia fuera. Los ejemplos del disolvente acuoso incluyen agua, solución salina fisiológica, tampones acuosos tales como un tampón fosfato, un tampón carbonato, un tampón borato y un tampón acetato.

20 En segundo lugar, un compuesto de ácido fenilborónico tiene una capacidad de unión covalente reversible para una molécula que tiene un 1,2-diol (cis-diol) o un 1,3-diol en un disolvente acuoso. Por lo tanto, el copolímero en bloque de la presente invención puede unirse fuertemente a un biopolímero que tiene un 1,2-diol o similares (por ejemplo, ARNip) en un disolvente acuoso a través de un enlace covalente al grupo PBA sustituido así como un enlace electrostático al grupo catiónico, dando como resultado la formación de un complejo estable (por ejemplo, una micela polimérica que incluye el biopolímero encapsulado en la misma). En particular, el copolímero en bloque de la presente invención puede unirse al ARNip que tiene cis-dioles en la ribosa 2'-terminal de ambas dobles cadenas y en los dos 3'-terminales y por lo tanto puede formar un complejo muy estable.

30 En tercer lugar, el ácido fenilborónico normalmente tiene un pKa de aproximadamente 8 a 9, y por lo tanto tiene la máxima capacidad de unión covalente por la molécula que tiene un 1,2-diol o similares a un pH alrededor del pKa. Por lo tanto, se ha considerado que el uso del ácido fenilborónico es difícil en principio en un ambiente corporal de menos de pH 7,5. Sin embargo, en el grupo PBA sustituido a introducirse dentro del copolímero en bloque de la presente invención, se sustituye un átomo de hidrógeno del anillo fenilo de tal manera que el grupo tiene un pKa alrededor del pH fisiológico (muestra preferentemente un pKa de menos de 8, más preferentemente un pKa de menos de 7,5) y de esta manera el grupo PBA sustituido puede mostrar adecuadamente la capacidad de unión en el ambiente corporal.

35 En cuarto lugar, el grupo PBA sustituido se hidrofobiza altamente en un ambiente de pH igual a o menor del pKa. Por lo tanto, cuando el pKa se controla apropiadamente, es posible potenciar tanto un enlace a la molécula que tiene un 1,2-diol o similares como una interacción hidrófoba entre los copolímeros en bloque en el ambiente corporal. Como resultado, puede obtenerse un complejo muy estable formado por las moléculas.

[A-1. Segmento de cadena de poliaminoácido]

40 El segmento de cadena de poliaminoácido incluye un resto de aminoácido catiónico que tiene un grupo catiónico en una cadena lateral y un resto de aminoácido que contiene un grupo PBA sustituido que tiene un grupo PBA sustituido en una cadena lateral.

45 El resto de aminoácido catiónico es preferentemente un resto de aminoácido catiónico que tiene un grupo amino en una cadena lateral. Cuando el resto de aminoácido catiónico tiene el grupo amino en la cadena lateral, el grupo amino puede coordinarse con boro del grupo PBA sustituido en un disolvente acuoso. Como resultado, la hidrofobización del copolímero en bloque debida a la introducción del grupo PBA sustituido puede evitarse para mantener la alta hidrofiliadad. Nótese que incluso en un estado donde el grupo amino se coordina con boro, puede mantenerse la capacidad de unión del grupo PBA sustituido para la molécula que tiene un cis-diol o similares.

Como un aminoácido a partir del que deriva el resto de aminoácido catiónico que tiene un grupo amino en una cadena lateral, se dan, por ejemplo: un aminoácido básico tal como lisina, ornitina, arginina, homoarginina o histidina; y un derivado de aminoácido obtenido introduciendo cualquier compuesto amina apropiado en un aminoácido ácido. De estos, los preferidos son lisina y un derivado de aminoácido de los grupos de las siguientes fórmulas (i) a (iv), los más preferidos son lisina y un derivado de aminoácido obtenido sustituyendo el resto -OH de un grupo carboxilo (-C(=O)OH) en la posición  $\alpha$  o en la posición  $\beta$  de ácido aspártico o en la posición  $\alpha$  o en la posición  $\gamma$  del ácido glutámico por uno cualquiera de los grupos de las siguientes fórmulas (i) a (iv) y los todavía más preferidos son lisina y un derivado de aminoácidos obtenido sustituyendo el resto -OH de un grupo carboxilo (-C(=O)OH) en la posición  $\alpha$  o en la posición  $\beta$  de ácido aspártico o en la posición  $\alpha$  o en la posición  $\gamma$  del ácido glutámico por el grupo de la siguiente fórmula (i):

- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{p1}\text{[NH}(\text{CH}_2)_{q1}\text{]}_{r1}\text{NH}_2$  (i) ;
- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{p2}\text{-N[}(\text{CH}_2)_{q2}\text{-NH}_2\text{]}_2$  (ii) ;
- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{p3}\text{-N}\{[\text{-(CH}_2)_{q3}\text{-NH}_2][\text{-(CH}_2)_{q4}\text{-NH-}]_{r2}\text{H}\}$  (iii) ; y
- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{p4}\text{-N}\{(\text{CH}_2)_{q5}\text{-N[}(\text{CH}_2)_{q6}\text{-NH}_2\text{]}_2\}_2$  (iv)

en las fórmulas (i) a (iv):  $p_1$  a  $p_4$ ,  $q_1$  a  $q_6$  y  $r_1$  y  $r_2$  cada uno independientemente representa un número entero de 1 a 5.

En las fórmulas (i) a (iv),  $p_1$  a  $p_4$  y  $q_1$  a  $q_6$  representan independientemente cada uno preferentemente 2 o 3, más preferentemente 2. Además,  $r_1$  y  $r_2$  representa independientemente cada uno preferentemente un número entero de 1 a 3.

Cuando el resto de aminoácido catiónico es un resto de lisina, hay ventajas en que una cadena de poliaminoácido se sintetiza fácilmente y el copolímero en bloque resultante es muy excelente en biocompatibilidad. Por otro lado, se ha revelado que cuando el resto de aminoácido catiónico es un resto de aminoácido obtenido sustituyendo el resto -OH de un grupo carboxilo (-C(=O)OH) de un aminoácido ácido por uno cualquiera de los grupos de las fórmulas (i) a (iv), los restos tienen una pluralidad de diferentes grupos amina funcionales y de esta manera muestran una pluralidad de fases de  $pK_a$ , y una diversidad de grupos funcionales amina se protonan parcialmente en una condición fisiológica a pH 7,4 y tienen un daño pequeño en las células. Además, hay una ventaja en que una interacción con un ácido nucleico o similares permite la formación adecuada de un complejo tal como un PIC. Además, cuando el complejo formado de esta manera se integra en un endosoma (pH 5,5), la protonación del segmento de cadena de poliaminoácido avanza adicionalmente debido a una disminución del pH ambiental y el escape del endosoma puede promoverse en base a un efecto tampón (o un efecto de esponja de protones) o una actividad de daño de membrana potenciada. Como resultado, es posible mejorar la eficacia del transporte de fármacos al citoplasma.

El grupo PBA sustituido se introduce en la cadena lateral del resto de aminoácido que contiene el grupo PBA sustituido a través de un enlace amida, un enlace carbamilo, un enlace alquilo, un enlace éster, un enlace tioéster, un enlace tioéter, un enlace sulfonamida, un enlace uretano, un enlace sulfonilo, un enlace timina, un enlace urea o un enlace tiourea.

Puede seleccionarse cualquier resto de aminoácido apropiado como un resto de aminoácido en el que se introduce el grupo PBA sustituido, siempre que el grupo PBA sustituido se introduzca a través del grupo de unión. Desde el punto de vista de la facilidad de síntesis, el grupo PBA sustituido se introduce preferentemente en el resto de aminoácido catiónico que tiene un grupo amino en una cadena lateral. Específicamente, el grupo PBA sustituido puede introducirse en el resto de aminoácido catiónico que tiene un grupo amino en una cadena lateral a través de un enlace amida formado por una reacción del grupo amino con ácido carboxifenilborónico en el que al menos un átomo de hidrógeno de un anillo fenilo está sustituido o un éster del mismo. En el contexto, solamente un grupo PBA sustituido o una pluralidad de grupos PBA sustituidos puede introducirse en un resto de aminoácido catiónico que tiene una pluralidad de grupos amino en una cadena lateral. Cuando solamente se introduce un grupo PBA sustituido, el resto de aminoácido que contiene un grupo PBA sustituido después de la introducción tiene tanto el grupo amino como el grupo PBA sustituido en la cadena lateral, y de esta manera también es un resto de aminoácido catiónico. Por lo tanto, en la presente invención, un segmento de cadena de poliaminoácido que contiene solamente tal resto de aminoácido también se entiende que incluye tanto el resto de aminoácido catiónico como el resto de aminoácido catiónico como el resto de aminoácido que contiene el grupo PBA sustituido. Sin embargo, al determinar la suma del número de los restos de aminoácidos catiónicos y el número de los restos de aminoácidos que contienen grupos PBA sustituidos en el segmento de cadena de poliaminoácido que contiene tal resto de aminoácido, tales restos de aminoácidos se cuentan como uno cualquiera de los restos de aminoácidos catiónicos y los restos de aminoácidos que contienen grupos PBA sustituidos.

El segmento de cadena de poliaminoácido puede incluir además un resto de aminoácido que tiene un grupo

5 hidrófobo en una cadena lateral (en lo sucesivo en el presente documento a veces denominado “resto de aminoácido hidrófobo”) así como el resto de aminoácido catiónico y el resto de aminoácido que contiene un grupo PBA sustituido. Cuando el segmento de cadena de poliaminoácido incluye el resto de aminoácido hidrófobo, aumenta una interacción hidrófoba entre los copolímeros en bloque de la presente invención en un disolvente acuoso. Como resultado, puede formarse una micela de polímero más estable. Además, los restos de aminoácidos hidrófobos se pegan en un resto hidrófobo en una membrana celular y pueden funcionar como un anclaje para fijar la micela de polímero a una membrana celular. Por lo tanto, cuando un biopolímero tal como un ácido nucleico se encapsula en la micela polimérica, puede mejorarse una relación del biopolímero introducido en las células.

10 Un aminoácido a partir del que deriva un resto de aminoácido hidrófobo se ejemplifica preferentemente por un aminoácido que tiene una solubilidad en 100 g de agua a 25 °C de 5 g o menos, más preferentemente 4 g o menos. Los ejemplos de un aminoácido tal incluyen un aminoácido natural apolar tal como leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina o triptófano y un derivado hidrófobo de un aminoácido que tiene un grupo hidrófobo introducido en una cadena lateral. Un ejemplo preferido del derivado hidrófobo del aminoácido es un derivado que tiene un grupo hidrófobo introducido en una cadena lateral de un aminoácido ácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico.

15 El grupo hidrófobo a introducirse puede ejemplificarse preferentemente por un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado saturado o insaturado de 6 a 27 átomos de carbono, un grupo hidrocarburo aromático que tiene de 6 a 27 átomos de carbono o un grupo esterilo.

20 El grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado saturado que tiene de 6 a 27 átomos de carbono se ejemplifica por un grupo pentacosilo, un grupo hexacosilo o un grupo heptacosilo así como el grupo alquilo que tiene 6 a 27 átomos de carbono.

25 Un ejemplo del grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado insaturado que tiene 6 a 27 átomos de carbono es un grupo en el que 1 a 5 átomos sencillos carbono-carbono en una cadena del grupo alquilo que tiene 6 a 27 átomos de carbono se reemplazan por dobles enlaces carbono-carbono. Como un ácido graso insaturado que tiene un grupo tal, se dan, por ejemplo, ácido láurico (o ácido dodecanoico), ácido mirístico (o ácido tetradecanoico), ácido palmítico (o ácido hexadecanoico), ácido palmitoleico (o ácido 9-hexadecenoico), ácido esteárico (o ácido octadecanoico), ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido eleosteárico (o ácido 9,11,13-octadecatrienoico), ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido nervónico, ácido cerótico y ácido montánico.

30 Los ejemplos del grupo hidrocarburo aromático que tiene 6 a 27 átomos de carbono incluyen un grupo arilo y un grupo aralquilo. Los ejemplos específicos preferidos de aquellos grupos incluyen un grupo fenilo, un grupo naftilo, un grupo tolilo, un grupo xililo, un grupo bencilo y un grupo fenetilo.

35 Un esteroil del que deriva el grupo esterilo significa un compuesto natural, semisintético o sintético basado en un anillo de hidrofenantreno de ciclopentanona ( $C_{17}H_{28}$ ) y derivados de los mismos. Por ejemplo, un esteroil natural se ejemplifica por, pero no se limita a, colesterol, colestanol, dihidrocolesterol, ácido cólico, campesterol o sitosterol. Los compuestos semisintéticos o sintéticos del mismo pueden ser, por ejemplo, precursores sintéticos de aquellos productos naturales (como sea necesario, abarcando un compuesto en el que parte de o todos, si están presentes, ciertos grupos funcionales, los grupos hidroxilo se han protegido con un grupo protector hidroxilo conocido en la técnica, o un compuesto en el que un grupo carboxilo se ha protegido con un grupo protector carboxilo). Además, el derivado esteroil significa que, por ejemplo, sin afectar adversamente al objeto de la presente invención, puede introducirse un grupo alquilo  $C_{1-12}$ , un átomo halógeno tal como cloro, bromo o flúor, en un anillo de hidrofenantreno de ciclopentanona, y el sistema de anillo puede estar saturado o parcialmente insaturado. El esteroil del que deriva el grupo esterilo es preferentemente un esteroil que se origina de un aceite animal o vegetal tal como colesterol, colestanol, dihidrocolesterol, ácido cólico, campesterol o sitosterol, más preferentemente colesterol, colestanol o dihidrocolesterol, en particular preferentemente colesterol.

45 El segmento de cadena de poliaminoácido puede incluir, como cada uno de los restos de aminoácidos catiónicos, el resto de aminoácido que contiene el grupo PBA sustituido, y el resto de aminoácido hidrófobo, un tipo de resto de aminoácido o dos o más tipos de restos de aminoácidos. Además, el resto de aminoácido catiónico, el resto de aminoácido que contiene el grupo PBA sustituido y el resto de aminoácido hidrófobo en el segmento de cadena de poliaminoácido se unen entre sí en cualquier orden adecuado y puede ser aplicable una estructura aleatoria o una estructura en bloque.

50 Los números de los restos de aminoácidos catiónicos, los restos de aminoácidos que contienen grupos PBA sustituidos y los restos de aminoácidos hidrófobos contenidos en el segmento de cadena de poliaminoácido pueden ajustarse apropiadamente dependiendo del tipo de cada uno de los restos de aminoácidos, la aplicación del copolímero en bloque o similares. Desde el punto de vista de mejorar la propiedad de retención (estabilidad en sangre) del biopolímero con certeza adicional, el número de cada uno de los restos de aminoácidos se ajusta preferentemente de tal manera que se satisfaga la siguiente expresión relacional: Nótese que cuando una pluralidad de grupos catiónicos están presentes en una unidad de repetición (resto de aminoácido) que constituye el segmento de cadena de poliaminoácido, puede introducirse una pluralidad de grupos PBA sustituidos en una unidad de

repetición. Por lo tanto, el número total de grupos PBA sustituidos en el segmento de cadena de poliaminoácido puede exceder la suma del número de los restos de aminoácidos catiónicos que no tienen un grupo PBA sustituido introducido y el número de los restos de aminoácidos que tienen el grupo PBA sustituido introducido (resto de aminoácido que contiene un grupo PBA introducido). Además, en un análisis por un dispositivo de análisis estructural de propósito general, puede ser difícil distinguir si una pluralidad de grupos PBA sustituidos se introducen en una unidad de repetición o se introducen separadamente en una pluralidad de unidades de repetición. Por lo tanto, en la expresión relacional, por el bien de la conveniencia, el número de los restos de aminoácidos catiónicos libres del grupo PBA sustituido puede definirse como un valor determinado sustrayendo el número de los grupos PBA sustituidos (valor medido) de la suma del número de los restos de aminoácidos catiónicos y el número de los restos de aminoácidos que contienen los grupos PBA sustituidos (valor teórico) (sin embargo, el límite inferior se define como 0). Nótese que el límite superior de la siguiente expresión relacional no se limita particularmente, y puede ser, por ejemplo, 40, 38, 35 o 25. Cuando el valor de la siguiente expresión relacional es 14 o más, o 15 o más, la estabilidad en sangre se mejora con más certeza.

[Mat. 1]

$$\sqrt{\text{Número de restos de aminoácidos catiónicos libres de grupo ácido fenilborónico sustituido en el segmento de cadena de poliaminoácido}} + 2\sqrt{\text{Número de grupos ácido fenilborónico sustituidos en el segmento de cadena de poliaminoácido}} \geq 12,0$$

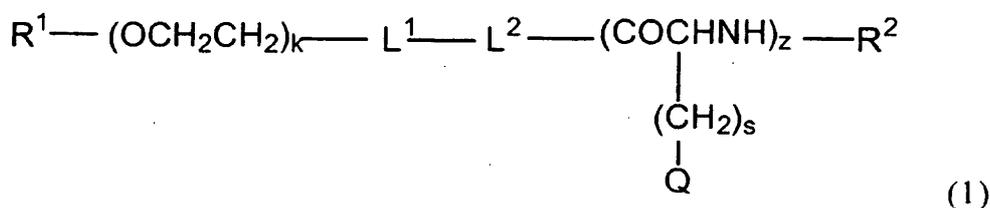
15 [A-2. Segmento de cadena polimérica hidrófila]

El segmento de cadena polimérica hidrófila puede formarse por un polímero hidrófilo apropiado. Los ejemplos del polímero hidrófilo incluyen poli(etilenglicol), polisacárido, poli(vinilpirrolidona), poli(vinil alcohol), poli(acrilamida), (ácido) poli(acrílico), poli(metilamida), poli(metacrilamida), (ácido) poli(metacrílico), (éster del ácido) poli(metacrílico), (éster del ácido) poli(acrílico), poliaminoácido, (ácido) poli(málico) y derivados de los mismos. Los ejemplos específicos del polisacárido incluyen almidón, dextrano, fructano y galactano. De esos, puede usarse preferentemente el poli(etilenglicol) debido a que los polietilenglicoles reactivos terminales que tienen una diversidad de grupos funcionales en sus términos están disponibles en el mercado, los polietilenglicoles que tienen una diversidad de pesos moleculares están disponibles en el mercado y estos polietilenglicoles están fácilmente disponibles.

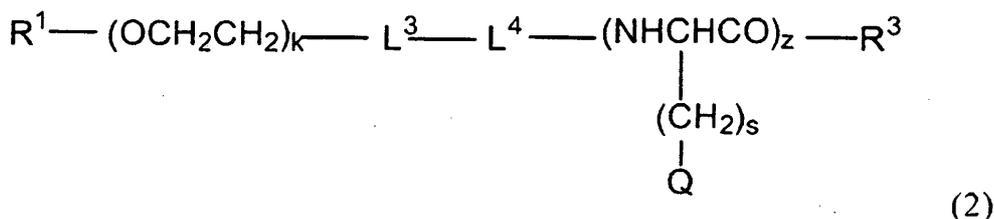
25 [A-3. Ejemplos específicos de copolímero en bloque]

Los ejemplos específicos de un copolímero en bloque en una realización particularmente preferida de la presente invención se representan por las fórmulas (1) a (4). En los copolímeros en bloque de las fórmulas (1) a (4), el grupo PBA sustituido se introduce en una cadena lateral de un resto de aminoácido catiónico.

[Quím. 2]



[Quím. 3]



30



En las fórmulas (1) a (4), tanto  $L^1$  y  $L^2$  como  $L^3$  y  $L^4$  necesitan cada uno combinarse juntos de tal manera que formen un grupo de unión. Por ejemplo, cuando  $L^2$  representa -NH-,  $L^1$  no representa -S-S- sino que representa un enlace de valencia.

5 En las fórmulas (1) a (4), k, que representa el número de repeticiones de etilenglicol (u oxietileno), representa un número entero de 30 a 20.000, preferentemente 40 a 2.000, más preferentemente 50 a 1.500.

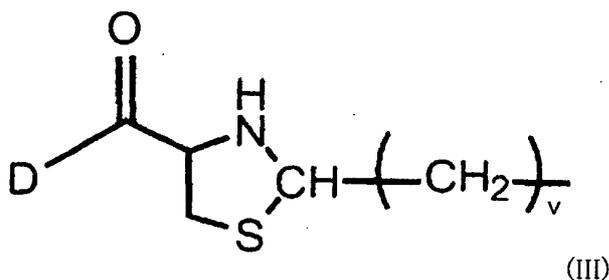
10 Un resto alquilo en el grupo alquilo lineal o ramificado, en el grupo imino alquil-sustituido y en el grupo alquilo que tiene 1 a 12 átomos de carbono, que se definen por los grupos  $R^1$  a  $R^3$ , puede ser, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-hexilo, un grupo decilo y un grupo undecilo. Un resto alqueno o alquino en el grupo alqueno lineal o ramificado que tiene 2 a 12 átomos de carbono o el grupo alqueno lineal o ramificado que tiene 2 a 12 átomos de carbono puede ejemplificarse por un resto alqueno o alquino que incluye un doble enlace o un triple enlace en el grupo alquilo que tiene 2 o más átomos de carbono como se ejemplifica anteriormente.

15 Para tal grupo o resto, un sustituyente en un caso "sustituido" puede ejemplificarse por, pero no limitarse a, un grupo alcoxi  $C_{1-6}$ , un grupo arilo, un grupo aril  $C_{1-3}$  oxi, un grupo ciano, un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo alcóxycarbonilo  $C_{1-6}$ , un grupo acilamida  $C_{2-7}$ , un grupo alquil  $C_{1-6}$ -siloxi, un grupo siloxi o un grupo sililamino, o puede ejemplificarse por un grupo formilo acetalizado, un grupo formilo o un átomo halógeno tal como cloro o flúor. En este contexto, por ejemplo, la expresión " $C_{1-6}$ " significa 1 a 6 átomos de carbono y se usa con el mismo significado en la siguiente descripción. Además, un resto alquilo lineal o ramificado no sustituido o sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono en el grupo alquilcarbonilo lineal o ramificado no sustituido o sustituido que tiene 1 a 20 átomos de carbono puede seleccionarse con referencia a los ejemplos anteriormente descritos y un resto alquilo que tiene 13 o más átomos de carbono puede ser, por ejemplo, un grupo tridecilo, un grupo tetradecilo, un grupo pentadecilo, un grupo nonadecilo, un grupo docosano o un grupo tetracosilo.

25 En otra realización, un sustituyente para el grupo  $R^1$  puede ser un grupo que contiene un sitio de unión a diana. La introducción del sitio de unión a diana en el término de un polímero puede mejorar el transporte del fármaco (biopolímero) a un sitio diana deseado. El grupo que contiene el sitio de unión a diana puede ser cualquier grupo apropiado siempre que el grupo tenga la propiedad de marcaje como diana o la funcionalidad para un tejido diana. Por ejemplo, el grupo puede ser un grupo que se origina a partir de una sustancia fisiológicamente activa tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, u otra proteína que tenga la funcionalidad o la propiedad del marcaje como diana, un péptido, un aptámero, un azúcar tal como lactosa, o ácido fólico y un derivado de los mismos.

30 Un ejemplo del grupo  $R^1$  sustituido por un grupo que incluye el sitio de unión a la diana se representa por la siguiente fórmula (III):

[Quím. 7]



donde: v representa un número entero de 1 a 5; y D representa el sitio de unión a la diana.

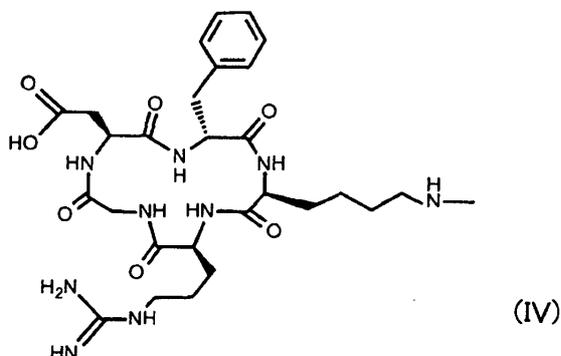
35 D representa preferentemente un péptido que tiene un peso molecular promedio en peso de 50 a 20.000, más preferentemente un péptido que tiene un peso molecular promedio en peso de 100 a 10.000, todavía más preferentemente un péptido que tiene un peso molecular promedio en peso de 150 a 3.000.

Además, D representa preferentemente un péptido que tiene 1 a 200 restos de aminoácidos, más preferentemente un péptido que tiene 1 a 100 restos de aminoácidos, todavía más preferentemente un péptido que tiene 1 a 30 restos de aminoácidos.

40 Los ejemplos del péptido incluyen péptidos capaces de unirse específicamente a la integrina, que está implicada en la angiogénesis, el engrosamiento de la íntima y el crecimiento de tumores malignos, y los ejemplos específicos de los mismos incluyen péptidos RGD. Al usar un péptido RGD como el sitio de unión a diana, las partículas, que son capaces de reconocer específicamente una porción enferma, y son obtenibles composiciones farmacéuticas que

usan las partículas. Los péptidos RGD como se usan en el presente documento se refieren a péptidos que incluyen una secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). El péptido RGD es preferentemente un péptido RGD cíclico (RGDc). Específicamente, D puede representarse por la siguiente fórmula (IV):

[Quím. 8]



- 5 En las fórmulas (1) a (4), los grupos de las fórmulas (i) a (iv) definidos por los grupos R<sup>6a</sup> y R<sup>6b</sup> y el grupo hidrocarburo o el grupo esterilo definido por los grupos R<sup>8a</sup> y R<sup>8b</sup> son como se menciona anteriormente. Los grupos Q, R<sup>6a</sup>, R<sup>6b</sup>, R<sup>8a</sup> y R<sup>8b</sup> seleccionados para todas las unidades de repetición pueden ser el mismo o diferentes entre sí. Además, s representa 1, 3 o 4, por ejemplo.

- 10 En la fórmula (3) o (4), cuando ambos de los grupos R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> representan cada uno un grupo etileno, se representa típicamente un poliaminoácido en el que n representa un número entero de 0 o un poliaminoácido en el que m-n representa un número entero de 0. El primero representa, por ejemplo, ácido poli- $\alpha$ -glutámico, que se obtiene por la polimerización de un anhídrido N-carboxílico de éster  $\gamma$ -bencílico de ácido glutámico, y el último representa, por ejemplo, ácido poli- $\gamma$ -glutámico, que se produce por una cepa bacteriana del género bacteriano *Bacillus* tal como *Bacillus natto*. Mientras tanto, cuando ambos de los grupos R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> representa cada uno un grupo metileno, se entiende que las respectivas unidades de repetición que tienen estos grupos pueden coexistir entre sí. Lo mismo es cierto para R<sup>5a</sup> y R<sup>5b</sup>. Se prefiere que los grupos R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> representen cada uno un grupo metileno y los grupos R<sup>5a</sup> y R<sup>5b</sup> representen cada uno un grupo etileno desde el punto de vista de la eficacia de la producción.

- 20 Desde el punto de vista de la estabilidad de la micela de polímero formada, el número total z de los restos de aminoácidos catiónicos y los restos de aminoácidos que contienen el grupo PBA sustituido incluidos en el copolímero en bloque de fórmula (1) o (2) es un número entero de 1 a 300, preferentemente de 20 a 300, todavía más preferentemente 40 a 150.

- 25 Desde el punto de vista de la estabilidad de la micela de polímero formada, el número total m de los restos de aminoácidos catiónicos y los restos de aminoácidos que contienen el grupo PBA sustituido incluidos en el copolímero en bloque de fórmula (3) o (4) es un número entero de 1 a 300, preferentemente 1 a 200, más preferentemente 1 a 150. Cuando el copolímero en bloque incluye un resto de aminoácido hidrófobo (esto es, cuando x representa cualquier número distinto de 0), el número de restos de aminoácidos catiónicos puede ser, por ejemplo, un número entero de 1 a 20, preferentemente 1 a 15, más preferentemente 1 a 10, todavía más preferentemente 1 a 5. Tal copolímero en bloque permite la liberación de un biopolímero más adecuadamente tipificado por un ácido nucleico.

- 30 El número x de los restos de aminoácidos hidrófobos que pueden incluirse en el copolímero en bloque de fórmula (3) o (4) puede ajustarse apropiadamente dependiendo del tipo o del número de los restos de aminoácidos catiónicos, la aplicación del copolímero en bloque o similares. El número x de los restos de aminoácidos hidrófobos es un número entero de preferentemente 1 a 80, más preferentemente 5 a 70, todavía más preferentemente 10 a 60.

- 35 En los copolímeros en bloque de fórmulas (1) a (4), el número de los restos de aminoácidos que contienen grupos PBA sustituidos puede ajustarse apropiadamente dependiendo del tipo de los restos de aminoácidos catiónicos, la aplicación del copolímero en bloque o similares. En los copolímeros en bloque, en particular, en los copolímeros en bloque de fórmulas (1) y (2), el grupo PBA sustituido se introduce preferentemente en la cadena lateral del resto de aminoácido catiónico de tal manera que se satisfaga la siguiente relación. Cuando se satisface tal relación, la propiedad de retención del biopolímero por el copolímero en bloque (estabilidad en sangre) se mejora con más certeza. Nótese que el límite superior de la siguiente expresión relacional no se limita particularmente, y puede ser 40, 38, 35 o 25, por ejemplo. Cuando el valor de la siguiente expresión relacional es 14 o más, o 15 o más, la estabilidad en sangre se mejora con más certeza.

[Mat. 2]

$$\sqrt{\text{Número de restos de aminoácidos catiónicos libres de grupo ácido fenilborónico sustituido en el segmento de cadena de poliaminoácido}} + 2\sqrt{\text{Número de grupos ácido fenilborónico sustituidos en el segmento de cadena de poliaminoácido}} \geq 12,0$$

## [A-4. Método de preparación para el copolímero en bloque]

El copolímero en bloque de la presente invención puede prepararse por cualquier método de síntesis apropiado. Un ejemplo del método de síntesis para un copolímero en bloque en una realización preferida de la presente invención es como sigue. En otras palabras, el copolímero en bloque puede prepararse: formando una cadena de polietilenglicol por polimerización in vivo aniónica usando un iniciador capaz de proporcionar R<sup>1</sup>; introduciendo un grupo amino en el lado del extremo de crecimiento de la cadena de polietilenglicol; polimerizando desde el extremo amino un derivado de aminoácido protegido tal como NCA-Lys (TFA) para formar un segmento de cadena de poliaminoácido; desprotegiendo la cadena lateral del poliaminoácido para exponer el grupo amino; y sometiendo el grupo amino expuesto a una reacción con un grupo carboxilo de un ácido carboxifenilborónico fluorado para introducir un número deseado de grupos FPBA en la cadena lateral a través de un enlace amida.

El copolímero en bloque en otra realización preferida de la presente invención puede prepararse como sigue, por ejemplo. En otras palabras, el copolímero en bloque puede prepararse: formando una cadena de polietilenglicol por polimerización in vivo aniónica usando un iniciador capaz de proporcionar R<sup>1</sup>; introduciendo un grupo amino en el lado del extremo de crecimiento de la cadena de polietilenglicol; polimerizando desde el extremo amino un anhídrido N-carboxílico de un aminoácido protegido tal como β-bencil-L-aspartato o γ-bencil-L-glutamato para formar un segmento de cadena de poliaminoácido; posteriormente sometiendo el poliaminoácido a una reacción con un compuesto amina tal como dietilentriamina (DET) para introducir un resto amina tal como un grupo DET en la cadena lateral del aminoácido por una reacción de intercambio éster-amida; y posteriormente sometiendo un grupo amino del resto amina a una reacción con un grupo carboxilo de un ácido carboxifenilborónico fluorado para introducir un número deseado de grupos FPBA en la cadena lateral a través de un enlace amida. En este proceso, cuando el segmento de cadena de poliaminoácido se forma usando β-bencil-L-aspartato y γ-bencil-L-glutamato en combinación, la posterior reacción de intercambio éster-amida se da preferentemente para β-bencil-L-aspartato. Como resultado, puede obtenerse un copolímero en bloque que incluye un resto de aminoácido que se origina de γ-bencil-L-glutamato como el resto de aminoácido hidrófobo.

Nótese que parte de los restos de éster de aminoácidos pueden someterse a un cambio estructural por ataque nucleófilo de una amina (por ejemplo, formación del anillo imida a través de la desalcoholización de un resto de éster de aminoácido) durante el proceso de síntesis. En la presente invención, el segmento de cadena de poliaminoácido puede incluir además restos que se han sometido a tal cambio estructural. En este caso, los restos que se han sometido al cambio estructural se excluyen del resto de aminoácido catiónico, del resto de aminoácido que contiene grupos PBA sustituidos y del resto de aminoácido hidrófobo. Además, parte de los grupos NH y de los grupos NH<sub>2</sub> en el resto de aminoácido catiónico pueden convertirse en una sal (principalmente un clorhidrato) mediante el uso de un ácido (principalmente ácido clorhídrico) durante el proceso de síntesis. En la presente invención, el segmento de cadena de poliaminoácido puede incluir tal estructura. En otras palabras, parte de los grupos NH y los grupos NH<sub>2</sub> en los grupos Q, R<sup>6a</sup> y R<sup>6b</sup> pueden estar en forma de una sal (por ejemplo, un clorhidrato).

Además, puede sintetizarse un copolímero en bloque que incluye un polímero hidrófilo (polietilenglicol) que tiene un sitio de unión a diana en el extremo: sintetizando un copolímero en bloque como se ha mencionado anteriormente usando polietilenglicol que tiene un sitio de unión a diana en el extremo α o sintetizando un copolímero en bloque como se ha mencionado anteriormente usando polietilenglicol que tiene un grupo funcional capaz de introducir posteriormente un grupo que incluye un sitio de unión a diana en el extremo α; y después introducir el grupo incluyendo el sitio de unión a diana. Puede usarse una diversidad de métodos como métodos de introducción para el grupo incluyendo el sitio de unión a diana. Por ejemplo, cuando un copolímero en bloque que tiene una cadena de polietilenglicol acetalizada en el extremo α y un compuesto que tiene un sitio de unión a diana deseado y una cisteína terminal se mezclan en una solución ácida, el sitio de unión a diana puede darse en el término del lado de la cadena de polietilenglicol.

## [B. Complejo]

El complejo de la presente invención es un complejo del copolímero en bloque descrito en la sección A anterior y un ácido nucleico. El complejo puede ser un PIC de una pluralidad de los copolímeros en bloque y los ácidos nucleicos. Además, el PIC puede tener una forma de una micela de polímero en la que los ácidos nucleicos se encapsulan en la pluralidad de los copolímeros en bloque. Un vehículo relacionado con la técnica tiene un problema en que el complejo se disocia en un medio que tiene una concentración iónica casi la misma que la de una condición

fisiológica. Sin embargo, el complejo de la presente invención es excelente en estabilidad, y de esta manera puede mantener la forma del complejo en el medio, e incluso en un medio que contiene una proteína.

Como se menciona anteriormente, el copolímero en bloque tiene un grupo catiónico en una cadena lateral del aminoácido en el segmento de cadena de poliaminoácido y de esta manera el copolímero en bloque puede formar un complejo estable (por ejemplo, vesícula o asociado) con un ácido nucleico de pequeño peso molecular así como en una condición fisiológica. El ácido nucleico capaz de formar un complejo con el copolímero en bloque significa un poli- u oligonucleótido que incluye nucleótidos formados por una base de purina o de pirimidina, una pentosa, y ácido fosfórico como unidades básicas, y los ejemplos de los mismos pueden incluir ARN oligo- o poli-doble hebra, ADN oligo- o poli-doble hebra y ARN oligo- o poli-mono hebra. Además, también se incluyen el ácido nucleico oligo- o poli-doble hebra y el ácido nucleico oligo- o poli-mono hebra en cada uno de los que existen el ARN y el ADN en un estado mixto en la misma cadena. El nucleótido contenido en el ácido nucleico puede ser de un tipo natural o de un tipo no natural químicamente modificado o puede tener añadido al mismo un grupo amino, un grupo tiol, un compuesto fluorescente o cualquier otra molécula.

Cuando el ácido nucleico es ARN, el ARN incluye ribosa 3'-terminal que tiene un 1,2-cis-diol y por lo tanto puede unirse reversiblemente de forma covalente al copolímero en bloque a través del grupo PBA sustituido así como la interacción electrostática con el grupo catiónico del resto de aminoácido catiónico. Como resultado, se obtiene un complejo excelente en estabilidad. Un complejo tal excelente en estabilidad permite la prevención del reemplazamiento de moléculas de ARN con un nivel en sangre (normalmente, de aproximadamente 4 a 7 mM) de glucosa (que tiene una estructura cis-diol en su molécula) y de esta manera es excelente en estabilidad en sangre. Por lo tanto, cuando se administra el complejo a un cuerpo viviente, la capacidad de retención en sangre puede mejorarse. En particular, cuando el ácido nucleico es ARN de doble cadena, puede formarse en la micela una estructura reticulada que tiene como un sitio de unión la ribosa 3'-terminal de cada cadena. Por lo tanto, puede obtenerse un complejo que es muy excelente en estabilidad. Además, cuando el complejo que incluye el ARN se toma dentro de un endosoma que está en un medio de bajo pH, el grupo PBA sustituido se hidrofobiza para aumentar una reacción hidrófoba, dando como resultado una estabilidad mejorada. Además, después de transferirse desde el endosoma a un citoplasma, el ARN puede liberarse rápidamente reemplazando otra molécula que esté presente en el citoplasma a una concentración relativamente alta y que tenga un 1,2-cis-diol, tal como ATP o ácido ribonucleico.

La longitud de cadena del ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de 4 a 20.000 bases, preferentemente de 10 a 10.000 bases, más preferentemente de 18 a 30 bases.

En consideración de las funciones o acciones, los ejemplos del ácido nucleico pueden incluir ADN de plásmidos, ARNip, micro ARN, ARNhp, un ácido nucleico antisentido, un ácido nucleico señuelo, un aptámero y una ribozima.

La relación del contenido del copolímero en bloque al contenido del ácido nucleico en el complejo de la presente invención puede ajustarse apropiadamente dependiendo de los tipos del copolímero en bloque y del ácido nucleico, de la aplicación del complejo o similares. Cuando el ácido nucleico es ARNip, el complejo de la presente invención tiene una relación N/P de preferentemente 2 o más desde el punto de vista de mejorar la estabilidad en una condición fisiológica, o tiene una relación N/P de preferentemente 200 o menos desde el punto de vista de suprimir la toxicidad debida al polímero. Nótese que la relación N/P significa [concentración del grupo amino de la cadena lateral de poliaminoácido en el copolímero en bloque contenido en el complejo] / [concentración del grupo fosfato en el ácido nucleico]. Además, desde el punto de vista de mejorar la estabilidad en una condición fisiológica, cuando el ácido nucleico es ARNip, el complejo de la presente invención puede tener [el número de las cargas positivas en el segmento de cadena del poliaminoácido] / [el total del número de cargas negativas en el segmento de cadena de poliaminoácido y el número de cargas negativas en el ARNip] a pH 7,4 de, por ejemplo, 1/2 a 20/1, preferentemente 1/1 a 10/1.

El copolímero en bloque puede mantener alta hidrofiliidad seleccionando apropiadamente los tipos de los grupos PBA sustituidos y el número de grupos introducidos, y de esta manera puede prepararse el complejo de la presente invención, por ejemplo, solamente mezclando el copolímero en bloque y el ácido nucleico en una solución acuosa tamponada según sea necesario. En otras palabras, el complejo de la presente invención puede tener ventajas en que no es necesario modificar adicionalmente el término del copolímero en bloque y en que el complejo puede prepararse por un método sencillo.

### Ejemplos

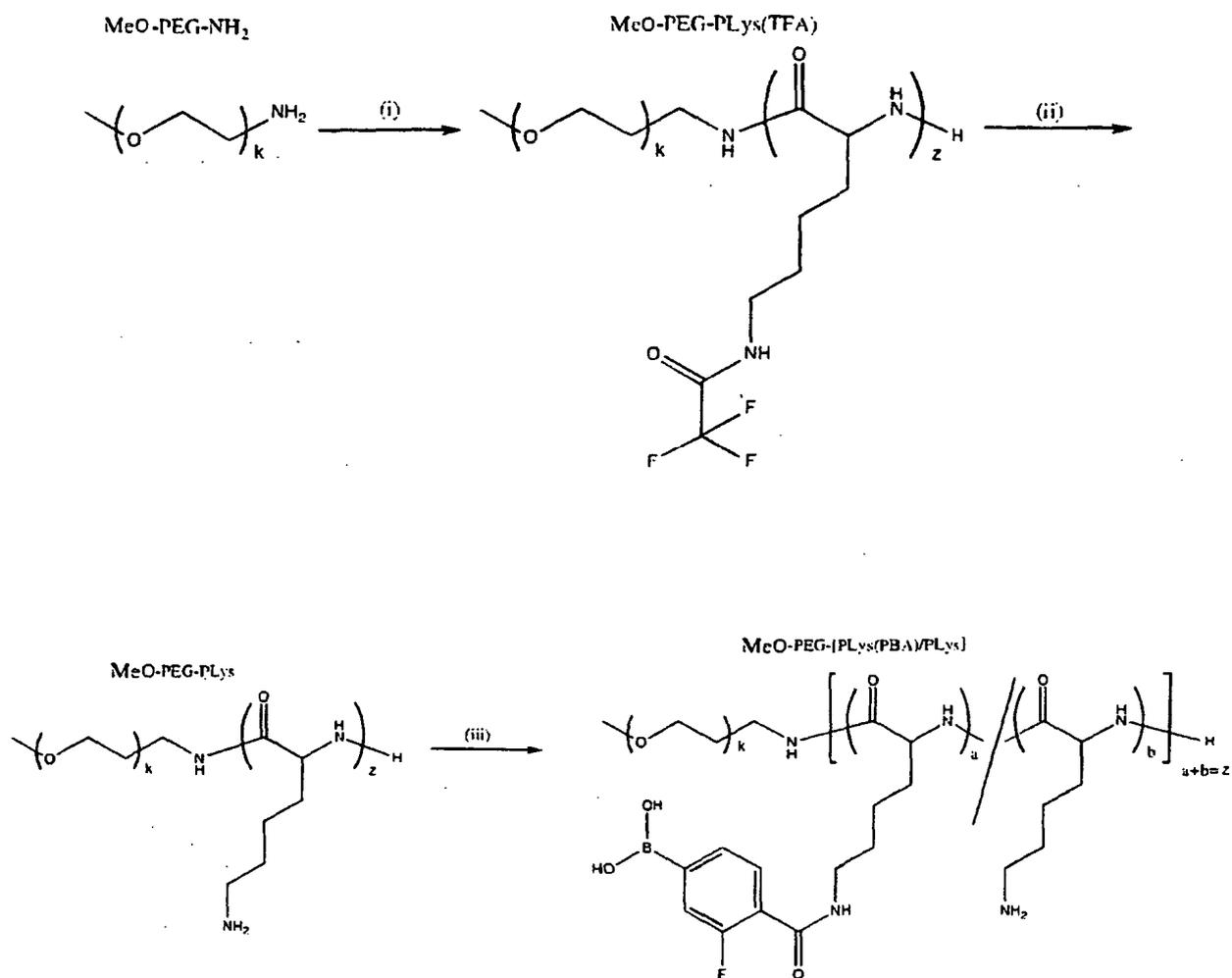
En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe específicamente a modo de Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los Ejemplos a continuación. Nótese que en los Ejemplos a continuación, las estructuras poliméricas se describen en el orden del "peso molecular (kDa) del PEG-el número de restos de aminoácidos que contienen grupos FPBA/el número total de los restos de aminoácidos que constituyen el segmento de la cadena de poliaminoácido". Por ejemplo, cuando el PEG tiene un peso molecular de 10.000 y el segmento de cadena de poliaminoácido es un segmento de cadena de poliaminoácido obtenido introduciendo 5

5 grupos FPBA en polilisina que tiene un grado de polimerización de 40, el polímero se representa como "PEG-PLL 10-5/40". Además, por ejemplo, cuando el PEG tiene un peso molecular de 10.000 y el segmento de cadena de poliaminoácido es polilisina que no tiene grupos FPBA introducidos y tiene un grado de polimerización de 40, el polímero se representa como "PEG-PLL 10-0/40". En este contexto, los números representados son valores medios en el total de los copolímeros en bloque.

[Preparación del copolímero en bloque basado en polilisina]

Se muestra a continuación un esquema A de síntesis para un copolímero en bloque basado en polilisina usado en el siguiente ejemplo experimental. Específicamente, el copolímero en bloque se preparó como se menciona en (1-i) a (1-iii).

[Quím. 9]



10

Esquema A de síntesis

(1-i) Se liofiliza metoxi-PEG-NH<sub>2</sub> a partir de benceno y se disuelve en dimetilformamida (DMF) que contiene tiourea 1 M. A la solución resultante se añade NCA-Lys(TFA) disuelto en DMF que contiene tiourea 1 M y la mezcla se agita durante 3 días a 25 °C para realizar la polimerización. Después de la polimerización, la solución de reacción se añade gota a gota a éter de dietilo y los precipitados resultantes se recogen por filtración y se secan a presión reducida para producir MeO-PEG-PLys(TFA).

15

(1-ii) Se agita MeO-PEG-PLys(TFA) en NaOH ac. 1 N/metanol = 1/10 a 35 °C durante 12 horas y la solución se somete a diálisis (solución externa: agua) y se liofiliza para producir MeO-PEG-PLys.

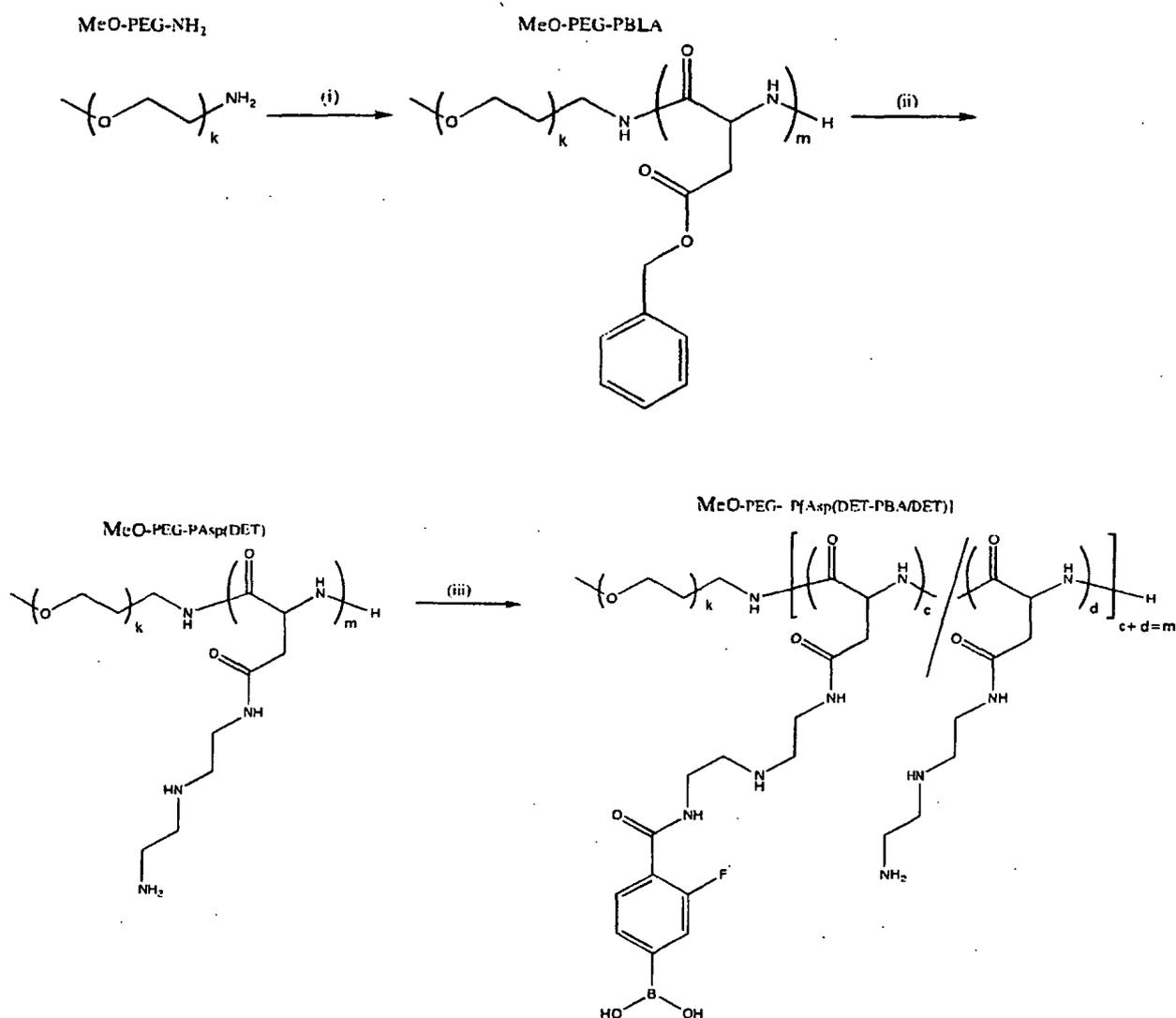
(1-iii) MeO-PEG-PLys y D-manitol en una cantidad de 5 equivalentes con respecto a los grupos de PLys se disuelven en una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM. A la solución resultante se añade ácido 3-fluoro-4-carboxifenilborónico disuelto en metanol, y se añade a la misma un agente condensante DMT-MM. La solución resultante se agita a temperatura ambiente una noche entera, se somete a diálisis (solución externa: agua) y se liofiliza para producir MeO-PEG-[PLys(FPBA)/PLys].

El peso molecular del copolímero en bloque resultante se midió por cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés). En este caso, se usó como fase móvil una solución obtenida disolviendo D-sorbitol en NaHCO<sub>3</sub> 50 mM a 50 mg/ml o más, un tampón fosfato (pH 5 a 7) o un disolvente mezclado de una solución acuosa de NaCl 500 mM que contiene 50 mg/ml de D-sorbitol y metanol (NaCl ac./metanol = 1/4). Además, la cantidad de grupo FPBA introducida se estimó a partir de una relación de integración de la cadena lateral al anillo fenilo por espectros de RMN-<sup>1</sup>H. En este caso, una solución obtenida disolviendo el polímero en D<sub>2</sub>O que contiene una pequeña cantidad de D-sorbitol se usó como una muestra de medición.

[Preparación de copolímero en bloque basado en PAsp(DET)]

Se muestra a continuación un esquema B de síntesis para un copolímero en bloque basado en PAsp(DET) usado en el siguiente ejemplo experimental. Específicamente, el copolímero en bloque se preparó como se menciona en (2-i) a (2-iii).

[Quím. 10]



Esquema B de síntesis

(2-i) Se liofiliza metoxi-PEG-NH<sub>2</sub> a partir de benceno y se disuelve en diclorometano. A la solución resultante se añade NCA-BLA disuelto en DMF/diclorometano = 1/10 y la mezcla se agita durante 3 días a 35 °C para realizar la polimerización. Después de la polimerización, la solución de reacción se añade gota a gota a éter de dietilo y los precipitados resultantes se recogen por filtración y se secan a presión reducida para producir MeO-PEG-PBLA.

5 (2-ii) Se liofiliza MeO-PEG-PBLA a partir de benceno y se disuelve en N-metil-2-pirrolidona (NMP). La solución resultante se añade gota a gota a una solución de dietilentriamina en NMP y la mezcla se agita de 5 a 10 °C durante 1 hora. La mezcla resultante se neutraliza con ácido clorhídrico en enfriamiento con hielo, se somete a diálisis (solución externa: ácido clorhídrico 0,01 N) y se liofiliza para producir MeO-PEG-PAsp(DET).

10 (2-iii) MeO-PEG-PAsp(DET) y D-manitol en una cantidad de 5 equivalentes con respecto a las aminas primarias de PAsp(DET) se disuelven en una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM en enfriamiento con hielo (0 °C). A la solución resultante se añade ácido 3-fluoro-4-carboxifenilborónico disuelto en metanol, y se añade a la misma un agente condensante DMT-MM. La solución resultante se agita durante 6 horas, se somete a diálisis (solución externa: ácido clorhídrico 0,01 N que contiene opcionalmente sorbitol) y se liofiliza para producir MeO-PEG-P[Asp(DET-FPBA/DET)].

15 El peso molecular del copolímero en bloque resultante se midió por cromatografía de permeación en gel (GPC). En este caso, se usó como fase móvil una solución obtenida disolviendo D-sorbitol en tampón fosfato (pH 7,4) a 50 mg/ml. Además, la cantidad de grupo FPBA introducida se estimó a partir de una relación de integración de la cadena lateral al anillo fenilo por espectros de RMN-<sup>1</sup>H. En este caso, una solución obtenida disolviendo el polímero en D<sub>2</sub>O que contiene una pequeña cantidad de NaOD se usó como una muestra de medición.

20 [ARNip]

Las secuencias de ARNip usadas en los siguientes ejemplos experimentales son como sigue. Las marcas tales como Cy3 se introdujeron todas en los extremos 5' de las hebras sentido.

(1) hVEGF-ARNip (ARNip para el factor de crecimiento del endotelio vascular humano):

Hebra sentido: 5'-GAUCUCAUCAGGGUACUCCdTdT-3' (SEQ ID NO: 1)

25 Hebra antisentido: 5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUCdTdT-3' (SEQ ID NO: 2)

(2) Scramble-ARNip (ARNip que tiene una secuencia para uso no terapéutico):

Hebra sentido: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUU-3' (SEQ ID NO: 3)

Hebra antisentido: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAUU-3' (SEQ ID NO: 4)

(3) GL3-ARNip (ARNip para la luciferasa de luciérnaga)

30 Hebra sentido: 5'-CUUACGCUGACUACUUCGAUU-3' (SEQ ID NO: 5)

Hebra antisentido: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGW-3' (SEQ ID NO: 6)

[Relación entre el contenido de grupos FPBA y la estabilidad del complejo]

35 Una diversidad de copolímeros en bloque que tienen diferentes grados de polimerización de aminoácidos y contenidos de grupos FPBA se prepararon como se menciona en las secciones (1-i) a (1-iii) y (2-i) a (2-iii). Nótese que el PEG que tiene un peso molecular (Mw) de 12.000 se usó como metoxi-PEG-NH<sub>2</sub>. Los copolímeros en bloque se mezclaron con ARNip marcado fluorescentemente con Cy3 de tal manera que se logre una relación N/P de 8. Las mezclas resultantes se dejaron reposar en un refrigerador durante 1 a 2 horas y se diluyeron con una solución de suero (NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, FBS al 10 %) de tal manera que se lograra una concentración de ARNip de 50 mM. Las soluciones diluidas resultantes se dejaron reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora y se midió el tiempo de difusión del ARNip con un microscopio de barrido láser confocal (fabricado por Carl Zeiss, nombre del producto "LSM510") (10 x10 veces). La Tabla 1 y la Figura 1 muestran los resultados. Nótese que cuando se llevó a cabo la medición de la misma manera que anteriormente excepto que no se mezcló el ARNip con el copolímero en bloque, el tiempo de difusión (tiempo de difusión del ARNip solo) fue 157,5 μs. Nótese que se usó GL3-ARNip como el ARNip.



Como se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 1, cuando el ARNip se mezcla con los copolímeros en bloque, el tiempo de difusión del ARNip fue más largo que cuando se usó el ARNip solo. Por lo tanto, se descubrió que todos los copolímeros en bloque forman complejos con el ARNip. Además, el tiempo de difusión con los copolímeros en bloque que tienen el grupo FPBA introducido fue más largo que con los copolímeros en bloque libres del grupo FPBA, y de esta manera se descubrió que los copolímeros en bloque que tenían introducido el grupo FPBA forman complejos más estables. De esos, cuando se usaron los copolímeros en bloque que satisfacen la relación de  $[\sqrt{(\text{el número de restos de aminoácidos catiónicos libres del grupo FPBA en el segmento de cadena de poliaminoácido}) + 2\sqrt{(\text{el número de grupos FPBA en el segmento de cadena de poliaminoácido})} \geq 12,0]$ , el tiempo de difusión del ARNip fue 400  $\mu\text{s}$  o más, sugiriendo que se formaron complejos altamente estables.

10 [Ensayo de toxicidad del copolímero en bloque]

15 Se sembraron células A549-Luc en una placa de cultivo de 96 pocillos a 2.500 células/pocillo y se cultivaron en un medio DMEM que contiene suero bovino fetal al 10 % en una incubadora durante 24 horas. El medio se intercambiaba por un medio DMEM fresco que contiene suero bovino fetal al 10 % y se añadió cada uno de los copolímeros en bloque disueltos en solución salina fisiológica a diferentes concentraciones de amina. Posteriormente, las células se cultivaron durante 48 horas, se midió el número de células vivas con "Cell Counting Kit 8" (nombre del producto, fabricado por Dojindo Molecular Technologies, Inc.) y se calculó una tasa de supervivencia celular de las mismas (N=4). La Figura 2 muestra los resultados.

[Ensayo de toxicidad del complejo]

20 Se sembraron células A549-Luc en una placa de cultivo de 96 pocillos a 2.500 células/pocillo y se cultivaron en un medio DMEM que contiene suero bovino fetal al 10 % en una incubadora durante 24 horas. El medio se intercambiaba por un medio DMEM fresco que contiene suero bovino fetal al 10 % y se añadieron los complejos de ARNip y los copolímeros en bloque a diferentes concentraciones de ARNip. Posteriormente, las células se cultivaron durante 48 horas, se midió el número de células vivas con "Cell Counting Kit 8" (nombre del producto, fabricado por Dojindo Molecular Technologies, Inc.) y se calculó una tasa de supervivencia celular de las mismas (N=4). La Figura 3 muestra los resultados. Nótese que los complejos se prepararon: añadiendo los copolímeros en bloque y GL3-ARNip a tampón HEPES 10 mM (pH 7,3) de tal manera que se lograra una relación N/P de 4 y una concentración de ARNip de 80 nM; mezclando lo resultante; dejando reposar la mezcla durante aproximadamente 1 a 2 horas a temperatura ambiente y diluir la mezcla a diferentes concentraciones.

30 Como se muestra en la Figura 2, los grupos tratados con los copolímeros en bloque que tienen el grupo FPBA introducido tenían mayores tasas de supervivencia celular en comparación con el grupo tratado con el copolímero en bloque que no tiene grupo FPBA introducido. Además, como se muestra en la Figura 3, los grupos tratados con los complejos que incluían los copolímeros en bloque que tenían introducido el grupo FPBA tenían mayores tasas de supervivencia celular en comparación con el grupo tratado con el complejo que incluía el copolímero en bloque que no tenía grupo FPBA introducido. Los resultados revelan que la introducción del grupo FPBA no provoca citotoxicidad y que los copolímeros en bloque que tienen el grupo FPBA introducido tienen una biocompatibilidad satisfactoria.

[Evaluación de la estabilidad del pH del complejo]

40 Se disolvieron un copolímero en bloque (PEG-PLL 12-23/43) y GL3-ARNip marcado con Cy3 en un tampón (tampón fosfato o tampón fosfato-citrato) que tiene una diversidad de valores de pH y se mezclaron de tal manera que se lograra una relación N/P de 4 y una concentración de ARNip de 50 nM. Las mezclas resultantes se dejaron reposar durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente y se midió el tiempo de difusión del ARNip con el microscopio de barrido láser confocal (fabricado por Carl Zeiss, nombre del producto "LSM510") (10 s x 10 veces). La Figura 4 muestra los resultados.

45 Como se muestra en la Figura 4, el tiempo de difusión del ARNip fue más largo de 800  $\mu\text{s}$  en un amplio intervalo de pH desde un ambiente corporal (aproximadamente pH 7,4) a un medio ácido (aproximadamente pH 5,5) del interior de un endosoma o similares. De esta manera, se descubrió que el copolímero en bloque de la presente invención era capaz de formar un complejo estable con el ARNip (ARNip-micela de polímero encapsulada) en el intervalo de pH.

[Evaluación de la propiedad de liberación del ARNip del complejo]

50 El copolímero en bloque (PEG-PLL 12-23/43) y el GL3-ARNip marcado con Cy3 se disolvieron separadamente en un tampón HEPES 10 mM (pH 7,3) y se mezclaron para lograr una relación N/P de 4. Las mezclas resultantes se dejaron reposar aproximadamente 1 o 2 horas en un refrigerador y se diluyeron con tampones HEPES 10 mM (pH 7,3) que contenían una diversidad de concentraciones de glucosa, dTMP o UMP para lograr una concentración de ARNip de 50 nM. Las soluciones diluidas resultantes se dejaron reposar todavía a temperatura ambiente durante

aproximadamente 1 hora. Posteriormente, se midió el tiempo de difusión del ARNip con el microscopio de barrido láser confocal (fabricado por Carl Zeiss, nombre del producto "LSM510") (10 s x 10 veces). La Figura 5 muestra los resultados.

5 Como se muestra en la Figura 5, el tiempo de difusión del ARNip a concentraciones de glucosa casi las mismas que aquellas en sangre (normalmente, de aproximadamente 4 a 7 mM) es más largo de 800  $\mu$ s, que muestra que el copolímero en bloque de la presente invención puede formar un complejo estable con el ARNip (ARNip-micela de polímero encapsulada) en sangre. Además, cuando las concentraciones de glucosa son mayores que en sangre, el tiempo de difusión se vuelve gradualmente más corto, sugiriendo que las micelas colapsan a tales concentraciones para liberar rápidamente el ARNip. Nótese que tal colapso de las micelas se estima que se da por reemplazamiento de moléculas de ARN unidas a los grupos FPBA a través de las estructuras 1,2-diol en las micelas con glucosa que tienen la estructura 1,2-diol como las moléculas de ARN.

15 Similarmente, se descubre que la forma de la micela puede mantenerse en presencia de UMO que tiene la estructura 1,2-diol a concentraciones de UMP bajas, pero las micelas colapsan a concentraciones de UMP mayores de 1 mM por reemplazamiento de las moléculas de ARN por UMP para liberar rápidamente el ARNip. Por otro lado, la forma de las micelas puede mantenerse de forma estable en presencia de dTMP que tiene una estructura similar al UMP pero que no tiene estructura 1,2-diol, incluso a concentraciones de dTMP mayores de 10 mM. Esto es probablemente debido a que no se da el reemplazamiento de las moléculas de ARN.

[Evaluación de la capacidad de toma intracelular del complejo]

20 Se sembraron células A549-Luc en una placa de 48 pocillos a 10.000 células/pocillo y se cultivaron durante 24 horas en una incubadora con un medio DMEM que contiene suero bovino fetal al 10 %. El medio se intercambió por un medio DMEM fresco que contiene suero bovino fetal al 10 % y se añadió al medio ARNip marcado con Cy3 o un complejo del ARNip y un copolímero en bloque de tal manera que la concentración de ARNip fue 100 nM/pocillo. Después de haberlas cultivado en una incubadora a 37 °C durante 5 horas o 9 horas, las células se lavaron tres veces con 1 ml de un tampón PBS y se separaron de la placa con una solución de tripsina-EDTA. Las células separadas se sometieron a análisis de histogramas usando un citómetro de flujo (fabricado por BD, LSRII) en el que se ajustó el filtro Cy3. De esta manera, se evaluó la cantidad de ARNip tomado en las células (N=4). Nótese que se usó ARNip-Cy3 como el ARNip. La Figura 6 muestra un gráfico que muestra la cantidad de ARNip tomado en las células. Nótese que el complejo se preparó añadiendo cada copolímero en bloque y el ARNip a un tampón HEPES 10 mM (pH 7,3) de tal manera que se lograra una relación N/P de 8 y una concentración de ARNip de 4  $\mu$ M, mezclando lo resultante y dejando reposar la mezcla durante aproximadamente 1 a 2 horas a temperatura ambiente.

30 Como se muestra en la Figura 6, las cantidades de ARNip tomadas en el caso donde el ARNip se añadió como un complejo con el copolímero en bloque que tiene el grupo FPBA introducido se mejoraron dramáticamente en comparación con aquellas en el caso donde se añadió el ARNip solo y en el caso donde el ARNip se añadió como un complejo con el copolímero en bloque que no tenía grupo FPBA introducido.

35 [Evaluación de la capacidad de retención en sangre del complejo]

40 El copolímero en bloque (PEG-PLL 12-23/43) y el Cy5-GL3-ARNip se añadieron a un tampón HEPES 10 mM (pH 7,3) para lograr una relación N/P de 8 y una concentración del ARNip de 7,5  $\mu$ M, y lo resultante se mezcló y se dejó reposar aproximadamente 1 o 2 horas a temperatura ambiente para preparar una solución del complejo. La solución del complejo o una solución del ARNip (tampón HEPES 10 mM) se administró a las venas de las colas de ratones (hembra Balb/Cnude, de 6 semanas, N=4) de tal manera que la dosis fue 20  $\mu$ g del ARNip y se determinó la cantidad del ARNip que quedaba en sangre con el tiempo. La Figura 7 muestra los resultados.

45 Como se muestra en la Figura 7, cuando se administró solo el ARNip, sólo aproximadamente el 10 % del ARNip quedaba 10 minutos después de la administración y casi no quedaba ARNip después de un lapso de 1 hora. Por otro lado, cuando se administró el ARNip como el complejo, el 40 % o más del ARNip se mantuvo 1 hora después de la administración, y el 10 % o más del ARNip se mantuvo incluso después de un lapso de 3 horas. Esto sugiere que el complejo que incluye el copolímero en bloque de la presente invención y el ARNip (micela encapsulada de ARNip) es muy excelente en su capacidad de retención en sangre.

[Evaluación de una actividad anticancerígena del complejo]

(1) Preparación del copolímero en bloque que contiene grupos FPBA

50 Se obtuvo un copolímero en bloque Ace-PEG-PAsp (DET) 12-62/75 mediante un esquema similar al esquema B. Específicamente, Ace-PEG-PBLA (12-110) que tenía un grupo acetal en el término del lado PEG se sometió a aminólisis con DET para proporcionar Ace-PEG-PAsp (DET) (12-90). Posteriormente, se llevó a cabo una diálisis frente a una solución de NaCl para convertir el acetato que servía como contraión en cloruro y se condensó ácido 4-

carboxi-3-fluorofenilborónico usando un agente condensante (DMT-MM) para producir un copolímero en bloque Ace-PEG-PAsp (DET) 12-62/75.

(2) Preparación del copolímero en bloque con RGDc introducido

5 Posteriormente, el péptido RGDc ((Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys) cíclico) se mezcló con DTT en una cantidad de 5 equivalentes con respecto al grupo acetal durante 1 hora y la mezcla resultante y el copolímero en bloque se mezclaron y el pH se ajustó a 2. La mezcla se agitó durante 1 hora y el pH se ajustó a 5 con acetato sódico 2 M y NaOH. Después de eso, se añadió agua a la misma de tal manera que se lograra una concentración del polímero de 20 mg/ml y la mezcla se agitó durante toda la noche. Se llevó a cabo una diálisis frente agua pura para retirar los productos sin reaccionar y las materias no deseadas, seguido de liofilización para producir un copolímero en bloque 10 RGDc-PEG-PAsp(DET) 12-62/75 que tiene RGDc introducido en el término de la cadena de PEG. Nótese que la reacción y la diálisis se llevaron a cabo a 4 °C (refrigerador).

(3) Preparación del complejo

15 Los copolímeros en bloque se disolvieron en un tampón HEPES 10 mM de tal manera que se logre una concentración de 10 mg/ml. Se mezclaron 12,18 µl de las soluciones de polímero, 75 µl de ARNip (15 µM en un tampón HEPES 10 mM) y 7,81 µl de un tampón HEPES 10 mM y las mezclas se dejaron reposar durante toda la noche. Varias horas antes de la administración, se añadieron 5 µl de NaCl 3 M en un tampón HEPES 10 mM a las mezclas y la concentración de NaCl se ajustó a 150 mM (volumen total: 100 µl). De esta manera, se obtuvieron los complejos (micelas de polímero con ARNip encapsuladas). La Tabla 2 muestra combinaciones de ARNip y los copolímeros en bloque y las relaciones de mezcla en los complejos preparados.

20 [Tabla 2]

| Complejo    | Copolímero en bloque        | ARNip          | Relación de mezcla*1 | Diámetro medio |
|-------------|-----------------------------|----------------|----------------------|----------------|
| (+)hVEGF    | RGDc-PEG-PAsp(DET) 12-62/75 | ARNip-hVEGF    | 5                    | -              |
| (-)hVEGF    | Ace-PEG-PAsp(DET) 12-62/75  | ARNip-hVEGF    | 5                    | 39,95 nm       |
| (+)Scramble | RGDc-PEG-PAsp(DET) 12-62/75 | ARNip-Scramble | 5                    | -              |

\*1: Relación del número de cargas positivas del segmento de cadena de poliaminoácido al número total de cargas negativas del segmento de cadena del poliaminoácido y número de cargas negativas del ARNip (cargas positivas/total de cargas negativas) a pH 7,4

(4) Evaluación de la actividad anticancerígena

25 Se obtuvieron ratones de 6 semanas (hembras Balb/C desnudas, N=4) y se alimentaron durante 1 semana y células Hela-luc ajustadas a  $5,0 \times 10^{17}$  células/ml se inyectaron subcutáneamente en una cantidad de 100 µl por ratón. Después de eso, los ratones se alimentaron adicionalmente durante 4 días y se inició el tratamiento (es decir, la administración de un complejo). Específicamente, el complejo preparado en (3) anterior se administró a las venas de la cola de los ratones un día si un día no hasta el día 6 (es decir, cuando la fecha de inicio de la administración se definió como día 0, el complejo se administró cuatro veces en total el día 0, el día 2, el día 4 y el día 6). El ARNip se administró a una dosis de 15 µg/100 µl. A un grupo control, se administró una solución de HEPES a una dosis de 30 100 µl. La Figura 8 muestra una relación entre un valor relativo de un volumen tumoral a un volumen tumoral en la fecha de inicio de la administración y el número de días transcurridos después de la administración.

35 Como se muestra en la Figura 8, en el grupo al que se administró el complejo (-)hVEGF usando como un vehículo el copolímero en bloque de la presente invención en el que el PEG terminal no tenía RGDc introducido, el crecimiento del tumor se suprimió claramente en comparación con el grupo control y el grupo al que se administró el complejo (+) Scramble. Esto revela que el ARNip se mantuvo de forma estable en sangre por el copolímero en bloque y mostró la capacidad de interferencia del ARN. Además, el grupo al que se administró el complejo (+)hVEGF usando como un vehículo el copolímero en bloque en el que el PEG terminal tenía RGDc introducido, el crecimiento del tumor se suprimió significativamente en comparación con el grupo control y con el grupo al que se administró el complejo (+) Scramble. Esto revela que el complejo es excelente en estabilidad en sangre y se toma dentro de los 40 tejidos tumorales con una alta velocidad de transferencia para exhibir eficazmente el efecto de interferencia del ARN.

Aplicabilidad industrial

El copolímero en bloque de la presente invención puede aplicarse adecuadamente en el campo de DDS.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NanoVehículo de la Universidad de Tokio, Corporación de la Universidad Nacional, Universidad Médica y Dental de Tokio Co., Ltd.
- <120> Copolímero en bloque en el que se introduce un grupo ácido fenilborónico y uso del mismo
- 5 <130> T 3361EU - py
- <140> EP12850688  
<141> 19.11.2012
- <150> US61/561,022  
<151> 17.11.2011
- 10 <160> 6
- <170> Patente en la versión 3.5
- <210> 1  
<211> 21  
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> hebra sentido del ARNip para el factor de crecimiento del endotelio vascular humano incluyendo el dT terminal
- <400> 1  
gaucucauca gguacucct t 21
- <210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>  
<223> hebra antisentido del ARNip para el factor de crecimiento del endotelio vascular humano incluyendo el dT terminal
- <400> 2  
ggaguaccu gaugagauct t 21
- 30 <210> 3  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>
- 35 <223> hebra sentido del ARNip no terapéutico
- <400> 3  
uucuccgaac gugucacguu u 21
- <210> 4  
<211> 21  
<212> ARN
- 40 <220>  
<223> hebra sentido del ARNip no terapéutico
- <400> 3  
uucuccgaac gugucacguu u 21

## ES 2 603 632 T3

- <210> 4  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
<223> hebra antisentido del ARNip no terapéutico
- <400> 4  
acgugacacg uucggagaau u 21
- 10 <210> 5  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> hebra sentido del ARNip para la luciferasa de luciérnaga
- 15 <400> 5  
cuuacgcuga cuacuucgau u 21
- <210> 6  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> hebra antisentido del ARNip para la luciferasa de luciérnaga
- <400> 6  
ucgaaguacu cagcguaagu u 21
- 25

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un complejo de:

un copolímero en bloque que incluye un segmento de cadena de poliaminoácido y un segmento de cadena de polímero hidrófilo; y un ácido nucleico,

5 en el que:

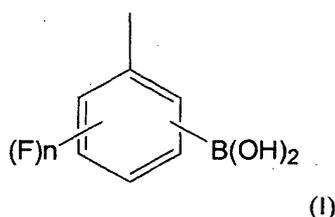
el segmento de cadena del poliaminoácido incluye un resto de aminoácido que tiene un grupo catiónico en una cadena lateral y un resto de aminoácido que tiene un grupo ácido fenilborónico en una cadena lateral, teniendo el grupo ácido fenilborónico sustituido un anillo fenilo en el que al menos un átomo de hidrógeno se sustituye con un halógeno o un grupo nitro;

10 el grupo ácido fenilborónico sustituido se introduce en la cadena lateral del resto de aminoácido a través de un enlace amida, un enlace carbamoilo, un enlace alquilo, un enlace éter, un enlace éster, un enlace tioéster, un enlace tioéter, un enlace sulfonamida, un enlace uretano, un enlace sulfonilo, un enlace timina, un enlace urea o un enlace tiourea; el grupo ácido fenilborónico sustituido tiene un pKa de menos de 7,5; y

el ácido nucleico forma un enlace covalente reversible con el grupo ácido fenilborónico sustituido.

15 2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el grupo ácido fenilborónico sustituido comprende un grupo ácido fenilborónico fluorado representado por la siguiente fórmula (I):

[Quím. 1]



en la fórmula (I): Las F están presentes independientemente; n representa 1, 2, 3 o 4; y cuando n representa 1, F y B(OH)<sub>2</sub> pueden introducirse en una cualquiera de las posiciones orto, meta y para.

20 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el grupo catiónico comprende un grupo amino.

4. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el resto de aminoácido que tiene un grupo catiónico en una cadena lateral es un resto lisina o un resto de aminoácido obtenido sustituyendo un resto -OH en un grupo carboxilo (-C(=O)OH) de un resto de aminoácido por uno cualquiera de los grupos de las siguientes fórmulas (i) a (iv):

- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-[NH(CH<sub>2</sub>)<sub>q1</sub>]<sub>r1</sub>NH<sub>2</sub> (i);

- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q2</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (ii);

- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p3</sub>-N{[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q3</sub>-NH<sub>2</sub>][- (CH<sub>2</sub>)<sub>q4</sub>-NH-]<sub>r2</sub>H} (iii); y

- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p4</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q5</sub>-N[-(CH<sub>2</sub>)<sub>q6</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>] (iv)

30 en las fórmulas (i) a (iv): p<sub>1</sub> a p<sub>4</sub>, q<sub>1</sub> a q<sub>6</sub> y r<sub>1</sub> y r<sub>2</sub> cada uno independientemente representa un número entero de 1 a 5.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que un número de restos de aminoácidos que tienen un grupo catiónico y están libres del grupo ácido fenilborónico sustituido y un número de los grupos de ácido fenilborónico sustituidos en el segmento de cadena de poliaminoácido satisface la siguiente relación.

35

[Mat. 1]

$$\sqrt{\text{Número de restos de aminoácidos catiónicos libres de grupo ácido fenilborónico sustituido en el segmento de cadena de poliaminoácido}} + 2\sqrt{\text{Número de grupos ácido fenilborónico sustituidos en el segmento de cadena de poliaminoácido}} \geq 12,0$$

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el segmento de cadena de poliaminoácido incluye además un resto de aminoácido que tiene un grupo hidrófobo en una cadena lateral.

5 7. Un copolímero en bloque que comprende:

un segmento de cadena de poliaminoácido; y

un segmento de cadena de polímero hidrófilo;

en el que:

10 el segmento de cadena del poliaminoácido incluye un resto de aminoácido que tiene un grupo catiónico en una cadena lateral y un resto de aminoácido que tiene un grupo ácido fenilborónico en una cadena lateral, teniendo el grupo ácido fenilborónico sustituido al menos un átomo de hidrógeno de un anillo fenilo sustituido con un halógeno o un grupo nitro;

15 el grupo ácido fenilborónico sustituido se introduce en la cadena lateral del resto de aminoácido a través de un enlace amida, un enlace carbamilo, un enlace alquilo, un enlace éter, un enlace éster, un enlace tioéster, un enlace tioéter, un enlace sulfonamida, un enlace uretano, un enlace sulfonilo, un enlace timina, un enlace urea o un enlace tiourea; el grupo ácido fenilborónico sustituido tiene un pKa de menos de 7,5; y

un número de restos de aminoácidos que tienen un grupo catiónico y están libres del grupo ácido fenilborónico sustituido y n número de los grupos ácido fenilborónico sustituidos en el segmento de cadena del poliaminoácido satisfacen la siguiente relación.

[Mat. 2]

$$\sqrt{\text{Número de restos de aminoácidos catiónicos libres de grupo ácido fenilborónico sustituido en el segmento de cadena de poliaminoácido}} + 2\sqrt{\text{Número de grupos ácido fenilborónico sustituidos en el segmento de cadena de poliaminoácido}} \geq 12,0$$

20

FIG. 1

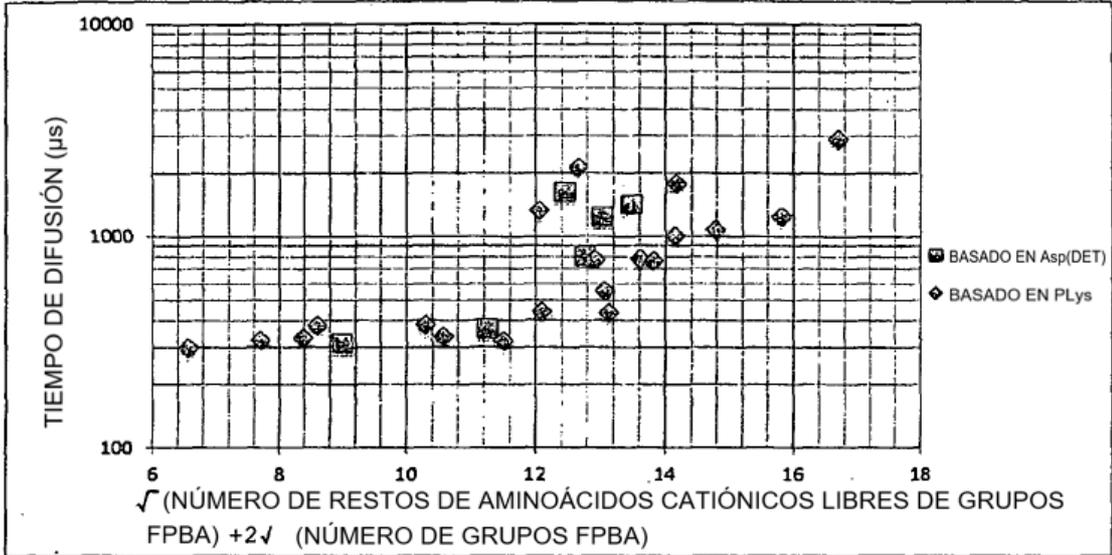


FIG. 2

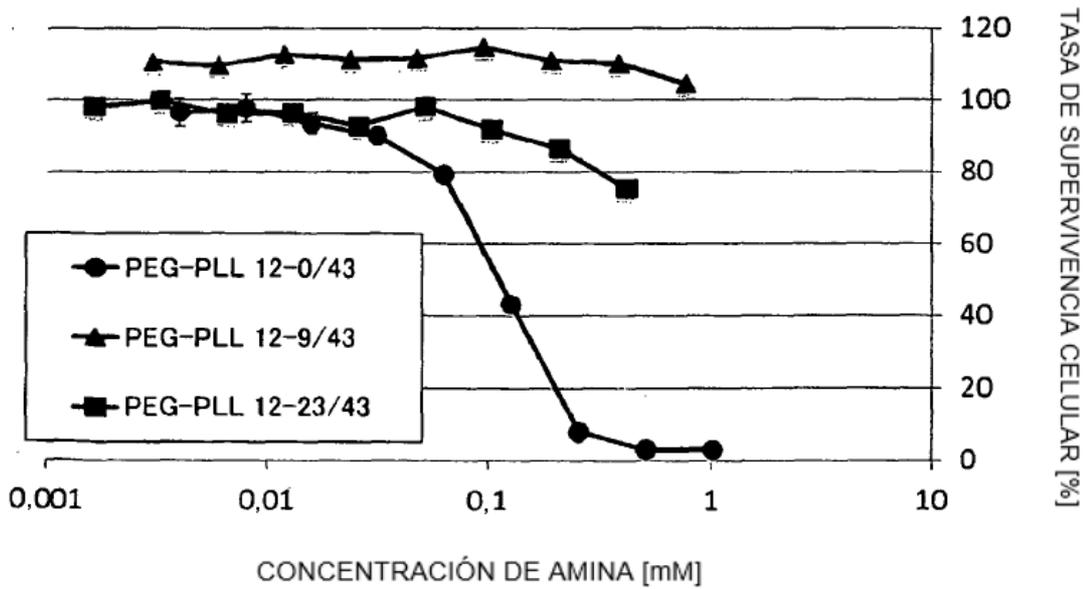


FIG. 3

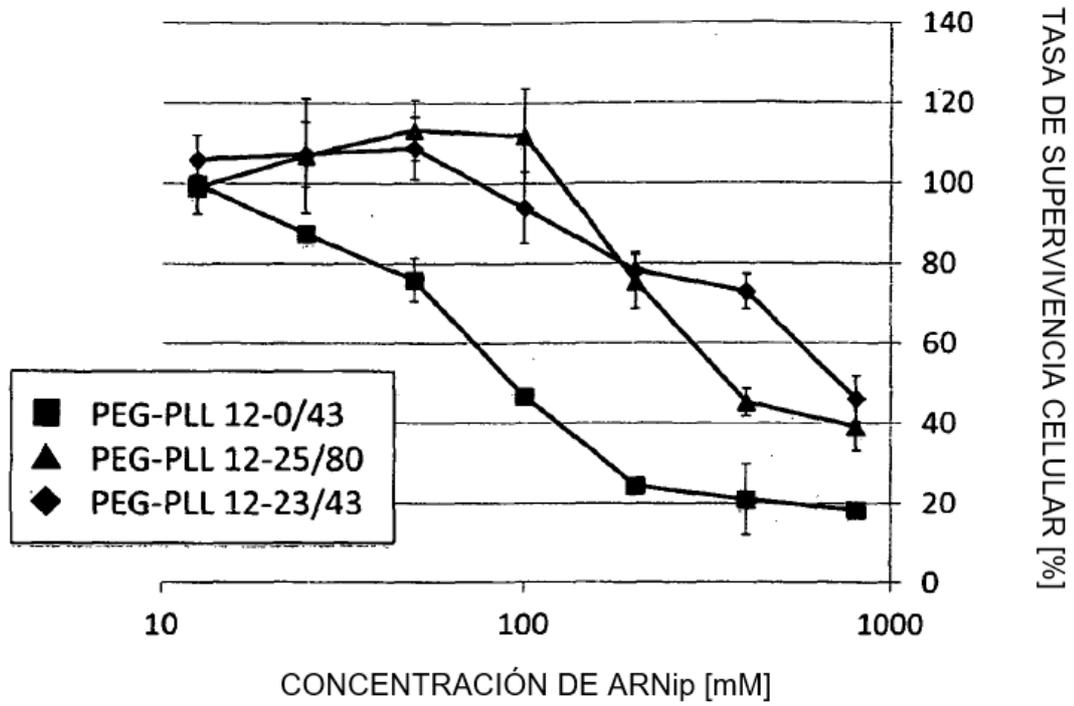


FIG. 4

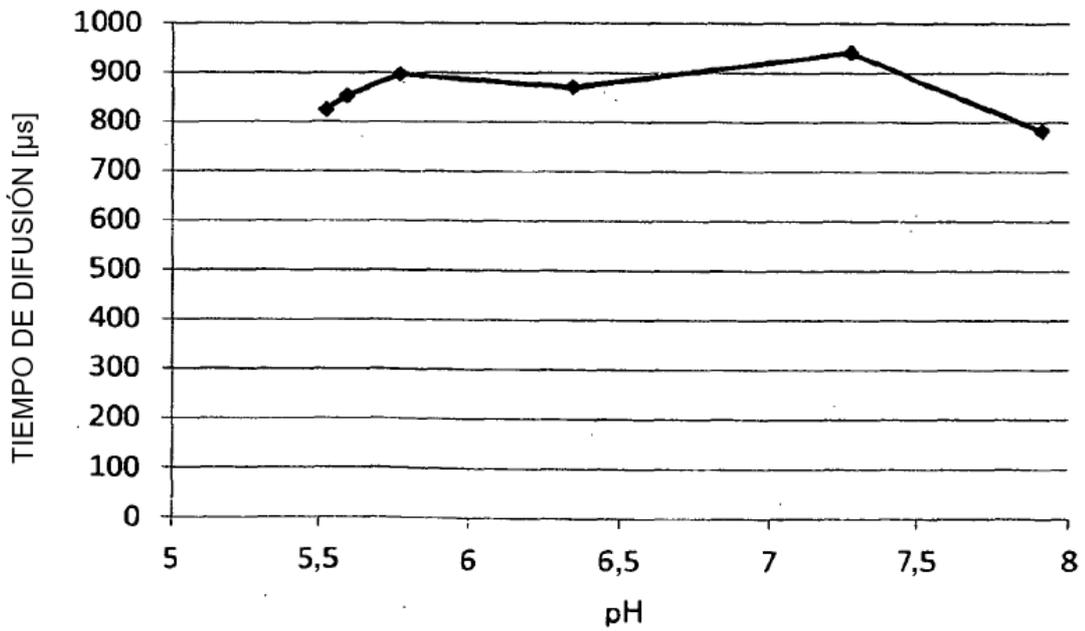


FIG. 5

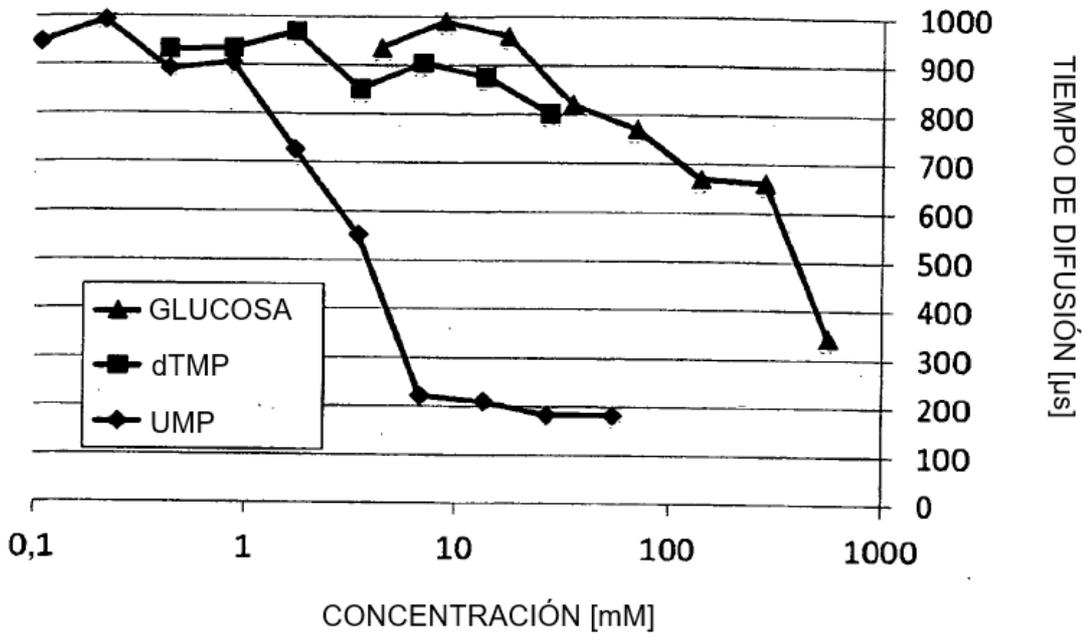


FIG. 6

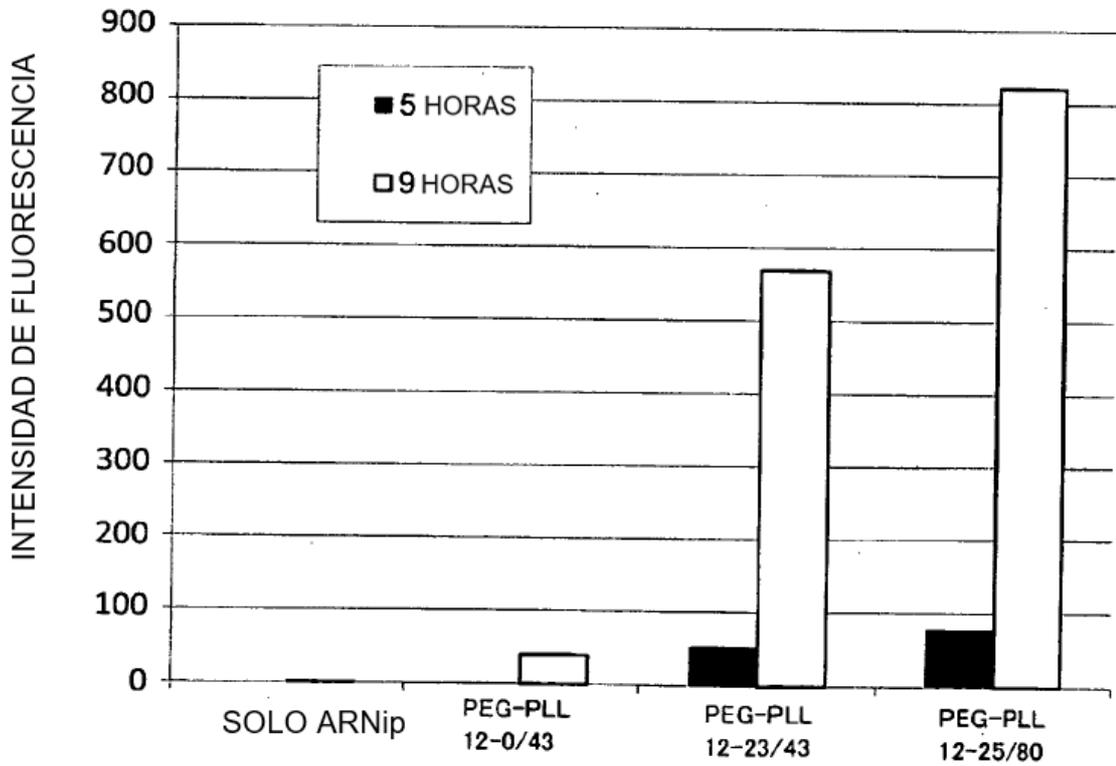


FIG. 7

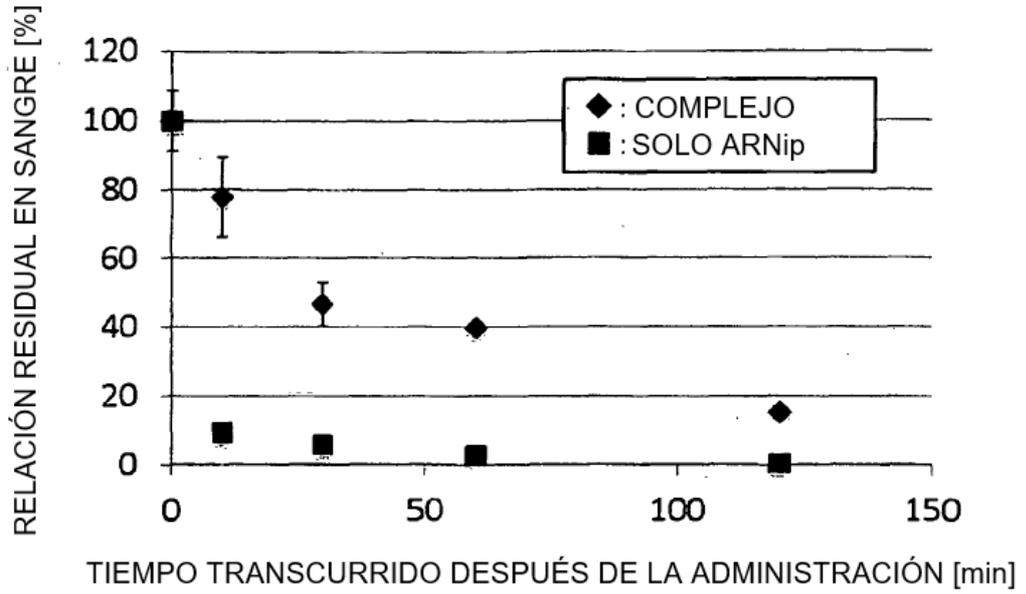


FIG. 8

