

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 615**

51 Int. Cl.:

A61K 9/10 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2010 PCT/JP2010/064816**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11025036**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2010 E 10812082 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2474306**

54 Título: **Composición en partículas y composición medicinal que comprende la misma**

30 Prioridad:

31.08.2009 JP 2009200681

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KATO, YASUKI y
 ISHII, ATSUSHI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 614 615 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 en partículas y composición medicinal que comprende la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición en partículas (tal como una micela polimérica) aplicable para un portador de un sistema de suministro de fármacos (DDS), y a una composición farmacéutica (tal como una formulación de micelas polimérica) que contiene un fármaco encapsulado en la composición en partículas.

Antecedentes de la técnica

10 Los productos farmacéuticos basados en biotecnología, que utilizan biomacromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos, son más susceptibles a la degradación enzimática o a la eliminación inmune, en comparación con los productos farmacéuticos convencionales basados en compuestos de bajo peso molecular. Los Documentos de Patente 1 a 4 describen un DDS que contiene una biomacromolécula dentro de un liposoma hecho de una membrana bicapa lipídica, que tiene la intención de mejorar la estabilidad in vivo de productos farmacéuticos basados en biotecnología.

Referencias de la técnica anterior

Documentos de Patente

15 Documento de Patente 1: WO2001/034115

Documento de Patente 2: WO1998/5863

Documento de Patente 3: WO2005/09238

Documento de Patente 4: JP2001-504093W

20 El Documento de Patente 5: WO2006/002538 A1 describe moléculas de ARNsi y métodos de uso de tales moléculas de ARNsi para modular una respuesta inmune y silenciar la expresión de un gen diana.

El Documento de Patente 6: JP2006-056864 A describe liposomas estables modificados con polímeros in vivo para llevar compuestos hidrófobos e hidrófilos.

El Documento de Patente 7: WO2005/00719 describe composiciones y métodos para silenciar la expresión génica entregando partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden moléculas de ARNsi a una célula.

25 Divulgación de la invención

Problemas que se van a resolver por la invención

30 Los DDS convencionales descritos en los Documentos de Patente 1 a 3, en los que el fármaco biomacromolécula está protegido con una membrana bicapa lipídica, son superiores en la estabilidad in vivo del fármaco, pero son inferiores en la capacidad de liberación del fármaco desde el portador. Además, debido al gran tamaño de partícula y también debido a la carga eléctrica del lípido que constituye la membrana bicapa lipídica, es probable que los DDS convencionales sean capturados por el sistema reticuloendotelial, tales como los pulmones, el hígado y el bazo, y por lo tanto eliminado de la sangre antes de alcanzar el objetivo de administración. El DDS descrito en el Documento de Patente 4 es un liposoma "sigiloso" y se evita que sea capturado por el sistema reticuloendotelial, pero tiende a tener dificultades para liberar el fármaco del portador.

35 Se puede utilizar una micela polimérica formada con una unidad de copolímero de bloques que tiene un segmento de la cadena de polímeros hidrófobos y un segmento de la cadena de polímeros hidrófilos como un portador del DDS, y el DDS resultante puede ser mucho más bajo en tamaño de partícula (por ejemplo, el tamaño de partícula promedio puede ser 100 nm o menos) que los DDS convencionales utilizando un liposoma. Sin embargo, dicho DDS que utiliza una micela polimérica como portador todavía tiene dificultad, en algunos casos, en suministrar el fármaco al objetivo de administración, debido a la falta de suficiente fuerza de encapsulación para mantener la biomacromolécula dentro de la partícula del DDS como se muestra en los ejemplos comparativos, que se explicarán más adelante. Además, dicho DDS puede causar a veces que el fármaco se desenganche del portador durante el período de almacenamiento después de la producción.

Medios para resolver los problemas

45 La presente invención proporciona una composición en partículas que contiene: una unidad de copolímero de bloques que tiene un segmento de la cadena de polímeros hidrófobos y un segmento de la cadena de polímeros hidrófilos,

estando una pluralidad de unidades de copolímero de bloques dispuesta radialmente con los segmentos de la cadena de polímeros hidrófobos radialmente dentro y los segmentos de la cadena de polímeros hidrófilos radialmente afuera; y un lípido cargado que lleva una carga opuesta a la carga de un fármaco que se va a encapsular en la composición de modo que el fármaco se retenga dentro de la partícula por medio de una unión electrostática con el lípido cargado, que está atrayendo el lípido cargado al segmento de la cadena de polímeros hidrófobos, con lo cual se evita que la superficie externa de la partícula se cargue para atraer una sustancia que tiene una carga opuesta a la carga del lípido cargado en donde la composición en partículas se aplica a un fármaco seleccionado del grupo que consiste en proteínas y ácidos nucleicos y en donde los lípidos cargados no están dispuestos contiguamente entre sí a lo largo de la circunferencia de la composición en partículas, sino que están dispuestos para intervenir entre las unidades de copolímero de bloques adyacentes a lo largo de la circunferencia de la composición en partículas, con lo cual los lípidos cargados adyacentes a lo largo de la circunferencia de la composición en partículas se separan por las unidades de copolímero de bloques y se les impide estar en contacto entre sí.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene la composición en partículas y un fármaco que lleva una carga opuesta a la carga del lípido cargado y que está encapsulado en la composición en partículas. La invención es como se describe en las reivindicaciones.

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un portador de fármaco que tiene una estabilidad de encapsulación de fármaco mejorada y se evita la adhesión de una biomolécula sobre la superficie del portador, lo que puede obstruir la administración de un fármaco a un objetivo deseado, siendo apropiado para DDS, así como una composición farmacéutica utilizando el portador del fármaco. El portador del fármaco y la composición farmacéutica pueden administrar el fármaco con mayor fiabilidad que los DDS convencionales.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1(a) a 1(c) ilustran ejemplos estructurales para una composición en partículas y una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención;

La figura 2 es un gráfico que muestra la relación entre los valores absolutos de los potenciales zeta de las composiciones en partículas medidas en la evaluación 1b y la agregabilidad de las composiciones en partículas en la sangre medida en la evaluación 1c;

La figura 3 es un gráfico que muestra las intensidades de fluorescencia de la albúmina-FITC medidas en la evaluación 2b;

La figura 4 ilustra los resultados de la electroforesis en la evaluación 5a;

La figura 5 indica gráficas para explicar las actividades anticancerígenas de las composiciones en partículas determinadas en la evaluación 5c;

La figura 6 es un gráfico para explicar la agregabilidad de composiciones en partículas en suero determinada en la evaluación 5d;

La figura 7 es un gráfico que muestra la relación entre los valores absolutos de los potenciales zeta de las composiciones en partículas medidas en la evaluación 5b y la agregabilidad de las composiciones en partículas en la sangre medidas en la evaluación 5d; y

La figura 8 indica gráficas para explicar la migración de fármacos a órganos determinados en la evaluación 5f.

Descripción de las realizaciones

La figura 1(a) ilustra un ejemplo estructural de una composición en partículas de acuerdo con la presente invención (en adelante también denominada "composición en partículas"), y la figura 1(b) es una vista agrandada parcial de la misma. La composición 1 en partículas contiene una unidad 2 de copolímero de bloques y un lípido 3 cargado. La unidad 2 de copolímero de bloques tiene un segmento 2a de la cadena de polímeros hidrófilos y un segmento 2b de la cadena de polímeros hidrófobo. Las unidades 2 de copolímero de bloques están dispuestas radialmente en la composición 1 en partículas con los segmentos 2b de la cadena de polímeros hidrófobos radialmente dentro y los segmentos 2a de la cadena de polímeros hidrófilos radialmente afuera. El lípido 3 cargado lleva una carga opuesta a la carga de un fármaco que se va a encapsular, y está siendo atraído a los segmentos 2b de la cadena de polímeros hidrófobos. La figura 1(c) ilustra un ejemplo estructural de una composición farmacéutica en partículas de acuerdo con la presente invención (en lo sucesivo también denominada como "composición farmacéutica"). Una composición 1' farmacéutica incluye una composición 1 en partículas y un fármaco 4, que lleva una carga opuesta a la carga de un lípido 3 cargado y es retenida dentro de la composición 1 en partículas por unión electrostática con el lípido 3 cargado.

El término "lípidos cargados" como se utiliza en este documento significa ya sea un lípido aniónico, que tiene más cargas negativas que cargas positivas en un medio acuoso, o un lípido catiónico, que tiene más cargas positivas que cargas negativas en un medio acuoso. Los lípidos anfóteros, que tienen tanto grupos catiónicos como grupos aniónicos, se juzgan por los criterios antes mencionados.

5 El lípido 3 cargado retiene el fármaco 4 para ser encapsulado dentro de la composición 1 en partículas por unión electrostática. El lípido 3 cargado sólo necesita tener una carga eléctrica opuesta a la carga del fármaco 4 para ser encapsulado al menos en un entorno de almacenamiento de la composición 1' farmacéutica formada a partir de la composición 1 en partículas. Esto permitirá que el fármaco 4 sea retenido de forma más segura en la composición 1 en partículas durante el período de almacenamiento después de la producción. Preferiblemente, el lípido 3 cargado y el fármaco 4 tienen cargas opuestas entre sí incluso en ambientes fisiológicos, tales como en sangre (por ejemplo, pH 10 7.4). Esto permitirá una prevención más segura del fármaco 4 de desprenderse de la composición 1 en partículas durante el transporte al objetivo de administración.

Los lípidos 3 cargados se están atrayendo hacia los segmentos 2b de la cadena de polímeros hidrófobos mediante el siguiente mecanismo. La composición 1 en partículas se forma mediante un método que incluye la etapa de suspender las unidades 2 de copolímero de bloques y los lípidos 3 cargados en una solución acuosa. Los segmentos 2b de la cadena de polímeros hidrófobos de las unidades 2 de copolímero de bloques no pueden dispersarse, pero forman un agregado, en la solución acuosa debido a su hidrofobicidad, mientras que los segmentos 2a de la cadena de polímeros hidrófilos pueden dispersarse y moverse libremente en la solución acuosa. De este modo, las unidades 2 de copolímero de bloques están dispuestas radialmente en la solución acuosa, con los segmentos 2b de la cadena de polímeros hidrófobos radialmente dentro y los segmentos 2a de la cadena de polímeros hidrófilos radialmente afuera. Los lípidos 3 cargados son atraídos hacia los segmentos 2b de la cadena de polímeros hidrófobos, puesto que son altamente hidrófobos y tienen una mayor afinidad para los segmentos 2b de la cadena de polímeros hidrófobos que para el agua o los segmentos hidrófilos 2a de la cadena de polímeros. De este modo, los lípidos 3 cargados están dispuestos alejándose de la superficie externa de la composición 1 en partículas. De este modo, se evita que las superficies 15 externas de la composición 1 en partículas y la composición 1' farmacéutica se carguen para atraer una sustancia que tiene una carga opuesta a la de los lípidos 3 cargados (por ejemplo, proteínas de la sangre).

Cuando los lípidos 3 cargados y las unidades 2 de copolímero de bloques están suspendidos en la solución acuosa, forman partículas en estado de mezcla, de modo que los lípidos 3 cargados adyacentes entre sí a lo largo de la circunferencia de la composición 1 en partículas no son contiguos entre sí, pero intervienen entre las unidades 2 de copolímero de bloques adyacentes a lo largo de la circunferencia de la composición 1 en partículas, como se muestra en la figura 1(b). De este modo, los lípidos 3 cargados adyacentes a lo largo de la circunferencia de la composición 1 en partículas están separados por las unidades 2 de copolímero de bloques y se les impide estar en contacto entre sí. De acuerdo con lo anterior, en la composición 1 en partículas, se forman brechas G lo suficientemente grandes para acomodar unidades 2 de copolímero de bloques entre los lípidos 3 cargados adyacentes a lo largo de la circunferencia de la composición 1 en partículas. En otras palabras, las brechas G se forman entre los lípidos 3 cargados adyacentes y las unidades 2 de copolímero de bloques se sitúan dentro de las brechas G. La fuerza de unión entre el lípido 3 cargado y la unidad de copolímero de bloque 2 es menor que la de los lípidos 3 cargados. Por lo tanto, en comparación con los DDS convencionales (liposomas) en los que los lípidos están dispuestos contiguos entre sí a lo largo de la circunferencia de la partícula, la composición 1 en partículas puede desintegrarse fácilmente su forma particular debido al desacoplamiento de los lípidos 3 cargados. Como resultado, se evita que el fármaco 4 encapsulado en las partículas (portadores) sea retenido excesivamente. Por otra parte, los liposomas sigilosos, representados por los DDS descritos en el Documento de Patente 4, se preparan primero formando liposomas con bicapas lipídicas y luego uniendo copolímeros de dibloques a la superficie de los liposomas, con lo cual los lípidos adyacentes a lo largo de la circunferencia de la partícula no son separados entre sí, por ejemplo, por los copolímeros de bloques, sino que están dispuestos contiguos entre sí. 45

El estado en el que se evita que la superficie externa de la composición 1 en partículas o la composición 1' farmacéutica se cargue para atraer una sustancia cargada se puede confirmar basándose en, esto es, si el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 en partículas o la composición 1' farmacéutica es inferior a un valor predeterminado. Específicamente, el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1' farmacéutica debe ser preferiblemente 10mV o más bajo, por ejemplo, 5mV o más bajo, o 3mV o más bajo, más preferiblemente 2mV o más bajo, aún más preferiblemente 1mV o más bajo. La incorporación del fármaco 4 en la composición 1 en partículas tiende a reducir el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1' farmacéutica resultante para ser inferior que el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 en partículas. De acuerdo con lo anterior, el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 en partículas preferiblemente debe ser de 15 mV o menos, por ejemplo, 12mV o más bajo, o 6mV o más bajo, más preferiblemente 3mV o más bajo, preferiblemente 2mV o más bajo, aún más preferiblemente 1mV o más bajo. El potencial zeta se puede medir adicionando a la composición 1 en partículas o a la composición 1' farmacéutica una solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) en dicha cantidad que la relación de los lípidos 3 cargados totales a la solución reguladora es de 0.1 mg/mL. 50 55

Obsérvese que los valores absolutos del potencial zeta mencionados en este documento se pueden redondear a los números enteros más próximos. Por ejemplo, el valor absoluto del potencial zeta de "2mV o más bajo" debe cubrir valores inferiores a 2.5mV. 60

Como se demuestra en los siguientes ejemplos, la agregabilidad de la composición 1 en partículas o la composición 1' farmacéutica en sangre se puede evitar controlando el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 en partículas o la composición farmacéutica 1' a un nivel bajo. Específicamente, si se controla el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 en partículas para que sea inferior a un valor predeterminado, la agregabilidad en la sangre se puede evitar hasta un grado tal que la agregabilidad de la composición 1 en partículas en la sangre debe ser preferiblemente, por ejemplo, 0.2 o más bajo, o 0.18 o más bajo, o 0.15 o más bajo, más preferiblemente 0.1 o más bajo, o en algunos casos 0.05 o más bajo. Alternativamente, controlando que el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1' farmacéutica sea más bajo a un valor predeterminado, la agregabilidad en la sangre puede prevenirse hasta un grado tal que la agregabilidad de la composición farmacéutica 1' en la sangre debe ser preferiblemente, por ejemplo, 0.2 o más bajo, o 0.16 o más bajo, más preferiblemente 0.1 o más bajo, o en algunos casos 0.05 o más bajo.

La agregabilidad en la sangre se puede calcular de la siguiente manera:

(i) La muestra A se prepara adicionando una composición objeto (composición 1 en partículas o composición 1' farmacéutica) a una solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) en dicha cantidad que la relación de los lípidos 3 cargados totales a la solución reguladora es 2.2 mg/mL, seguido de la adición de 9 mL de FBS (suero bovino fetal) por mL de la solución reguladora.

(ii) La muestra B se prepara de una manera similar a la etapa (i) anterior, excepto que el FBS (suero bovino fetal) se reemplaza con solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4).

(iii) Las muestras A y B se dejan reposar a 37°C, durante 24 horas, después de lo cual se mide la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm para cada muestra.

(iv) La "absorbancia para la muestra B" se resta de la "absorbancia para la muestra A", y el valor resultante se determina como la agregabilidad en la sangre. Cuanto menos sea el valor, menor es la probabilidad de agregar en la sangre la composición del objeto.

La relación en peso de la cantidad de las unidades 2 de copolímero de bloques con respecto a la cantidad de los lípidos 3 cargados debería ser preferiblemente de 1.0 o más alto, más preferiblemente de 1.5 o más alto, aún más preferiblemente de 2.0 o más alto y preferiblemente de 50 o más bajo, más preferiblemente 20 o más bajo, todavía más preferiblemente 10 o más bajo. Cuanta más alta sea la relación, más bajo será el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 en partículas o de la composición 1' farmacéutica. Los fármacos 4 se pueden encapsular más activamente en la partícula a medida que la proporción de los lípidos 3 cargados se hace más alta, razón por la cual la proporción preferiblemente debe estar limitada a 50 o más baja, como se mencionó anteriormente.

Los lípidos 3 pueden ser un lípido simple, un lípido conjugado o un lípido derivado. Ejemplos de los mismos incluyen fosfolípidos, glicoglicerolípidos, glucoesfingolípidos, esfingoides y esteroides. Específicamente, los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen 1,2-dioleoil-3-trimetilamonioipropano (DOTAP), cloruro de N-(2,3-dioleoiloxipropán-1-il)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2-(espermidocarboxiamida)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), bromuro de 1,2-dimitiriloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), bromuro de 1,2-dioleoiloxipropil-3-dietilhidroxietilamonio (DORIE), y 3β-[N-(N'-dimetilaminoetil)carbamoil]colesterol (DC-Chol). Ejemplos de lípidos aniónicos incluyen cardiolípidina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-succinilfosfatidiletanolamina (N-succinil PE), ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidiletilenglicol y succinato de colesterol.

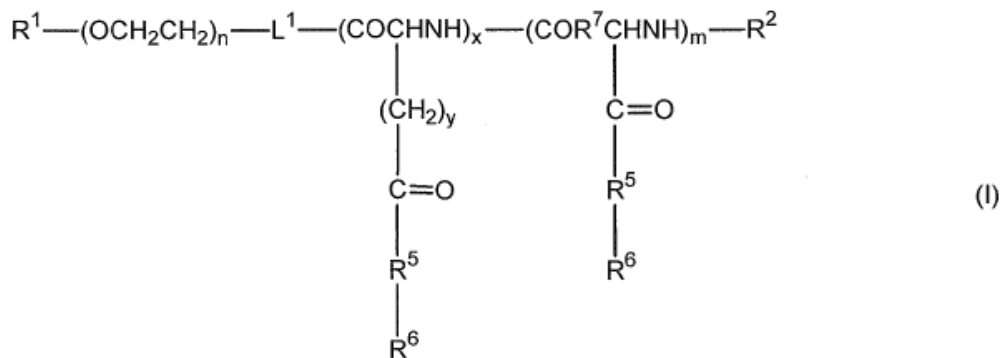
El segmento 2a de la cadena de polímeros hidrófilos debe ser preferiblemente un segmento de la cadena de polímeros soluble en agua hecho de polietilenglicol o polioxietileno. El peso molecular del segmento 2a de la cadena de polímeros hidrófilos debe ser preferiblemente de 2,500 Da o más alto, más preferiblemente de 5,000 Da o más alto, aún más preferiblemente de 8,000 Da o más alto, y preferiblemente 200,000 Da o más bajo, más preferiblemente 20,000 Da o más bajo, aún más preferiblemente 15,000 Da o más bajo. El segmento 2b de la cadena de polímeros hidrófobos debería ser preferiblemente un segmento derivado de una cadena de poliaminoácido. El número de unidades repetitivas en el segmento 2b de la cadena de polímeros hidrófobos debe ser preferiblemente 10 o más alto, más preferiblemente 20 o más alto, y preferiblemente 200 o más bajo, más preferiblemente 100 o más bajo, todavía más preferiblemente 60 o más bajo. Con el fin de reducir el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 en partículas, esto es, reducir la carga superficial de la composición 1' farmacéutica (para estar más cerca de neutro), el tamaño del segmento 2a de la cadena de polímeros hidrófilos (peso molecular) debe ser preferiblemente mayor que el tamaño del segmento 2b de la cadena de polímeros hidrófobos (el número de unidades repetitivas) en la unidad 2 de copolímero de bloques.

El segmento 2a de la cadena de polímeros hidrófilos y el segmento 2b de la cadena de polímeros hidrófobos también pueden tener un sustituyente cargado tal como un grupo amino y un grupo carboxi, siempre que la superficie externa de la composición 1 en partículas o la composición 1' farmacéutica no soporte una carga que pueda atraer una sustancia cargada.

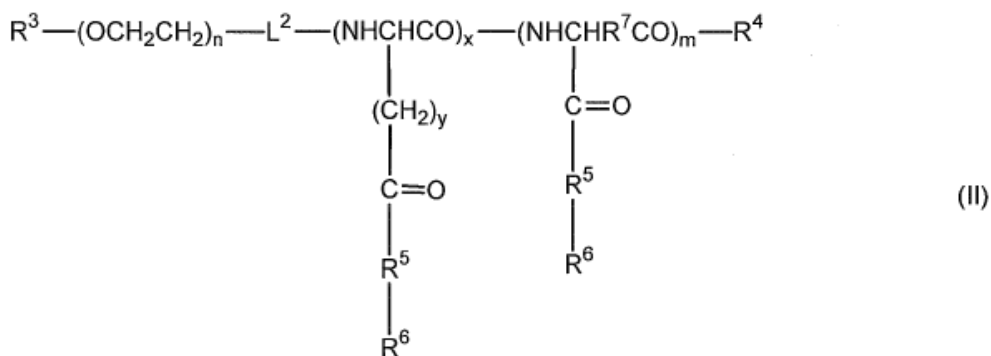
El segmento 2a de la cadena de polímeros hidrófilos y el segmento 2b de la cadena de polímeros hidrófobos pueden estar unidos entre sí por unión covalente a los extremos de sus cadenas principales. Específicamente, los ejemplos de

la unidad 2 de copolímero de bloques son los compuestos representados por las fórmulas generales (I) y (II). La composición 1 en partículas puede contener dos o más tipos de unidades 2 de copolímero de bloques.

[Fórmula 1]



[Fórmula 2]



En las fórmulas (I) y (II),

5 R^1 y R^3 , independientemente uno del otro, es ya sea átomo de hidrógeno o un grupo representado por $R^8(R^9)CH(CH_2)_q$, donde R^8 y R^9 (i) independientemente uno del otro, es átomo de hidrógeno, grupo alcoxi C_{1-6} , grupo ariloxi, grupo aril- C_{1-3} -oxi, grupo ciano, grupo carboxi, grupo amino, grupo alcoxi C_{1-6} carbonilo, grupo acilamida C_{2-7} , grupo tri-alquilo C_{1-6} siloxi, grupo siloxi, o grupo sililamino, (ii) forman entre sí un grupo etileno dioxi o grupo propileno dioxi, que son ya sea no sustituido o sustituido con un grupo alquilo C_{1-3} , o (iii) junto con un grupo CH al que están unidos, forman un grupo formilo, y q es un número entero desde 0 a 10;

R^2 es átomo de hidrógeno, grupo carbonilo alifático C_1-C_{29} saturado o insaturado, o grupo arilcarbonilo;

R^4 es grupo hidroxilo, grupo oxo alifático C_1-C_{30} saturado o insaturado, o grupo aril-alquilo inferior;

R^5 es -O- o -NH-;

15 R^6 es átomo de hidrógeno, grupo fenilo, grupo bencilo, grupo $-(CH_2)_4$ - fenilo, grupo alquilo C_4-C_{16} que es ya sea no sustituido o sustituido con un grupo amino o grupo carbonilo, o residuo de derivado de esteroles;

R^7 es grupo metileno;

n es un número entero desde 55 a 4,600;

x es un número entero desde 10 a 200;

20 m es un número entero desde 0 a 200, en donde cuando m es uno o más, las unidades (COCHNH) y la(s) unidad(es) (COR⁷CHNH) pueden estar dispuestas en un orden aleatorio en el copolímero de bloques, y cuando m es dos o más, R^6

se selecciona para cada unidad de aminoácido independientemente uno del otro y pueden estar dispuestas en un orden aleatorio en el copolímero de bloques, con la condición de que los átomos de hidrógeno no excedan el 75% de R⁶;

y es 1 o 2;

5 L¹ es un grupo de enlace seleccionado entre -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, -CH₂-, y -O-Z-S-Z-NH-, donde Z, independientemente uno del otro, es un grupo alquileo C₁-C₆; y

L² es un grupo de enlace seleccionado entre -OCO-Z-CO- y -NHCO-Z-CO-, donde Z es un grupo alquileo C₁-C₆.

En las fórmulas (I) y (II),

n es un número entero de preferiblemente 110 o más grande, más preferiblemente 180 o más grande, y preferiblemente 460 o más bajo, más preferiblemente 340 o más bajo;

10 x es un número entero de preferiblemente 20 o más grande, y preferiblemente 100 o más bajo, más preferiblemente 60 o más bajo; y

m es un número entero de preferiblemente 100 o más bajo, más preferiblemente 60 o más bajo.

15 La unidad 2 de copolímero de bloques puede ser preferiblemente un polímero aniónico. El uso de un polímero aniónico como la unidad 2 de copolímero de bloques junto con un lípido catiónico como lípido 3 cargado facilita el control del valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 en partículas y la composición 1' farmacéutica a 3mV o menos, preferiblemente 2mV o menos, y más preferiblemente 1mV o menos. También, como se demuestra en los ejemplos a continuación, el uso de un polímero aniónico como la unidad 2 de copolímero de bloques hace posible evitar la agregabilidad en la sangre más marcadamente, en comparación con el caso donde se usa un polímero neutro que tiene un valor absoluto similar del potencial zeta. Como se usan en este documento, los polímeros que tienen más cargas negativas que cargas positivas en un medio acuoso con un pH fisiológico (por ejemplo, pH 7.4) se consideran como aniónicos, los polímeros que tienen cargas más positivas que las cargas negativas en el medio acuoso, se consideran como catiónicos, y los polímeros que tienen cantidades sustancialmente iguales de cargas positivas y cargas negativas en el medio acuoso se consideran como neutrales.

25 Ejemplos preferidos de la unidad 2 de copolímero de bloques aniónicos son compuestos representados por las fórmulas generales (I) y (II) en las que R⁵ es -O-, R⁶ es un grupo bencilo, grupo -(CH₂)₄-fenilo o grupo alquilo C₄-C₁₆ que es ya sea no sustituido o sustituido con un grupo amino o grupo carbonilo.

30 La unidad 2 de copolímero de bloques se puede formar, por ejemplo, acoplado un polímero que tiene una cadena de polímeros hidrófilos con un polímero que tiene una cadena de poliaminoácido de una manera conocida, opcionalmente después de purificar, si es necesario, los polímeros para restringir la distribución del peso molecular. La unidad 2 de copolímero de bloques de acuerdo con la fórmula (I) también se puede formar, por ejemplo, mediante las etapas de: llevar a cabo la polimerización viva del anión utilizando un iniciador que puede añadir R¹ para formar una cadena de polietilenglicol; introducir un grupo amino en el extremo de crecimiento; y polimerizar, en el extremo amino, un N-carboxi anhídrido (NCA) de un aminoácido protegido, tal como Nε-Z-L-lisina, β-bencil-L-aspartato, o γ-bencil-L-glutamato.

35 La composición 1 en partículas se puede formar, por ejemplo, de la siguiente manera. En primer lugar, una unidad 2 de copolímero de bloques y un lípido 3 cargado, opcionalmente junto con un lípido neutro, se disuelven o dispersan completamente en una solución de formación que contiene un solvente, después de lo cual el solvente orgánico se elimina por evaporación. Ejemplos de solventes orgánicos incluyen acetona, diclorometano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, tetrahidrofurano y metanol. La solución de formación puede contener dos o más solventes orgánicos, y también puede contener una pequeña cantidad de agua. El sólido o pasta resultante se combina con agua o una solución acuosa que contiene un aditivo tal como una sal o estabilizante apropiado, seguido de agitación para dispersar la unidad de copolímero de bloques y el(los) lípido(s). El producto resultante se dispersa/pulveriza adicionalmente por medio de, por ejemplo, irradiación con ultrasonidos, emulsión a alta presión o extrusor para formar de este modo la composición 1 en partículas.

45 La presente invención puede proporcionar una composición 1' farmacéutica que tiene la composición 1 en partículas anterior y un fármaco 4 que lleva una carga opuesta a la carga del lípido 3 cargado contenido en la composición 1 en partículas. El fármaco 4 se retiene en la composición 1 en partículas por unión electrostática con el lípido 3 cargado. De este modo, la unión entre el lípido 3 cargado y el fármaco 4 es reversible y no implica ningún cambio estructural químico. El fármaco 4 puede encapsularse en la composición portadora ya sea adicionando el fármaco 4 a la solución de formación en la producción de la composición portadora, o adicionando la composición portadora a una solución del fármaco 4.

50 Ejemplos del fármaco 4 incluyen: compuestos aniónicos, que tienen más cargas negativas que cargas positivas en un medio acuoso con un pH fisiológico (por ejemplo, pH 7.4); y compuestos catiónicos, que tienen cargas más positivas que cargas negativas en el medio acuoso. Los compuestos deben ser preferiblemente compuestos macromoleculares.

Ejemplos de los compuestos macromoleculares que se pueden utilizar como el fármaco 4 incluyen cadenas de péptidos, proteínas, azúcar y ácidos nucleicos.

5 Con el fin de evitar que el fármaco 4 se desenganche de la composición 1 en partículas en sangre demasiado pronto o se encapsule en la composición 1 en partículas durante demasiado tiempo, la relación de carga entre el lípido 3 cargado y el fármaco 4 en la composición 1' farmacéutica preferiblemente debe ser controlada para estar dentro de un intervalo particular. Cuando el fármaco 4 es, por ejemplo, un ácido nucleico, la relación de carga se puede definir como [la concentración molar de grupos catiónicos del lípido 3 cargado contenido en la composición en partículas]/[la concentración molar de grupos fosfóricos en el ácido nucleico]. Por otra parte, cuando el fármaco es un compuesto que
10 tiene tanto grupos aniónicos como catiónicos, por ejemplo, una proteína, la relación de carga se puede definir como [la concentración molar de grupos cargados del lípido cargado contenido en la composición en partículas]/([La concentración molar de grupos en el fármaco que se cargan opuestamente al lípido cargado]-[la concentración molar de grupos en el fármaco que se cargan de forma similar al lípido cargado]). La relación de carga debe ser preferiblemente 0.5 o más alta, más preferiblemente uno o más alta, aún más preferiblemente 2 o más alta, y preferiblemente 50 o más baja, más preferiblemente 20 o más baja, aún más preferiblemente 10 o más baja.

15 Los tamaños medios de partículas de la composición 1 en partículas y la composición 1' farmacéutica deberían ser preferiblemente 10 nm o más grande, más preferiblemente 30 nm o más grande, y preferiblemente 300 nm o más pequeño, más preferiblemente 200 nm o más pequeño.

Ejemplos

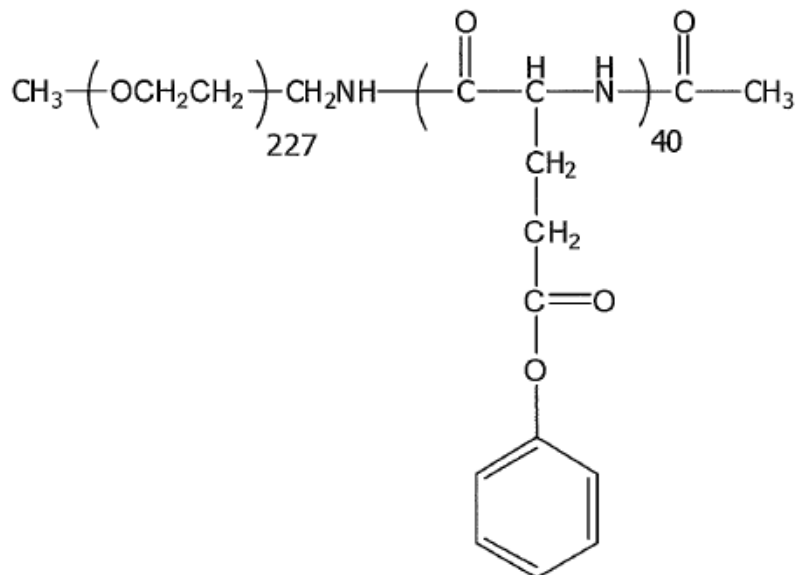
20 La presente invención se explicará con más detalle a continuación haciendo referencia a los Ejemplos. La medición de los tamaños medios de partículas de composiciones en partículas por medio de dispersión dinámica de luz (DLS) mencionada en la explicación siguiente se llevó a cabo utilizando el analizador de dispersión de luz Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrumentos).

[Ejemplo del grupo 1: Composición en partículas]

[Ejemplo 1-1]

25 Se disolvieron cinco gramos de α -metoxi- ω -amino-polietilenglicol (en lo sucesivo también denominado como "PEG") que tenía un peso molecular promedio de peso (Mw) de 10000 (Fabricado por NOF Corp.) en 50 mL de dimetilsulfóxido, que se hizo reaccionar con 5.5 g (42 partes con respecto al polietilenglicol) de N-carboxi anhídrido (NCA) de γ -bencil-L-glutamato (en lo sucesivo también denominada como "PBLG") a 40°C, durante 24 horas. La solución de reacción se dejó caer en 1L de una mezcla de solventes de hexano y acetato de etilo (proporción en volumen 1:1) para provocar la precipitación de un polímero, que se recuperó por filtración a presión reducida y después se secó para producir 8.6 g de un producto sólido. Este producto se disolvió en 86 mL de DMF, con lo cual se mezclaron 432 μ L de anhídrido acético y se hicieron reaccionar a 40°C, durante 24 horas. La solución de reacción se dejó caer en 1 litro de una mezcla de solvente de hexano y acetato de etilo (proporción en volumen 1:1) para provocar la precipitación de un polímero, que se recuperó por filtración a presión reducida y luego se secó más para producir 8.1 g de copolímero de bloques polietilenglicolpoli(γ -bencil-L-glutamato)-Ac (en lo sucesivo también denominado como "PEG-PBLG"), que es un polímero neutro. La fórmula estructural de PEG-PBLG se muestra a continuación. El análisis de 1 H-RMN reveló que el
35 grado de polimerización del bloque de PBLG fue 40.

[Fórmula 3]



Se mezclaron 4 mL de la solución de PEG-PBLG en cloroformo (50 mg/mL) con 0.5 mL de solución de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonioipropano (en lo sucesivo también denominada como "DOTAP") (Avant Polar Lipid) en cloroformo (40 mg/mL), el solvente se evaporó en un evaporador rotatorio, y se secó adicionalmente durante la noche a presión reducida. Al sólido resultante, se adicionaron 10 mL de solución reguladora HEPES 20 mM (pH 7.4) y se agitó a temperatura ambiente, durante 3 horas para suspender el sólido. La suspensión se pulverizó por irradiación ultrasónica (130W, pulso de 1 segundo, 20 minutos). La solución se pasó a través de un filtro de 0.2 μm (Millex GP, Millipore) para producir de este modo la composición 1 en partículas. La composición 1 en partículas se forma con los segmentos de la cadena de polímeros hidrófobos dispuestos radialmente dentro y los segmentos de la cadena de polímeros hidrófilos dispuestos radialmente en el exterior. Las composiciones en partículas 2 a 6 descritas a continuación están también en un estado similar.

[Ejemplo 1-2]

La composición 2 en partículas se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-1, excepto que se sustituyó DOTAP por ácido fosfatídico (lípidio aniónico cargado, en lo sucesivo también denominado como "PA").

15 [Ejemplo 1-3]

Se mezclaron cuatro mL de la solución de PEG-PBLG en cloroformo (50 mg/mL) preparada en el Ejemplo 1-1 con 0.5 mL de la solución DOTAP (lípidio catiónico: Avant Polar Lipid) en cloroformo (40 mg/mL) y 0.5 mL de solución de dioleoilfosfatidiletanolamina (en lo sucesivo también denominada como "DOPE", Avant Polar Lipid) (lípidio neutro; Avant Polar Lipid) en cloroformo (40 mg/mL), el solvente se evaporó en un evaporador rotatorio, y se secó adicionalmente durante la noche bajo presión reducida. Al sólido resultante, se le adicionaron 5 mL de solución reguladora HEPES 20 mM (pH 7.4) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas para suspender el sólido. La suspensión se pulverizó por irradiación ultrasónica (130W, pulso de 1 segundo, 20 minutos). La solución se pasó a través de un filtro de 0.2 μm (Millex GP, Millipore) para producir de este modo la composición 3 en partículas.

[Ejemplo 1-4]

25 La composición 4 en partículas se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3 excepto que la cantidad de solución en cloroformo de PEG-PBLG se cambió a 2 mL.

[Ejemplo 1-5]

La composición 5 en partículas se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3 excepto que la cantidad de solución en cloroformo de PEG-PBLG se cambió a 1.33 mL.

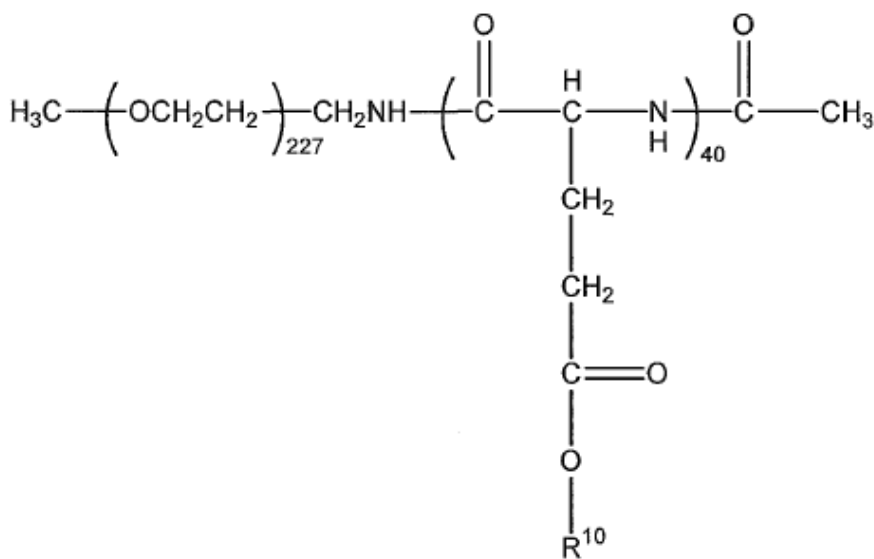
30 [Ejemplo 1-6]

La composición 6 en partículas se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3 excepto que la cantidad de la solución en cloroformo de PEG-PBLG se cambió a 1 mL.

[Ejemplo 1-7]

- 5 El PEG-PBLG preparado en el Ejemplo 1-1 se trató con álcali para desproteger los grupos bencilo de las cadenas laterales de ácido glutámico, con lo cual se preparó copolímero de bloques de polietilenglicol/poli(ácido L-glutámico) (PEG-pGlu). Las cadenas laterales de ácido glutámico de PEG-pGlu se modificaron parcialmente con grupos octilo (C_8H_{17}) a través de una reacción de condensación utilizando alcohol octílico para producir de este modo polímero PEG-pGlu (C8), que es un polímero aniónico. El análisis por 1H -RMN reveló que el número de grupos octilo introducidos era de 33 por polímero. La fórmula estructural de PEG-pGlu (C8) se muestra a continuación.

[Fórmula 4]



R^{10} : H (7 unidades), C_8H_{17} (33 unidades)

10

Se mezcló un mililitro de una solución de metanol (50 mg/mL) del PEG-pGlu (C8) resultante con 0.5 mL de una solución de metanol (40 mg/mL) de DOTAP (lípidio cargado catiónico, Avanti Polar Lipid) y 0.5 mL de una solución de metanol (40 mg/mL) de dioleoilfosfatidiletanolamina (en lo sucesivo también denominada como "DOPE") (lípidio neutro, Avanti Polar Lipid) y luego el solvente se evaporó en un evaporador rotatorio y se secó durante la noche a presión reducida. El sólido resultante se combinó con 2.5 mL de solución reguladora de fosfato de sodio 100 mM (pH 7.4), se agitó durante tres horas a temperatura ambiente para obtener una suspensión. La suspensión se pulverizó por irradiación ultrasónica (130W, pulso de 1 segundo, 10 minutos) y se pasó a través de un filtro de 0,2 μm (Millex GP, Millipore) para producir de ese modo la composición 7 en partículas.

15

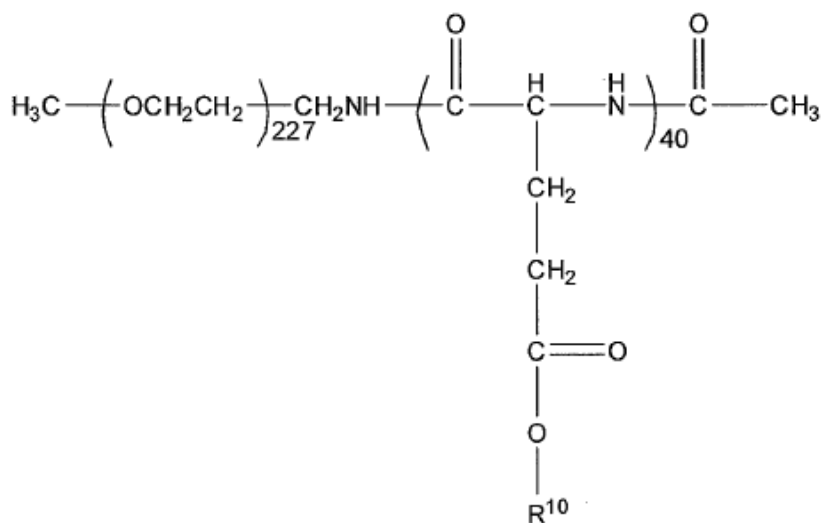
[Ejemplo 1-8]

- 20 La composición 8 en partículas se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-7, excepto que la cantidad de la solución en metanol (50 mg/mL) de PEG-pGlu (C8) se cambió a 0.5 mL.

[Ejemplo 1-9]

- 25 El PEG-PBLG preparado en el Ejemplo 1-1 se trató con álcali para desproteger los grupos bencilo de las cadenas laterales del ácido glutámico, con lo cual se preparó copolímero de bloques polietilenglicol/poli(ácido L-glutámico) (PEG-pGlu). Las cadenas laterales de ácido glutámico de PEG-pGlu se modificaron parcialmente con grupos bencilo ($PhCH_2$) a través de una reacción de condensación utilizando alcohol bencilico para producir de este modo PEG-pGlu (Bn), que es un polímero aniónico. El análisis por 1H -RMN reveló que el número de grupos bencilo introducidos era 34 por polímero. La fórmula estructural de PEG-pGlu (Bn) se muestra a continuación.

[Fórmula 5]



R¹⁰ : H (6 unidades), PhCH₂ (34 unidades)

5 Se mezcló un mililitro de una solución de acetona (50 mg/mL) de PEG-pGlu (C8) con 0.5 mL de una solución de metanol (40 mg/mL) de DOTAP (lípidio cargado catiónico, Avanti Polar Lipid) y 0.5 mL de una solución de metanol (40 mg/mL) de dioleoilfosfatidiletanolamina (en lo sucesivo también denominado como "DOPE") (lípidio neutro, Avanti Polar Lipid), y luego el solvente se evaporó en un evaporador rotatorio y se secó durante la noche a presión reducida. El sólido resultante se combinó con 2.5 mL de solución reguladora de fosfato de sodio 100 mM (pH 7.4), se agitó durante tres horas a temperatura ambiente para obtener una suspensión. La suspensión se pulverizó por irradiación ultrasónica (130 W, pulso de 1 segundo, 10 minutos) y se pasó a través de un filtro de 0.2 µm (Millex GP, Millipore) para producir de este modo la composición 9 en partículas.

10 **[Ejemplo 1-10]**

La composición 10 en partículas se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-7, excepto que la cantidad de la solución en metanol de PEG-pGlu (C8) se cambió a 0.5 mL.

[Ejemplo comparativo 1-1]

15 La composición comparativa C1 se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-1, excepto que no se utilizó DOTAP.

[Ejemplo comparativo 1-2]

La composición comparativa C2 se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3, excepto que no se utilizó DOTAP.

[Ejemplo comparativo 1-3]

20 La composición comparativa C3 se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 1-3, excepto que no se usó PEG-PBLG. La composición C3 no contiene un copolímero de bloques, sino que sólo contiene DOTAP (lípidio cargado) y DOPE (lípidio neutro).

[Evaluación 1a]

25 Los tamaños medios de partículas de las composiciones en partículas 1 a 10 y las composiciones comparativas en partículas C1 a C3 se midieron utilizando dispersión dinámica de la luz. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

	Composición en partículas	Relación de peso de polímero y lípido	Tamaño de partícula (nm)

ES 2 614 615 T3

Ejemplo 1-1	1	PEG-PBLG:DOTAP=10:1	64.7
Ejemplo 1-2	2	PEG-PBLG:PA=10:1	73.2
Ejemplo 1-3	3	PEG-PBLG:DOTAP:DOPE=10:1:1	88.7
Ejemplo 1-4	4	PEG-PBLG:DOTAP:DOPE=5:1:1	90.3
Ejemplo 1-5	5	PEG-PBLG:DOTAP:DOPE=3.3:1:1	87.7
Ejemplo 1-6	6	PEG-PBLG:DOTAP:DOPE=2.5:1:1	88.1
Ejemplo 1-7	7	PEG-pGlu(C8):DOTAP:DOPE=2.5:1:1	167.7
Ejemplo 1-8	8	PEG-pGlu(C8):DOTAP:DOPE=1.25:1:1	158.1
Ejemplo 1-9	9	PEG-pGlu(Bn):DOTAP:DOPE=2.5:1:1	137.1
Ejemplo 1-10	10	PEG-pGlu(Bn):DOTAP:DOPE=1.25:1:1	158.1
Ejemplo comparativo 1-1	C1	-	94.2
Ejemplo comparativo 1-2	C2	PEG-PBLG:DOPE=10:1	87.3
Ejemplo comparativo 1-3	C3	DOTAP:DOPE=1:1	61.7

[Evaluación 1b]

5 A las composiciones en partículas 3 a 10 y la composición C3 en partículas comparativas, se le adicionó solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) para preparar muestras que tenían una concentración de lípidos cargada de 0.1 mg/mL. Utilizando el analizador de dispersión de luz Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), se determinó el potencial zeta para cada muestra (800 μ L). Se utilizaron células capilares desechables (DTS1060, Malvern Instruments) para la medición, y la temperatura durante la medición se fijó a 25°C.

[Tabla 2]

Composición en partículas	Relación de peso de polímero y lípido	Potencial zeta (mV)
3	PEG-PBLG:DOTAP:DOPE=10:1:1	2.04
4	PEG-PBLG:DOTAP:DOPE=5:1:1	5.38
5	PEG-PBLG:DOTAP:DOPE=3.3:1:1	7.80
6	PEG-PBLG:DOTAP:DOPE=2.5:1:1	11.0
7	PEG-pGlu(C8):DOTAP:DOPE=2.5:1:1	1.63
8	PEG-pGlu(C8):DOTAP:DOPE=1.25:1:1	1.09
9	PEG-pGlu(Bn):DOTAP:DOPE=2.5:1:1	0.26
10	PEG-pGlu(Bn):DOTAP:DOPE=1.25:1:1	2.06
C3	DOTAP:DOPE=1:1	60.7

10 Como se muestra en la Tabla 2, las composiciones en partículas 3 a 10 tenían valores absolutos más bajos del potencial zeta comparado con la composición C3 en partículas comparativa que no contenía unidades de copolímero de bloques. En las composiciones en partículas 3 a 10, los valores absolutos del potencial zeta se hicieron más bajos a medida que la relación en peso de las unidades de copolímero de bloques con el lípido cargado se hicieron más altos. Este resultado significa que se evitó que la superficie externa de las composiciones en partículas 3 a 10 lleven cargas

resultantes del lípido cargado. Asumiendo que el contenido de los lípidos cargados en las composiciones en partículas es constante, este resultado también significa que la superficie externa de las partículas es menos probable que lleve cargas resultantes de los lípidos cargados, ya que la densidad de la zona constituida por el segmento de la cadena de los polímeros hidrófilos se vuelve más alta.

5 [Evaluación 1c: Evaluación de agregabilidad en la sangre]

10 Utilizando las composiciones en partículas 3 a 10 y la composición C3 en partículas comparativa como las composiciones en partículas, se determinó la absorbancia de las muestras A y B preparadas como se describió anteriormente a una longitud de onda de 700 nm utilizando un lector de placas (POWERSCAN HT, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) para calcular la agregabilidad en la sangre. Cuando el valor calculado era 0 o menos, la agregabilidad en la sangre se fijó en 0. La Tabla 3 muestra estos datos y los valores absolutos del potencial zeta determinados en la evaluación 1b, mientras que la figura 2 muestra la relación entre el valor absoluto del potencial zeta y la agregabilidad en la sangre.

[Tabla 3]

Composición en partículas	Relación de peso de polímero y lípido	Potencial zeta (mV)
Ninguno	0.118	-
3	0.093	2.04
4	0.177	5.38
5	0.185	7.80
6	0.198	11.0
7	0	1.63
8	0	1.09
9	0.012	0.26
10	0.073	2.06
C3	0.375	60.7

15 Como puede verse en la figura 2 y la Tabla 3, la agregabilidad en la sangre fue baja cuando el valor absoluto del potencial zeta de la composición en partículas era 10mV o más bajo, preferiblemente 6mV o más bajo, más preferiblemente 3mV o más bajo.

[Ejemplo del grupo 2: Composición en partículas encapsulantes de albúmina (pH 7.4)]

[Ejemplo 2]

20 La albúmina-FITC (Sigma Aldrich), albúmina derivada de bovino marcada con FITC (5-isotiocianato de fluoresceína), se disolvió en solución reguladora HEPES 20 mM (pH 7.4) para preparar una solución de 10 mg/mL. Se mezclaron 0.2 mL de esta solución de albúmina con 0.5 mL de la composición 1 en partículas (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG y 4 mg/mL de DOTAP) y 0.5 mL de solución reguladora HEPES 20 mM (pH 7.4), y se dejó reposar durante la noche a 4°C para preparar de este modo una composición en partículas que encapsula la albúmina. El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 98.7 nm. La albúmina es una biomacromolécula que tiene un punto isoeléctrico (PI) de aproximadamente 4.8 y por lo tanto exhibe un carácter aniónico a pH 7.4.

[Ejemplo comparativo 2-1]

30 Se preparó una composición en partículas encapsulantes de albúmina de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto que la composición 1 en partículas se reemplazó con la composición 2 en partículas (que contienen 40 mg/mL de PEG-PBLG y 4 mg/mL de PA). El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 91.6 nm.

[Ejemplo comparativo 2-2]

Se preparó una composición en partículas encapsulantes de albúmina de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto que la composición 1 en partículas se reemplazó con la composición C1 en partículas comparativa (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG). El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 118 nm.

5 **[Ejemplo comparativo 2-3]**

Se preparó una composición en partículas encapsulantes de albúmina de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto que la composición 1 en partículas se reemplazó con la composición C2 en partículas comparativa (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG y 2 mg/mL de DOPE). El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 119 nm.

10 **[Evaluación 2a: Evaluación de la retención de albúmina por ultracentrifugación]**

15 Se ultracentrifugaron cuarenta µL de cada una de las soluciones de las composiciones en partículas encapsulantes de albúmina preparadas en el ejemplo 2 y los ejemplos comparativos 2-1 a 2-3 mezcladas con 360 µL de solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) a 100,000 xg, 4°C con una ultracentrífuga (Optima MAX Ultracentrifuge, Beckman Coulter). La intensidad de fluorescencia de albúmina-FITC en el sobrenadante se midió utilizando un lector de placas (POWERSCAN HT, fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) (longitud de onda de excitación: 485 nm, longitud de onda de fluorescencia: 528 nm) para determinar la tasa de retención de albúmina en la composición en partículas basada en la siguiente ecuación (1).

$$(Tasa\ de\ retención) = (A-B) \times 100/A \quad Ecuación\ (1)$$

A: Intensidad de fluorescencia de albúmina-FITC adicionada a la composición en partículas

20 B: Intensidad de fluorescencia de albúmina-FITC en el sobrenadante

[Tabla 4]

	Composición en partículas utilizadas	pH	Tasa de retención de albúmina-FITC (%)
Ejemplo 2	1	7.4	94.0
Ejemplo comparativo 2-1	2	7.4	0
Ejemplo comparativo 2-2	C1	7.4	0
Ejemplo comparativo 2-3	C2	7.4	0

25 Como se muestra en la Tabla 4, se conservó hasta 94% de albúmina en las partículas después de la centrifugación en el Ejemplo 2, mientras que en los Ejemplos Comparativos 2-1 a 2-3 casi ninguna albúmina estaba presente en las partículas después de la centrifugación.

[Evaluación 2b: Evaluación de la retención de albúmina por cromatografía de filtración en gel]

30 Se analizó un mL de cada una de las soluciones de las partículas encapsulantes de albúmina preparadas en el Ejemplo 2 y el Ejemplo Comparativo 2-1 por cromatografía de filtración en gel utilizando Sepharose CL-4B. El eluyente se recogió en fracciones y se midió la intensidad de fluorescencia de la albúmina-FITC contenida en cada fracción utilizando un lector de placas (POWERSCAN HT, fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) (longitud de onda de excitación: 485 nm, longitud de onda de fluorescencia: 528 nm). Como eluyente, se utilizó solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) al cual se le adicionó cloruro de sodio 150 mM.

35 La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de la medición. Como se muestra en la figura 3, se observaron picos de elución en albúmina per se y en fracciones alrededor de la fracción 20 en el Ejemplo Comparativo 2-1, mientras que en el Ejemplo 2 se observaron picos de elución en fracciones alrededor de la fracción 10. Esto significa que el Ejemplo 2 tiene una mejor capacidad de retención de albúmina en las partículas comparadas con el Ejemplo Comparativo 2-1.

[Ejemplo del grupo 3: Composición en partículas encapsulantes de dextrano]

[Ejemplo 3]

5 Se disolvió Dextran-FITC (Sigma Aldrich), que es dextrano marcado con FITC con un peso molecular medio de 20000, en solución reguladora HEPES 20 mM (pH 7.4) para preparar una solución de 10 mg/mL. Se mezclaron 0.2 mL de esta solución de dextrano con 0.5 mL de la composición 1 en partículas (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG y 4 mg/mL de DOTAP) y 0.5 mL de solución reguladora HEPES 20 mM (pH 7.4), y se dejó reposar durante la noche a 4°C para preparar de este modo una composición en partículas encapsulantes de dextrano. El tamaño medio de partícula de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 77.6

El dextrano es una biomacromolécula que presenta un carácter aniónico a pH 7.4.

[Ejemplo comparativo 3-1]

10 Se preparó una composición en partículas encapsulantes de dextrano de la misma manera que en el Ejemplo 3, excepto que la composición 1 en partículas se reemplazó con la composición 2 en partículas (que contienen 40 mg/mL de PEG-PBLG y 4 mg/mL de PA). El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 95.4 nm.

[Ejemplo comparativo 3-2]

15 Se preparó una composición en partículas encapsulantes de dextrano de la misma manera que en el Ejemplo 3, excepto que la composición 1 en partículas se reemplazó con la composición C1 en partículas comparativa (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG). El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 119 nm.

[Ejemplo comparativo 3-3]

20 Se preparó una composición en partículas encapsulantes de dextrano de la misma manera que en el Ejemplo 3, excepto que la composición 1 en partículas se reemplazó con la composición C2 en partículas comparativa (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG y 4 mg/mL de DOPE). El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 119 nm.

[Evaluación 3: Evaluación de la retención de dextrano por ultracentrifugación]

25 Para 40 µL de cada una de las soluciones de las composiciones en partículas encapsulantes de dextrano preparadas en el Ejemplo 3 y Ejemplos Comparativos 3-1 a 3-3, se midió la intensidad de fluorescencia de dextrano-FITC en el sobrenadante de una manera similar a la evaluación 2a para determinar la tasa de retención de albúmina de la composición en partículas sobre la base de la siguiente ecuación (2).

$$(Tasa\ de\ retención) = (A'-B') \times 100/A' \quad Ecuación\ (2)$$

30 A': Intensidad de fluorescencia de dextrano-FITC adicionada a la composición en partículas

B': Intensidad de fluorescencia de dextrano-FITC en el sobrenadante

[Tabla 5]

	Composición en partículas utilizadas	pH	Tasa de retención de dextrano-FITC (%)
Ejemplo 3	1	7.4	38.67
Ejemplo comparativo 3-1	2	7.4	6.24
Ejemplo comparativo 3-2	C1	7.4	2.39
Ejemplo comparativo 3-3	C2	7.4	4.03

35 Como se muestra en la Tabla 5, se conservó casi 40% de dextrano en las partículas después de la centrifugación en el Ejemplo 3, mientras que en el Ejemplo Comparativo 3-1 y 3-3 casi ninguna albúmina estaba presente en las partículas después de la centrifugación.

[Ejemplo 4: Composición en partículas encapsulantes de albúmina (pH 3.3)]

[Ejemplo 4]

5 La albúmina (derivada de bovino, Sigma Aldrich) se disolvió en solución reguladora de glicina 50 mM (pH 3) para preparar una solución de 1 mg/mL. Se mezclaron dos mL de esta solución de albúmina con 0.5 mL de la composición 2 en partículas (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG y 4 mg/mL de PA) y 0.5 mL de solución reguladora HEPES 20 mM (pH 7.4), y se dejó reposar durante una noche a 4°C, pH 3.3 para preparar de este modo una composición en partículas encapsulantes de albúmina. El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 78.8 nm. La albúmina presenta un carácter catiónico a pH 3.3.

[Ejemplo comparativo 4-1]

10 Se preparó una composición en partículas encapsulantes de albúmina de la misma manera que en el Ejemplo 4, excepto que la composición 2 en partículas se reemplazó con la composición 1 en partículas (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG y 4 mg/mL de DOTAP). El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 95.1 nm.

[Ejemplo comparativo 4-2]

15 Se preparó una composición en partículas encapsulantes de albúmina de la misma manera que en el Ejemplo 4, excepto que la composición 2 en partículas se reemplazó con la composición C1 en partículas comparativa (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG). El tamaño medio de partículas de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 115 nm.

[Ejemplo comparativo 4-3]

20 Se preparó una composición en partículas encapsulantes de albúmina de la misma manera que en el Ejemplo 4, excepto que la composición 2 en partículas se reemplazó con la composición C2 en partículas comparativa (que contiene 40 mg/mL de PEG-PBLG y 1 mg/mL de DOPE). El tamaño medio de partícula de la composición en partículas medido por dispersión dinámica de luz fue de 120 nm.

[Evaluación 4: Evaluación de la retención de albúmina por ultracentrifugación]

25 Se ultracentrifugaron 400 µL de cada una de las soluciones de las composiciones en partículas encapsulantes de albúmina preparadas en el Ejemplo 4 y los Ejemplos Comparativos 4-1 a 4-3 durante 1 hora a 100,000 xg, 4°C con una ultracentrífuga (Optima MAX Ultracentrifuge, Beckman Coulter). La concentración de albúmina en el sobrenadante se determinó utilizando el kit de determinación de proteínas BCA Protein Assay (Pierce) para determinar la tasa de retención de albúmina en la composición en partículas basándose en la siguiente ecuación (3).

30
$$(Tasa\ de\ retención) = (A'' - B'') \times 100 / A'' \quad Ecuación\ (3)$$

A'': Concentración de albúmina adicionada a la composición en partículas

B'': Concentración de albúmina en el sobrenadante

[Tabla 6]

	Composición en partículas utilizadas	pH	Tasa de retención de albúmina (%)
Ejemplo 4	1	3.3	94.75
Ejemplo comparativo 4-1	2	3.3	49.85
Ejemplo comparativo 4-2	C1	3.3	42.86
Ejemplo comparativo 4-3	C2	3.3	55.39

35 Como se muestra en la Tabla 6, se conservó más de 94% de albúmina en las partículas después de la centrifugación en el Ejemplo 4, mientras que en los Ejemplos Comparativos 4-1 y 4-3 la tasa de retención de albúmina después de la centrifugación no fue tan alta como en el Ejemplo 4.

[Ejemplo del grupo 5: Composición en partículas encapsulantes de ARNsi]**[Ejemplo 5]**

De acuerdo con el procedimiento que se muestra a continuación, cada composición en partículas se sometió a tratamiento de encapsulación de ARNsi.

5 Para las composiciones en partículas 3 a 6 y la composición C3 en partículas comparativa, el tratamiento de encapsulación se llevó a cabo de la siguiente manera. ARNsi se disolvió en solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) para preparar una solución de ARNsi 20 μ M. A 250 μ L de esta solución de ARNsi, se le adicionaron 250 μ L de la composición en partículas cuya concentración se ajustó para satisfacer la relación de carga (+/-) de interés y después de mezclar, se dejó reposar a 4°C, durante 2 horas para efectuar el tratamiento de encapsulación de ARNsi en la
10 composición en partículas. La "relación de carga (+/-)" indica [la concentración de grupos catiónicos del lípido catiónico contenido en la composición en partículas]/[la concentración del grupo fosfórico en el ácido nucleico]. Para las composiciones en partículas 7 a 10, se adicionaron 279 μ L de la composición en partículas a 100 μ L de una solución acuosa de ARNsi 100 μ M y, después de mezclar, se dejó reposar a 4°C, durante 2 horas para llevar a cabo el
15 tratamiento de encapsulación del ARNsi en la composición en partículas. La relación de carga (+/-) de la composición en partículas encapsulantes de ARNsi así preparada es 8. Las composiciones en partículas encapsuladas con ARNsi preparadas a partir de las composiciones en partículas 7 a 10 se sometieron a la operación de liofilización de una manera convencional para formar una solución stock, y luego se disolvió nuevamente en agua, y se sometió a las mediciones explicadas a continuación.

20 En cada uno de los ejemplos descritos en la presente descripción, el ARNsi se seleccionó entre los que se explican a continuación, todos los cuales están disponibles en Nippon EGT Co., Ltd.

* ARNsi (Luc): Diseñado para dirigir a un gen luciferasa de la luciérnaga del mar, este ARNsi se compone de una hebra sentido de 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (SEQ ID NO:1) y una hebra antisentido de 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (SEQ ID NO:2) bicatenario de una manera convencional.

25 * ARNsi (Plk1): Diseñado para dirigir el gen humano Plk1 (quinasa similar a Polo 1), este ARNsi se compone de una hebra sentido de 5'-CCAUAACGAGCUGCUUAAdTdT-3' (SEQ ID NO:3) y una hebra antisentido de 5'-UUAAGCAGCUCGUUAUUGGdTdT-3' (SEQ ID NO:4) bicatenario de una manera convencional. El gen Plk1 es una quinasa que desempeña un papel en la fase M de la división celular. ARNsi (Plk1) induce la apoptosis cuando se transfectan en la célula.

30 * F-ARNsi (Luc): Este ARNsi se forma de la misma manera que ARNsi(Luc) excepto que la hebra antisentido de SEQ ID NO: 2 está marcada con Cy3 en el extremo 5' (5'-Cy3-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3').

[Evaluación 5a]

35 En la evaluación 5a, se utilizó la composición 4 en partículas y la composición 6 en partículas como la composición en partículas y ARNsi(Luc) como ARNsi y se sometieron al tratamiento de encapsulación de ARNsi para obtener la relación de carga de 0.5, 1, 2, 4 y 8 en el método descrito en el ejemplo 5. La tasa de encapsulación de ARNsi en cada
40 composición en partículas después del tratamiento de encapsulación se analizó por electroforesis como se describe a continuación. Cada composición en partículas que contiene 100 ng de ARNsi se cargó en un gel de poliacrilamida (Novex 20% TBE Gel, Invitrogen), que luego se sometió a electroforesis utilizando la solución de TBE como solución reguladora de electroforesis bajo la condición de un voltaje aplicado de 100 V y un tiempo de migración de 1 hora. Como el control, 100 ng de ARNsi se analiza simultáneamente. Después de completar la electroforesis, el gel se tiñó con un reactivo de revelado SYBR (TM) Green II (Invitrogen) y se formó una imagen utilizando un instrumento de análisis de imágenes Molecular Imager FX (Bio-Rad).

45 La figura 4 muestra el resultado de la electroforesis en la evaluación 5a, en la que una relación de carga de 0 significa el control. Como se muestra en la figura 4, cuando la relación de carga fue 2 o más, no se observaron bandas derivadas de ARNsi libre. Esto indica que cuando se utilizaron la composición 4 en partículas y la composición 6 en partículas y la relación de carga fue de 2 o más, casi todos los ARNsi podrían encapsularse en las composiciones en partículas. Dado que las composiciones en partículas encapsuladas en ARNsi tienen un menor grado de migración en electroforesis en comparación con ARNsi, las bandas derivadas de ARNsi libre no pueden detectarse en los carriles de migración correspondientes cuando el ARNsi está encapsulado apropiadamente.

[Evaluación 5b]

50 En la evaluación 5b, se utilizaron las composiciones en partículas 3 a 10 y la composición C3 en partículas comparativa como la composición en partículas y ARNsi(Luc) como ARNsi y se sometieron al tratamiento de encapsulación para obtener la relación de carga de 8, en el método descrito en el ejemplo 5. A las composiciones en partículas después del tratamiento de encapsulación, se le adicionó solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) para ajustar la concentración del lípido cargado a 0.1 mg/mL. Utilizando el analizador de dispersión de luz Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments),

se determinó el potencial zeta para estas muestras (800 μ L). En la medición, se utilizaron células capilares desechables (DTS1060, Malvern Instruments) y la temperatura durante la medición se fijó a 25°C.

[Tabla 7]

Composición en partículas utilizada	Relación de carga (+/-)	Potencial zeta (mV)	Potencial zeta antes del tratamiento (mV)
3	8	1.93	2.04
4	8	2.63	5.38
5	8	4.67	7.80
6	8	6.17	11.0
7	8	0.37	1.63
8	8	0.95	1.09
9	8	0.567	0.26
10	8	0.96	2.06
C3	8	55.1	60.7

5 Como se muestra en la Tabla 7, las composiciones en partículas tratadas con encapsulación preparadas utilizando las composiciones en partículas 3 a 10 tenían valores absolutos marcadamente bajos del potencial zeta, lo que sugiere que se encapsuló una gran cantidad de ARNsi. También como se muestra en la Tabla 7, el grado de reducción del potencial zeta después del tratamiento de encapsulación de ARNsi fue mayor a medida que aumentaba la relación de adición del lípido cargado con relación a las unidades de copolímero de bloques. Esto significa que cuanto mayor es la tasa de adición del lípido cargado, más ARNsi puede ser encapsulado.

[Evaluación 5c: Evaluación de la actividad de las células MDA-MB-231]

15 En la evaluación 5c, se utilizaron las composiciones en partículas 3 a 6 como la composición en partículas y ARNsi (PIK1) como ARNsi y se sometieron al tratamiento de encapsulación para obtener la relación de carga de 8 en el método descrito en el Ejemplo 5. Utilizando las composiciones en partículas encapsuladas con ARNsi, se llevó a cabo la siguiente evaluación de la actividad de las células MDA-MB-231. Como la secuencia de control inactiva, ARNsi(Luc) se utilizó y se realizó un experimento similar.

[Evaluación de la actividad]

20 Se adicionó solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) a las composiciones en partículas encapsuladas en ARNsi para ajustar la concentración de ARNsi a 3 μ M/mL. Células MDA-MB-231 derivadas de cáncer de mama humano se sembraron en placas en una placa de 96 pozos a 2000 células/pozo. Veinticuatro horas más tarde, cada composición en partículas encapsuladas en ARNsi se adicionó al medio de cultivo. La concentración final de ARNsi en el medio se ajustó a 300 nM, 100 nM, 33 nM y 11 nM. Después de un cultivo adicional durante 96 horas, la viabilidad celular se evaluó utilizando el Cell Count Kit-8 (Dojindo Co., Ltd.).

25 La figura 5 indica gráficas para explicar el resultado de esta evaluación de actividad. Como se muestra en la figura 5, en las composiciones en partículas que encapsulan ARNsi(PIK1), los recuentos de células se redujeron notablemente en comparación con las composiciones en partículas encapsulantes de ARNsi(Luc).

[Evaluación 5d: Evaluación de agregabilidad en la sangre]

30 En la evaluación 5d, se utilizaron las composiciones en partículas 3 a 10 y la composición C3 en partículas comparativa como composición en partículas y ARNsi(Luc) como ARNsi y se sometieron al tratamiento de encapsulación para obtener la relación de carga de 8, en el método descrito en el ejemplo 5. Las absorbancias de las muestras A y B preparadas como se describió anteriormente a una longitud de onda de 700 nm se determinaron utilizando un lector de placas (POWERSCAN HT, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) para calcular la agregabilidad en la sangre. Cuando el valor calculado fue 0 o menos, la agregabilidad en la sangre se fijó en 0.

La Figura 6 es un gráfico que muestra las absorbancias de la muestra de medición A (con FBS) y la muestra de medición B (sin FBS) para la composición en partículas tratada con encapsulación que utilizó la composición 4 en partículas y la composición en partículas tratada con encapsulación que utilizó la composición C3 en partículas comparativa. Como se muestra en la figura 6, el tratamiento con FBS provocó un aumento significativo de la absorbancia en la composición en partículas tratada con encapsulación que usó la composición C3 en partículas comparativa. Esto indica la ocurrencia de agregabilidad debido a interacciones con componentes sanguíneos. En la composición en partículas tratada con encapsulación (composición en partículas encapsulada en ARNsi) que utilizó la composición 4 en partículas, casi no se observó aumento en la absorbancia debido al tratamiento con FBS.

El gráfico de la figura 7 y la tabla 8 muestra la relación entre los valores absolutos de potencial zeta de las composiciones en partículas tratadas con encapsulación medidas en la evaluación 5b y la agregabilidad en la sangre de las composiciones en partículas tratadas con encapsulación medidas en la evaluación 5d.

[Tabla 8]

Composición en partículas utilizada	Agregación en sangre	Potencial zeta (mV)
Ninguno	0.118	-
3	0.092	1.93
4	0.132	2.63
5	0.142	4.67
6	0.153	6.17
7	0	0.37
8	0	0.95
9	0	0.57
10	0	0.96
C3	0.292	55.1

Como se muestra en la figura 7 y la Tabla 8, las composiciones en partículas tratadas con encapsulación tenían una agregabilidad en sangre marcadamente baja cuando los valores absolutos del potencial zeta de los mismos eran 5mV o más bajos, 3mV o más bajos, además 2mV o más bajos y específicamente 1mV o más bajos.

[Evaluación 5e: Evaluación de la tasa restante en sangre]

En la evaluación 5e, se utilizaron las composiciones en partículas 3 a 10 como composición en partículas y F-ARNsi(Luc) como ARNsi y se sometieron al tratamiento de encapsulación de ARNsi para obtener la relación de carga de 8 en el método descrito en el Ejemplo 5. Para la composición 4 en partículas, se llevó a cabo también el tratamiento con encapsulación de ARNsi con el fin de obtener la relación de carga de 1, 2 y 4. A las composiciones en partículas encapsuladas en ARNsi así preparadas, se les adicionó una solución acuosa de cloruro de sodio 3M a una relación en volumen de 1/20 para preparar una solución isotónica (muestra de composición en partículas tratada con encapsulación de ARNsi) que contiene cloruro de sodio 150 mM. Como control, a una solución de ARNsi 10 μ M preparada disolviendo F-ARNsi(Luc) en una solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4), se le adicionó una solución acuosa 3M de cloruro de sodio a una relación en volumen de 1/20 para preparar una solución isotónica (muestra única de ARNsi) que contiene 150 mM de cloruro de sodio. Las muestras de la composición en partículas encapsuladas en ARNsi y la única muestra de ARNsi se administraron a ratones Balb/c (preparados a partir de Charles River Laboratories Japan, Inc.) a través de la vena de la cola y se recogieron 200 μ L de sangre a través de la vena cava inferior una hora después. La dosificación de cada muestra para cada ratón se determinó de manera que la relación de F-ARNsi con el peso del ratón fuera de 1 mg/kg.

La sangre recogida de cada uno de los individuos que recibieron una muestra derivada de las composiciones en partículas 3 a 6 se centrifugó con 2000xg a 4°C, durante 10 minutos y se recogieron 80 μ L de plasma del sobrenadante. El plasma se midió para la intensidad de fluorescencia utilizando un lector de placas (POWERSCAN HT, fabricado por

5 Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) (longitud de onda de excitación: 485 nm, longitud de onda de fluorescencia: 528 nm) para determinar la cantidad de F-ARNsi circulante en sangre. La sangre recogida de cada uno de los individuos que recibieron una muestra derivada de las composiciones en partículas 7 a 10 se centrifugó con 2000xg a 4°C, durante 10 minutos y se recogieron 100 µL de plasma del sobrenadante. Al plasma, se le adicionó un mL de Sepasol ARN I (Nakalai Tesque), se mezcló en el vórtex y se dejó reposar durante 5 minutos. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, se mezclaron por inversión y se dejó reposar durante 3 minutos. La solución se centrifugó con 2000xg a 4°C, durante 10 minutos y se midieron 300 µL del sobrenadante preparado para determinar la intensidad de fluorescencia utilizando un lector de placas (POWERSCAN HT, fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) (longitud de onda de excitación: 485 nm; longitud de onda de fluorescencia: 528 nm) para determinar la cantidad de F-ARNsi que circula en la sangre.

[Tabla 9]

Composición en partículas utilizada	Relación de carga (+/-)	Potencial zeta (mV)	Tasa restante en sangre en relación con la dosificación de F-ARNsi (%)
Ninguno (F-ARNsi solo)	-	-	<0.4
3	8	1.93	5.2
4	8	2.63	4.3
5	8	4.67	3.0
6	8	6.17	2.3
7	8	0.37	37.9
8	8	0.95	0.9
9	8	0.567	15.5
10	8	0.96	2.8

[Tabla 10]

Composición en partículas utilizada	Relación de carga (+/-)	Tasa restante en sangre en relación con la dosificación de F-ARNsi (%)
4	1	0.46
4	2	1.2
4	4	3.6
4	8	4.3

15 Como se muestra en la Tabla 9, el 0.9% o más de F-ARNsi permaneció en sangre para las composiciones en partículas encapsuladas en ARNsi preparadas utilizando las composiciones en partículas 3 a 10. La tasa restante de F-ARNsi fue más alta a medida que la relación en peso de las unidades de copolímero de bloques al lípido cargado se hacen mayores en las composiciones en partículas encapsuladas con ARNsi. Esto significa que cuando se supone que el contenido del lípido cargado en la composición en partículas es constante, el período de retención del fármaco en la sangre se hace más largo a medida que aumenta la densidad de la región formada por los segmentos de la cadena de polímeros hidrófilos. Además, cuanto más bajo sea el valor absoluto del potencial zeta de la muestra, la tasa restante de F-ARNsi se vuelve más alta. Por ejemplo, la tasa restante de F-ARNsi de una muestra preparada utilizando la composición 7 en partículas que tiene el valor absoluto de potencial zeta de 0.37 mV fue del 37.9%, mientras que la tasa

5 restante de F-ARNsi de una muestra preparada utilizando la composición 9 en partículas que tenía el valor absoluto de potencial zeta de 0.57 mV fue del 15.5%. Como se muestra en la Tabla 10, la tasa restante de F-ARNsi fue más alta a medida que la relación de carga en las composiciones en partículas encapsuladas con ARNsi se hizo más alta. Esto significa que cuanto más cantidad de lípido cargado se adicione, se hace más largo el período en el que las partículas pueden retener el fármaco en sangre.

10 Para una muestra preparada llevando a cabo el tratamiento de encapsulación para obtener la relación de carga de 1.5 utilizando la composición 6 en partículas como la composición en partículas y ARNsi(Luc) como el ARNsi en el método descrito en el ejemplo 5, el potencial zeta se midió en el método descrito en la evaluación 5b. El valor absoluto fue de 0.36 mV, que era casi igual a la muestra preparada utilizando la composición 7 en partículas. Sin embargo, para una muestra (potencial zeta: 0.36 mV) preparada realizando el tratamiento de encapsulación sobre la composición 6 en partículas utilizando F-ARNsi(Luc) como el ARNsi en el método descrito en la evaluación 5e, se evaluó la tasa restante en sangre y se encontró que la cantidad de F-ARNsi que permanecía en la sangre era de 0.91%. De este modo, mientras que la muestra preparada utilizando la composición 7 en partículas tenía aproximadamente el mismo valor absoluto del potencial zeta que la muestra preparada utilizando la composición 6 en partículas, tenía una tasa de retención marcadamente excelente del fármaco encapsulado en la sangre. Por lo tanto, al formar la composición en partículas con polímeros aniónicos, la tasa de retención del fármaco encapsulado en la sangre se puede aumentar significativamente en comparación con cuando la composición en partículas se formó con polímeros neutros.

[Evaluación 5f: Evaluación de la migración de órganos]

20 En la evaluación 5f, se llevó a cabo el tratamiento de encapsulación del ARNsi utilizando la composición 3 en partículas y la composición 3 en partículas comparativa como la composición en partículas y F-ARNsi (Luc) como el ARNsi con el fin de obtener la relación de carga de 8 en el método descrito en el Ejemplo 5. A las composiciones en partículas tratadas con encapsulación así preparadas, se les adicionó una solución acuosa 3M de cloruro de sodio a una relación en volumen de 1/20 para preparar una solución isotónica (muestra de composición en partículas tratada con encapsulación) que contiene cloruro de sodio 150 mM. Se trasplantaron las células MDA-MB-231 derivadas de cáncer de mama humano a ratones desnudos Balb/c (hembra, de 5 semanas, preparadas de Charles River Laboratories Japan, Inc.). A ratones cuyo tamaño de tumor se convirtió en 200 mm² o más grande, cuatro semanas después, se les administró la muestra de composición en partículas tratada con encapsulación. La cantidad de F-ARNsi administrada se ajustó a 1 mg/kg de peso corporal de ratón. A los 10, 60 y 180 minutos después de la administración, se recogieron 50 a 100 µg de cada órgano, a los que se adicionó un mL cada uno del reactivo de extracción de ARN Sepasol ARN I (Nakalai Tesque) y se homogeneizó. A 500 µL de cada homogeneizado, se le adicionaron 100 µL de cloroformo y se centrifugaron a 4°C, 5200G durante 10 minutos. A continuación, se midieron 200 µL del sobrenadante preparado para la intensidad de fluorescencia utilizando un lector de placas (POWERSCAN HT, fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) (longitud de onda de excitación: 485 nm, longitud de onda de fluorescencia: 528 nm) para determinar la cantidad de F-ARNsi que emigraron en cada órgano.

35 [Tabla 11]

Composición en partículas usadas	Tiempo después de la administración (min)	Tasa de migración (%)					
		Sangre	Tumor	Hígado	Pulmón	Riñón	Bazo
4	10	10.8	0.3	8.1	15.0	2.3	19.0
	60	0.9	n.d.	3.8	0.7	0.6	9.9
	180	0.8	n.d.	0.7	0.3	0.1	1.7
C3	10	0.3	n.d.	0.6	178.9	0.7	0.5
	60	0.3	n.d.	1.2	103.1	0.2	0.4
	180	0.2	n.d.	0.5	56.7	n.d.	n.d.

* La tasa de migración indica la relación (%) del valor determinado de F-ARNsi per g del órgano a la cantidad administrada de F-ARNsi por cada ratón. "n.d." significa "no detectado".

40 La figura 8 indica gráficas para explicar la migración del fármaco a los órganos investigados en la evaluación 5f. Como se muestra en la figura 7 y la Tabla 11, la composición en partículas tratada con encapsulación preparada utilizando la composición C3 en partículas comparativa desapareció rápidamente de la sangre y se observó su acumulación significativa en el pulmón. Por otra parte, la composición en partículas encapsulada con ARNsi, preparada utilizando la

composición 4 en partículas permaneció en sangre durante un período de tiempo mucho más largo, y también se observó su migración al tumor.

Aplicabilidad industrial

5 La composición en partículas de la presente invención se puede utilizar como un portador de fármaco para preparar una composición farmacéutica encapsulada de fármaco, con lo cual el fármaco (específicamente un compuesto polimérico) puede retenerse más eficazmente in vivo y protegido contra la descomposición o excreción, El fármaco puede ser suministrado a la zona afectada manteniendo su actividad. Además, se puede evitar la agregabilidad del soporte de fármaco debido a la interacción con los componentes de la sangre. Estas características mejorarían enormemente la disponibilidad de fármacos y, de este modo, servirían para reducir significativamente la dosificación, lo que conduciría a una mejora de la economía médica y una expresión eficaz de los efectos fisiológicos. La reducción de la dosificación también sería útil para controlar los efectos secundarios, tales como la inducción de respuestas inmunitarias a, por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos, así como efectos adversos sobre el sistema de coagulación sanguínea.

Listado de secuencias

<110> NanoCarrier Co., Ltd.

15 <120> COMPOSICIÓN DE PARTICULAS Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE LAS MISMAS

<130> Y660-PCT

<150> JP2009-200681

<151> 2009-08-31

<160> 4

20 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

25 <220>

<223> una hebra de sentido de un ARNsi bicatenario diseñado para dirigir el gen Firefl y Luciferasa

<220>

<221> característica_misc

<222> (20)..(20)

30 <223> n representa desoxitimidina

<220>

<221> característica_misc

<222> (21)..(21)

<223> n representa desoxitimidina

35 <400> 1

cuuacgcuga guacuucgan n 21

<210> 2

<211> 21

- <212> ARN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> una hebra antisentido de un ARNsi bicatenario diseñado para dirigir el gen firefly luciferasa
- 5 <220>
- <221> característica_misc
- <222> (20)..(20)
- <223> n representa desoxitimidina
- <220>
- 10 <221> característica_misc
- <222> (21)..(21)
- <223> n representa desoxitimidina
- <400> 2
- ucgaaguacu cagcguaagn n 21
- 15 <210> 3
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> una hebra de sentido de un ARNsi bicatenario diseñado para dirigir el gen quinasa 1 similar a Polo humano
- <220>
- <221> característica_misc
- <222> (20)..(20)
- <223> n representa desoxitimidina
- 25 <220>
- <221> característica_misc
- <222> (21)..(21)
- <223> n representa desoxitimidina
- <400> 3
- 30 ccuuuacga gcugcuuaan n 21
- <210> 4
- <211> 21
- <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> una hebra antisentido de un ARNsi bicatenario diseñado para dirigir el gen quinasa 1 similar a Polo humano

<220>

5 <221> característica_misc

<222> (20)..(20)

<223> n representa desoxitimidina

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (21)..(21)

<223> n representa desoxitimidina

<400> 4

uuaagcagcu cguuaauggn n 21

REIVINDICACIONES

1. Una composición en partículas para encapsular un fármaco en este, que comprende:

5 una unidad de copolímero de bloques que tiene un segmento de la cadena de polímeros hidrófobos y un segmento de la cadena de polímeros hidrófilos, una pluralidad de unidades de copolímero de bloques estando dispuesta radialmente con los segmentos de la cadena de polímeros hidrófobos radialmente dentro y los segmentos de la cadena de polímeros hidrófilos radialmente afuera; y

10 un lípido cargado que lleva una carga opuesta a la carga del fármaco que se va a encapsular en la composición de modo que el fármaco se retenga dentro de la partícula por medio de la unión electrostática con el lípido cargado, que está atrayendo el lípido cargado al segmento de la cadena de polímeros hidrófobos, con lo cual se evita que la superficie externa de la partícula se cargue para atraer una sustancia que tiene una carga opuesta a la carga del lípido cargado,

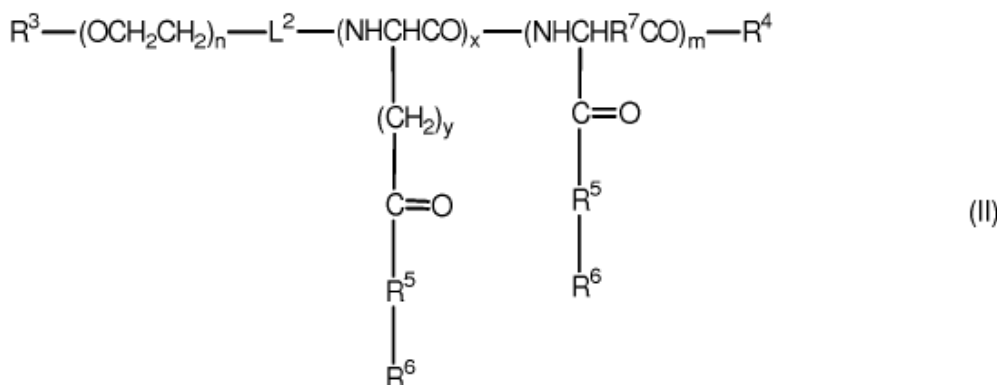
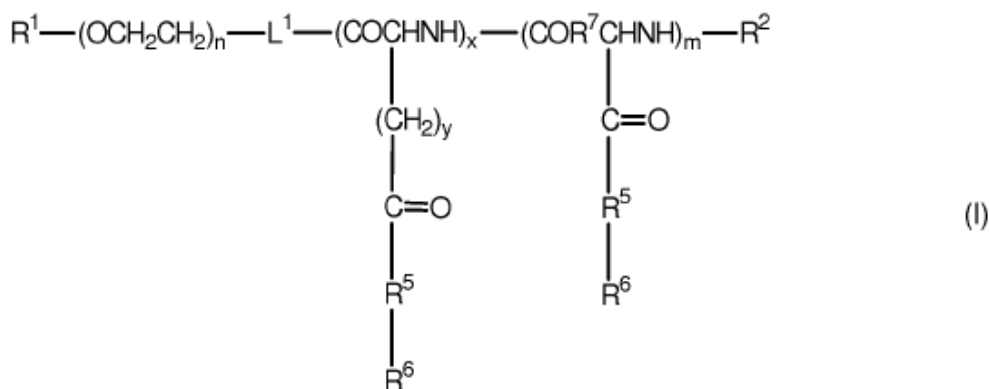
en donde la composición en partículas se aplica a un fármaco seleccionado entre péptidos, proteínas, cadenas de azúcares y ácidos nucleicos; y

15 en donde los lípidos cargados no están dispuestos contiguamente entre sí a lo largo de la circunferencia de la composición en partículas, sino que están dispuestos para intervenir entre las unidades de copolímero de bloques adyacentes a lo largo de la circunferencia de la composición en partículas, con lo cual los lípidos cargados adyacentes a lo largo de la circunferencia de la composición en partículas se separan por las unidades de copolímero de bloques y se les impide estar en contacto entre sí.

20 2. La composición en partículas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el segmento de la cadena de polímeros hidrófilos es una cadena de polietilenglicol y el segmento de la cadena de polímeros hidrófobos es una cadena de poliaminoácido.

3. La composición en partículas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el segmento de la cadena de polímeros hidrófobos es un segmento de la cadena de polímeros aniónico.

25 4. La composición en partículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el segmento hidrófobo de la cadena de polímeros está representado por la fórmula general (I) o (II):



en donde

- 5 R^1 y R^3 , independientemente uno del otro, es ya sea un átomo de hidrógeno o un grupo representado por $R^8(R^9)CH(CH_2)_q-$, donde R^8 y R^9 (i) independientemente uno del otro, es átomo de hidrógeno, grupo alcoxi C_{1-6} , grupo ariloxi, grupo aril-oxi C_{1-3} , grupo ciano, grupo carboxi, grupo amino, grupo alcoxi C_{1-6} carbonilo, grupo acilamida C_{2-7} , grupo tri-alquilo C_{1-6} siloxi, grupo siloxi, o grupo sililamino, (ii) forman entre sí grupo etileno dioxi o grupo propileno dioxi, que son ya sea no sustituido o sustituido con un grupo alquilo C_{1-3} , o (iii) junto con un grupo CH al que están unidos, forman grupo formilo, y q es un número entero desde 0 a 10;
- R^2 es átomo de hidrógeno, grupo carbonilo alifático C_1-C_{29} saturado o insaturado, o grupo arilcarbonilo;
- R^4 es grupo hidroxilo, grupo oxo alifático C_1-C_{30} saturado o insaturado, o grupo aril-alquilo inferior;
- 10 R^5 es -O- o -NH-;
- R^6 es átomo de hidrógeno, grupo fenilo, grupo bencilo, grupo $-(CH_2)_4-$ fenilo, grupo alquilo C_4-C_{16} que es ya sea no sustituido o sustituido con un grupo amino o grupo carbonilo, o residuo de derivado de esteroles;
- R^7 es grupo metileno;
- n es un número entero desde 55 a 4,600;
- 15 x es un número entero desde 10 a 200;
- m es un número entero desde 0 a 200, en donde cuando m es uno o más, las unidades (COCHNH) y la(s) unidad(es) (COR⁷CHNH) pueden estar dispuestas en un orden aleatorio en el copolímero de bloques, y cuando m es dos o más, R^6 se selecciona para cada unidad de aminoácido independientemente uno del otro y pueden estar dispuestas en un orden aleatorio en el copolímero de bloques, con la condición de que los átomos de hidrógeno no excedan el 75% de R^6 ;
- 20 y es 1 o 2;
- L^1 es un grupo de enlace seleccionado entre -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, -CH₂-, y -O-Z-S-Z-NH-, donde Z, independientemente uno del otro, es grupo alquilenos C_1-C_6 ; y
- L^2 es un grupo de enlace seleccionado entre -OCO-Z-CO- y -NHCO-Z-CO-, donde Z es un grupo alquilenos C_1-C_6 .
- 25 5. La composición en partículas de acuerdo con la reivindicación 4, en donde en las fórmulas generales (I) y (II), R^5 es -O- y R^6 es un grupo bencilo, $-(CH_2)_4$ -fenilo, o un grupo alquilo C_4-C_{16} que es ya sea no sustituido o sustituido con un grupo amino o grupo carbonilo.
- 30 6. La composición en partículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el valor absoluto del potencial zeta de la composición en partículas está limitado a 15mV o más bajo con lo cual se evita que la composición se agregue en sangre, midiéndose el potencial zeta cuando a la composición se le adiciona una solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) en dicha cantidad que la relación de los lípidos totales cargados a la solución reguladora es de 0.1 mg/mL.
7. La composición en partículas de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el valor absoluto del potencial zeta de la composición en partículas se limita a 3 mV o más bajo, con lo cual se evita adicionalmente que la composición se agregue en sangre.
- 35 8. Una composición farmacéutica que comprende: una composición en partículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y un fármaco que está encapsulado en la composición en partículas y lleva una carga opuesta a la carga del lípido cargado, en donde el fármaco se selecciona entre péptidos, proteínas, cadenas de azúcar y ácidos nucleicos.
- 40 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el valor absoluto del potencial zeta de la composición en partículas está limitado a 10 mV o más bajo, con lo cual se evita que la composición se agregue en sangre, midiéndose el potencial zeta cuando a la composición se le adiciona una solución reguladora HEPES 10 mM (pH 7.4) en dicha cantidad que la relación de los lípidos totales cargados a la solución reguladora es de 0.1 mg/mL.
- 45 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el valor absoluto del potencial zeta de la composición en partículas está limitado a 2mV o más bajo, con lo cual se evita adicionalmente que la composición se agregue en sangre.

11. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el segmento de la cadena de polímeros hidrófobos está formado con un segmento de la cadena de polímeros aniónico, con lo cual se aumenta la tasa de retención del fármaco.

Fig.1

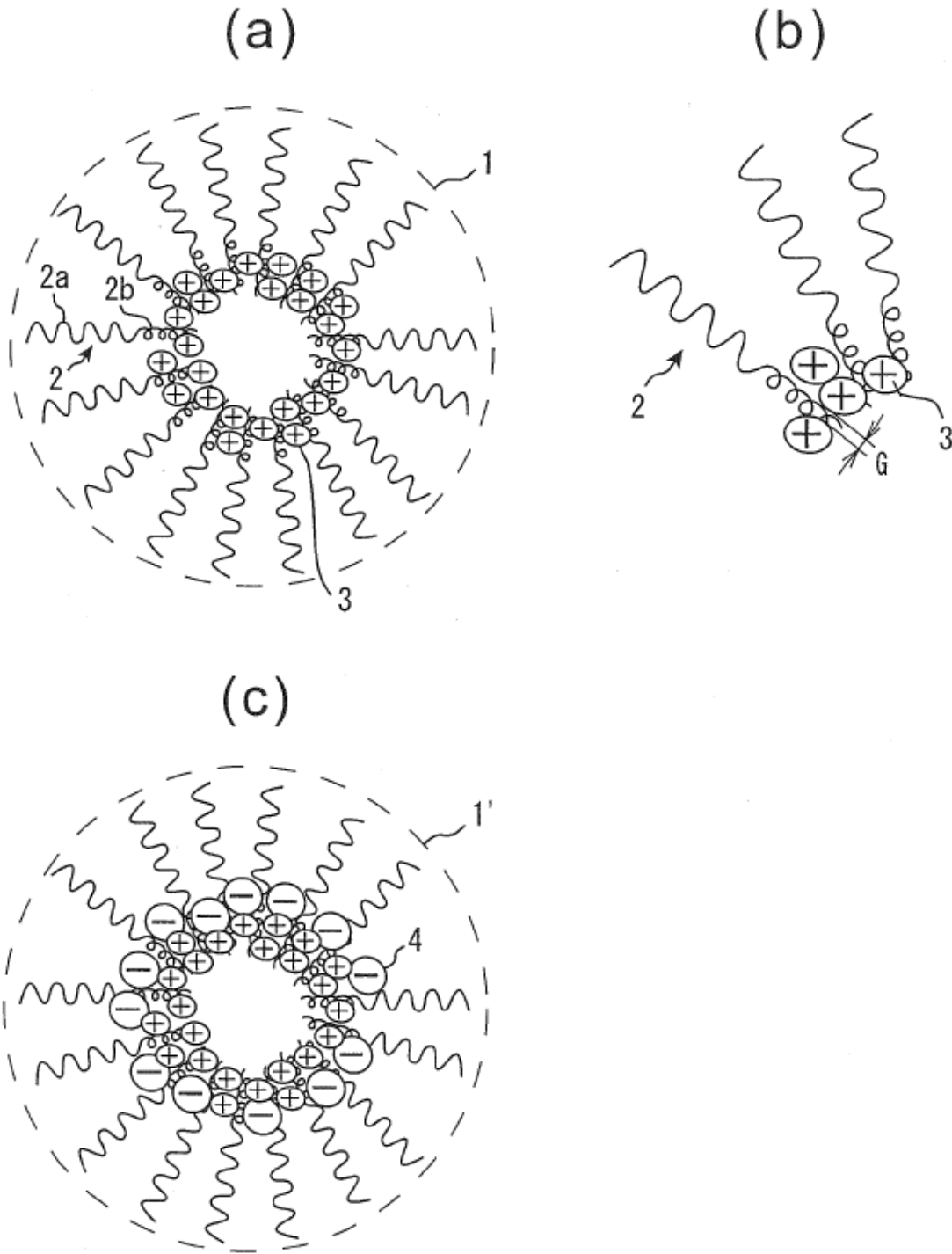


Fig.2

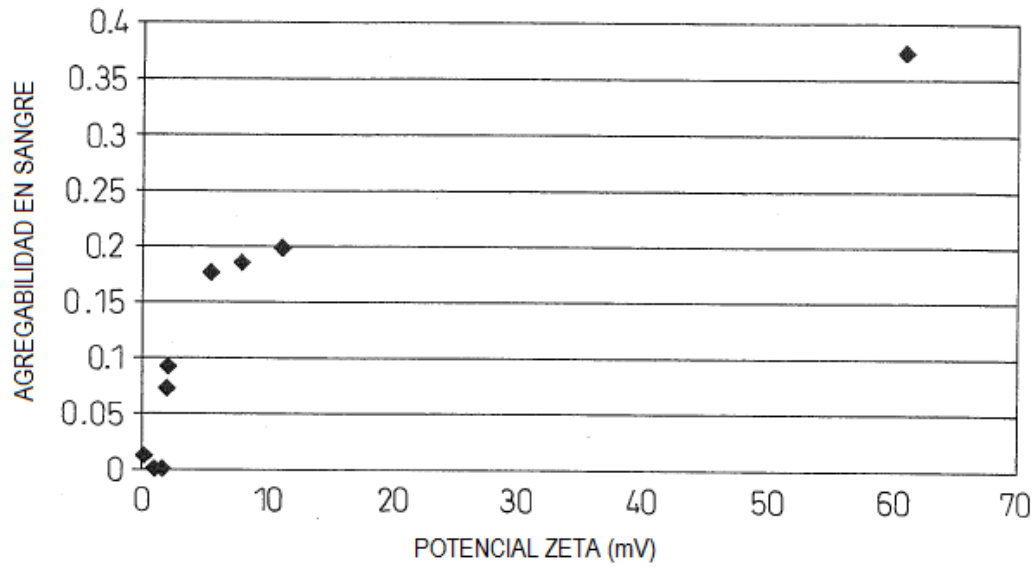


Fig.3

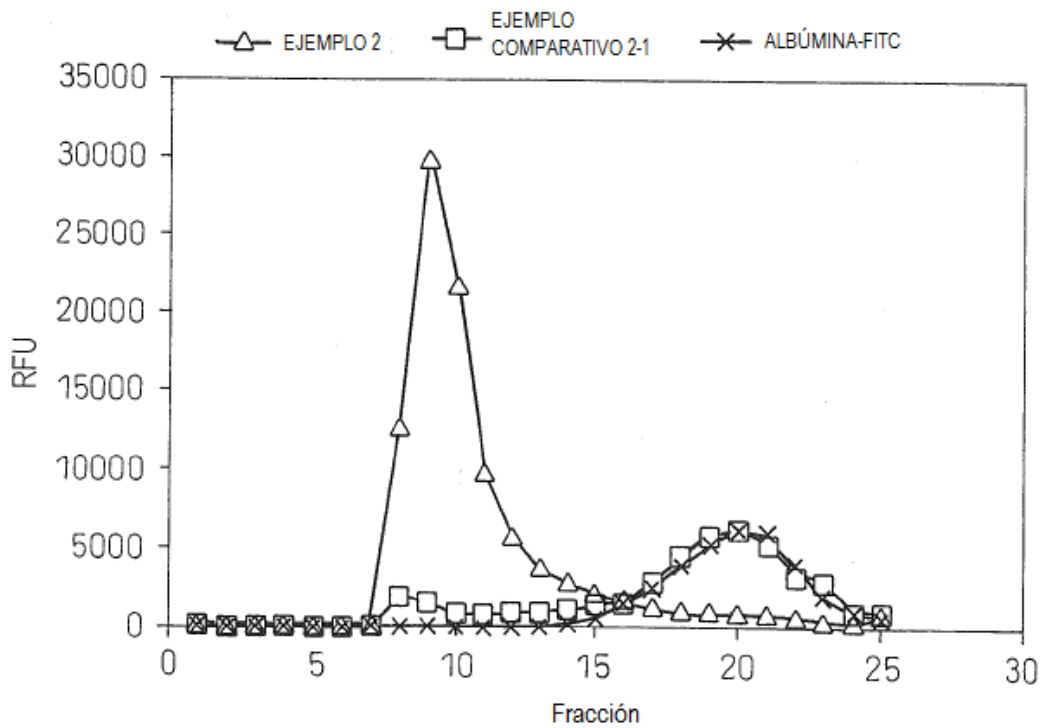


Fig.4

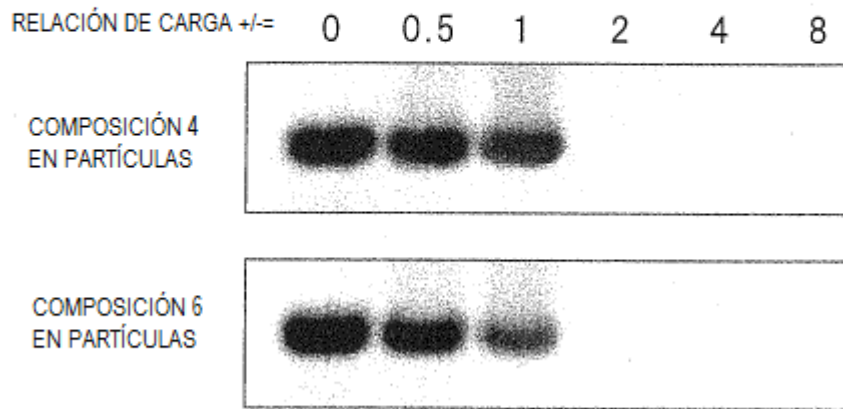


Fig.5

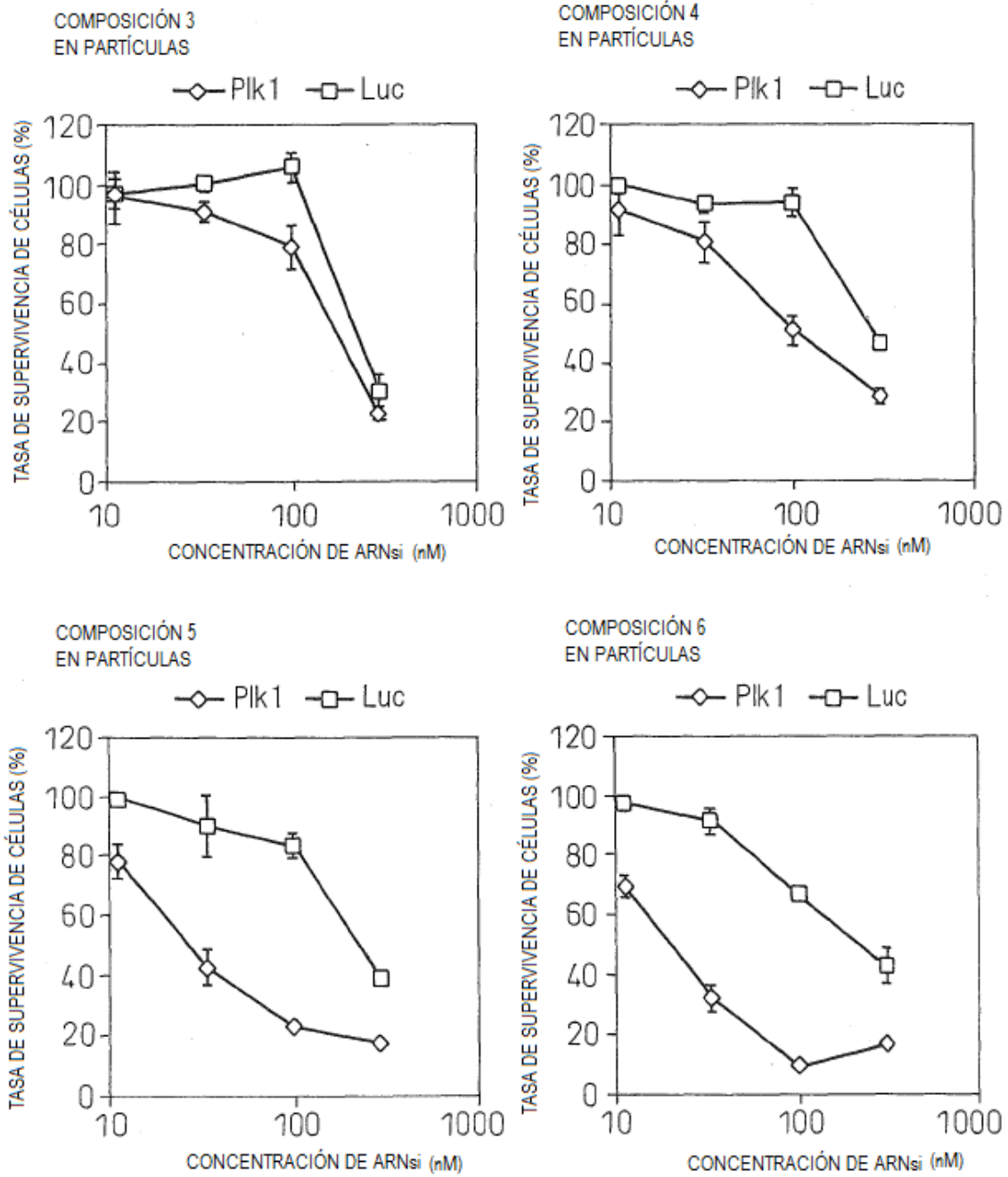


Fig.6

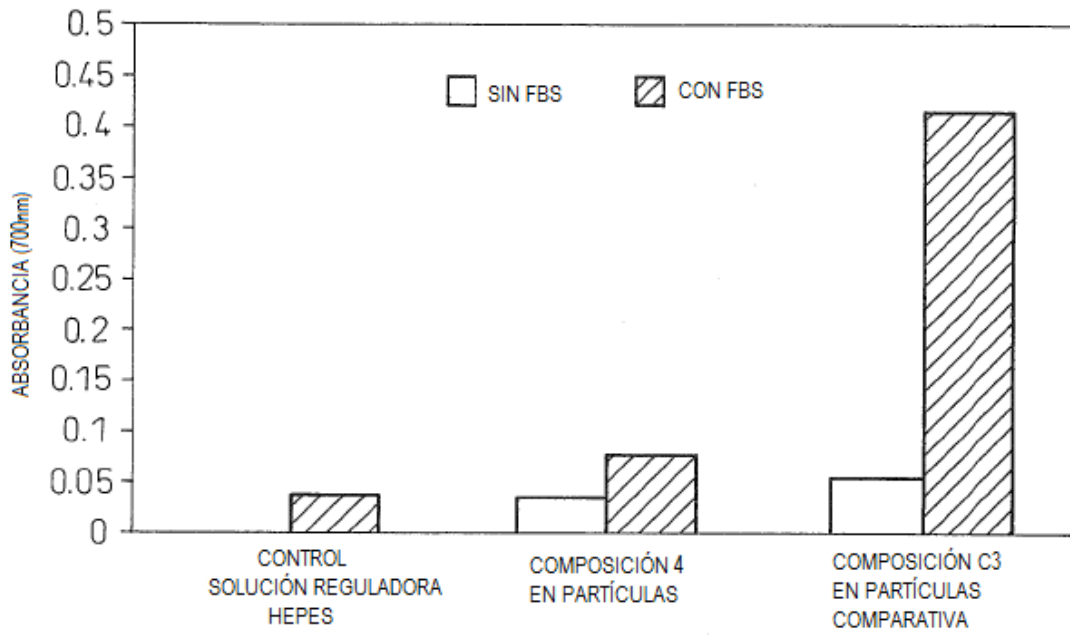


Fig.7

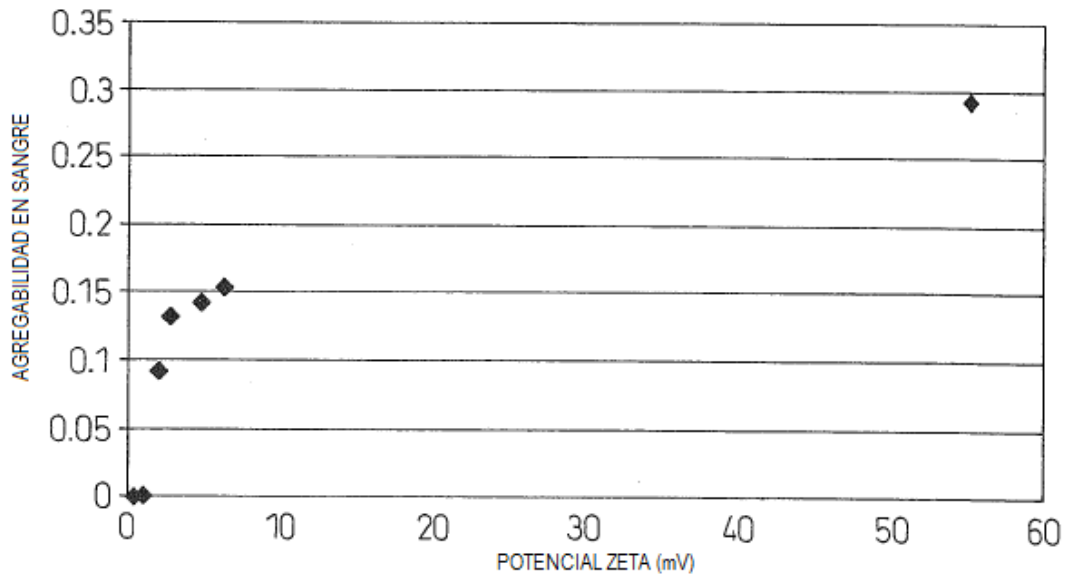


Fig.8

