

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 056**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 47/42** (2007.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2013 PCT/JP2013/078497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14065245**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2013 E 13848530 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2910564**

54 Título: **Péptido sensible a pH débilmente ácido y liposoma que contiene el mismo**

30 Prioridad:  
**22.10.2012 JP 2012233011**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.07.2017**

73 Titular/es:  
**TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)  
1-27, Kandanishiki-cho  
Chiyoda-ku, Tokyo 101-8444, JP**

72 Inventor/es:  
**KOGURE, KENTARO y  
HAMA, SUSUMU**

74 Agente/Representante:  
**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**Observaciones :**

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

**ES 2 627 056 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**

Péptido sensible a pH débilmente ácido y liposoma que contiene el mismo

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido sensible a pH débilmente ácido y a un liposoma que contiene el péptido.

**10 Técnica anterior**

En la quimioterapia contra el cáncer, se han realizado intentos para desarrollar un DDS para mejorar la especificidad; sin embargo, casi ninguno de estos intentos se centra en el entorno del tumor. Específicamente, los tejidos tumorales están en un entorno especial que tiene un pH (un pH alrededor de 6,5) menor que el de las condiciones fisiológicas (un pH alrededor de 7,4). Sin embargo, no se han desarrollado todavía vehículos de administración de fármacos que actúen de manera específica para tejido tumoral de tal modo que respondan a este pequeño cambio de pH. Hasta ahora, en previsión del efecto EPR (efecto de permeación y retención mejoradas), se ha usado polietilenglicol (PEG), que es una macromolécula hidrófila, para modificar la superficie de los liposomas, etc., y se han usado los liposomas modificados como vehículos de, por ejemplo, fármacos antineoplásicos (por ejemplo, Bibliografía de patente (PTL) 1). Sin embargo, la liberación de fármacos de un vehículo modificado por PEG de este tipo tras la administración a tejidos tumorales es limitante de la velocidad, y el fármaco no puede liberarse de manera eficaz en los tejidos tumorales. El complejo péptido-liposoma divulgado en el documento PTL 2 conserva una carga positiva debido a la presencia de aminoácidos básicos (lisina o arginina) en la región N-terminal, y no se produce un cambio en la carga dependiendo del pH; no pueden esperarse por tanto propiedades de circulación en sangre suficientes.

El documento no de patente (NPL) 1 usa segmentos de His como región sensible al pH. Según la técnica divulgada en el documento NPL 1, una disminución drástica en el pH del entorno externo desde 7,4 hasta 5,0 hace que una His neutra se cargue positivamente, y la repulsión electrostática así aumentada produce la lisis de las micelas. Sin embargo, una His no se protonaría suficientemente sola a un pH débilmente ácido de 6,5; por tanto, es difícil producir inversión de carga. Por este motivo, no puede esperarse la liberación de fármacos asociada con la lisis de micelas a un pH de 6,5.

El documento NPL 2 divulga micelas sensibles a pH cuya carga superficial cambia de negativa a positiva cuando se disocia ácido dimetilmaleico unido químicamente a un segmento de lisina en una posición terminal de un polímero de bloque debido a una disminución en el pH. En el péptido divulgado en el documento NPL 2, la disociación del ácido dimetilmaleico produce la exposición de residuos de lisina cargados positivamente; aunque se aumente el pH, un estado de este tipo no vuelve al estado original.

Bioconjugate Chem. 2011, 22, 1410-1415) analiza el diseño de un péptido de penetración celular activado por ácido para la administración de moléculas activas en células cancerosas y describe la preparación del mismo.

**Lista de referencias****45 Bibliografía de patente**

PTL 1: documento JP2004-10481A

PTL 2: documento JP2004-523531A

**50 Bibliografía no de patente**

NPL 1: AICHE Journal, vol. 56, n.º 7, 2010, págs. 1922-1931

55 NPL 2: International Journal of Pharmaceutics, 376, 2009, págs. 134-140

**Sumario de la invención****60 Problema técnico**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto peptídico para producir un vehículo de administración de fármacos capaz de liberar una sustancia diana en un entorno de pH débilmente ácido tal como tejidos cancerosos.

**65 Solución al problema**

La presente invención proporciona los siguientes puntos de (1) a (10), que se refieren a un compuesto peptídico, a un liposoma que comprende el compuesto peptídico, o a un agente de inducción de sustancia que usa el liposoma.

- 5 (1) Un compuesto peptídico que consiste en un bloque de aminoácidos hidrófilo y un bloque de aminoácidos hidrófobo;
- [1] conteniendo el compuesto peptídico de 24 a 36 aminoácidos en total;
- 10 [2] conteniendo el bloque de aminoácidos hidrófilo de 4 a 10 aminoácidos en total y teniendo un índice de hidropatía medio de -3,0 a -1,0; y
- [3] conteniendo el bloque de aminoácidos hidrófobo de 20 a 32 aminoácidos en total, conteniendo uno o más residuos de His, y teniendo un índice de hidropatía medio de 1,0 a 2,5,
- 15 en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo consiste en aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de 0 o menos y el bloque de aminoácidos hidrófobo consiste en uno o más residuos de His y aminoácidos que tienen un índice de hidropatía mayor de 0 y
- 20 en el que los aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de -3,0 o menos no son adyacentes entre sí en el bloque de aminoácidos hidrófobo cuando el bloque de aminoácidos hidrófobo comprende dos o más aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de -3,0 o menos.
- (2) El compuesto peptídico según (1), en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo tiene un índice de hidropatía medio de -2,0 a -1,5; y
- 25 el bloque de aminoácidos hidrófobo tiene un índice de hidropatía medio de 1,5 a 2,0.
- (3) El compuesto peptídico según (1) o (2), en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo comprende un aminoácido que tiene un índice de hidropatía de -3,0 o menos y un aminoácido que tiene un índice de hidropatía de 0 a -1,0; y
- 30 el bloque de aminoácidos hidrófobo comprende His y un aminoácido que tiene un índice de hidropatía mayor de 0.
- (4) El compuesto peptídico según uno cualquiera de (1) a (3), en el que los aminoácidos que constituyen el bloque de aminoácidos hidrófilo son His o Glu, y Gly; y
- 35 los aminoácidos que constituyen el bloque de aminoácidos hidrófobo son His y al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ala, Met, Cys, Phe, Val e Ile.
- (5) El compuesto peptídico según uno cualquiera de (1) a (4), en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo tiene una secuencia peptídica que contiene de 0 a 5 residuos de His; y
- 40 el bloque de aminoácidos hidrófobo tiene una secuencia peptídica que contiene de 1 a 8 residuos de His.
- (6) El compuesto peptídico según uno cualquiera de (1) a (5), en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo está representado por la siguiente fórmula (I):
- 45 (AA<sub>1</sub>) (AA<sub>2</sub>) (AA<sub>3</sub>) (AA<sub>4</sub>) (I)
- 50 en la que dos cualesquiera de AA<sub>1</sub>, AA<sub>2</sub>, AA<sub>3</sub> y AA<sub>4</sub> son His o Glu, y los otros dos son Gly; y
- el bloque de aminoácidos hidrófobo contiene de 5 a 8 unidades representadas por la siguiente fórmula (II):
- (AA<sub>5</sub>) (AA<sub>6</sub>) (AA<sub>7</sub>) (AA<sub>8</sub>) (II)
- 55 en la que AA<sub>5</sub>, AA<sub>6</sub>, AA<sub>7</sub> y AA<sub>8</sub> son iguales o diferentes, y representan cada uno His, Leu o Ala, con la condición de que al menos una de las unidades de la fórmula (II) contenga uno o dos residuos de His; cada unidad puede tener la misma o diferente secuencia de aminoácidos.
- (7) Un compuesto peptídico que consiste en un bloque de aminoácidos hidrófilo y un bloque de aminoácidos hidrófobo;
- 60 [1] consistiendo el compuesto peptídico en de 24 a 36 aminoácidos en total;
- [2] consistiendo el bloque de aminoácidos hidrófilo en de 4 a 10 aminoácidos en total y teniendo un índice de hidropatía medio de -3,0 a -1,0; y
- 65

[3] consistiendo el bloque de aminoácidos hidrófobo en de 20 a 32 aminoácidos en total, conteniendo uno o más residuos de His, y teniendo un índice de hidropatía medio de 1,0 a 2,5,

en el que el bloque de aminoácidos hidrófobo contiene de 5 a 8 unidades representadas por la siguiente fórmula (II):

(AA<sub>5</sub>) (AA<sub>6</sub>) (AA<sub>7</sub>) (AA<sub>8</sub>) (II)

en la que AA<sub>5</sub>, AA<sub>6</sub>, AA<sub>7</sub> y AA<sub>8</sub> son iguales o diferentes, y representan cada uno His, Leu o Ala, con la condición de que dos residuos de His entre las unidades o en cada unidad no sean adyacentes entre sí cuando el bloque de aminoácidos hidrófobo contiene dos o más residuos de His; y cada unidad puede tener la misma o diferente secuencia de aminoácidos

en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo consiste en aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de 0 o menos y el bloque de aminoácidos hidrófobo consiste en uno o más residuos de His y aminoácidos que tienen un índice de hidropatía mayor de 0.

(8) Un liposoma que comprende el compuesto peptídico según uno cualquiera de (1) a (7), y un lípido.

(9) El liposoma según (8), en el que el liposoma comprende del 1 al 10 % en moles del compuesto peptídico según uno cualquiera de (1) a (7) basado en la cantidad total de lípidos en el liposoma.

(10) El liposoma según (9), en el que el liposoma es un liposoma catiónico.

(11) El liposoma según uno cualquiera de (10), en el que el liposoma encapsula una sustancia diana.

(12) Una composición farmacéutica que comprende el liposoma según uno cualquiera de (8) a (11).

(13) Un agente antitumoral que comprende el liposoma según uno cualquiera de (8) a (11).

(14) El liposoma según uno cualquiera de (8) a (11), para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer.

### Efectos ventajosos de la invención

La presente invención puede proporcionar un liposoma capaz de liberar una sustancia diana de bajo peso molecular encapsulada en un entorno celular débilmente ácido (un pH de aproximadamente 6,5), mientras que no se libera la sustancia diana en condiciones fisiológicas (un pH de aproximadamente 7,4).

El liposoma de la presente invención puede liberar una sustancia diana en la región débilmente ácida anteriormente mencionada para hacer que la sustancia actúe en la misma, y puede por tanto proporcionar un sistema de administración de fármacos excelente.

El liposoma de la presente invención puede conservar la sustancia diana encapsulada en condiciones fisiológicas, es decir, pH 7,4, y puede responder de manera sensible incluso a un pH débilmente ácido de 6,5. Por este motivo, tras alcanzar un tumor como resultado del efecto EPR, se inducen la repulsión electrostática del bloque hidrófilo y/o una disminución en la interacción hidrófoba del bloque hidrófobo en condiciones débilmente ácidas en el entorno que rodea al tumor; el liposoma de la presente invención libera de este modo la sustancia diana encapsulada. Como tal, el liposoma de la presente invención es altamente útil.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra los resultados de HPLC del compuesto peptídico 1 (SEQ ID NO: 1) obtenido en el ejemplo 1.

La figura 1B muestra los resultados de MALDI-TOF-MS del compuesto peptídico 1 (SEQ ID NO: 1) obtenido en el ejemplo 1.

La figura 2A muestra los resultados de HPLC del compuesto peptídico 2 (SEQ ID NO: 2) obtenido en el ejemplo 2.

La figura 2B muestra los resultados de MALDI-TOF-MS del compuesto peptídico 2 (SEQ ID NO: 2) obtenido en el ejemplo 2.

La figura 3A muestra los resultados de HPLC del compuesto peptídico 3 (SEQ ID NO: 3) obtenido en el ejemplo 3.

La figura 3B muestra los resultados de MALDI-TOF-MS del compuesto peptídico 3 (SEQ ID NO: 3) obtenido en el ejemplo 3.

La figura 4A muestra los resultados de HPLC del compuesto comparativo 1 (SEQ ID NO: 4) obtenido en el ejemplo

comparativo 1.

La figura 4B muestra los resultados de MALDI-TOF-MS del compuesto comparativo 1 (SEQ ID NO: 4) obtenido en el ejemplo comparativo 1.

La figura 5A muestra los resultados de HPLC del compuesto comparativo 2 (SEQ ID NO: 5) obtenido en el ejemplo comparativo 2.

La figura 5B muestra los resultados de MALDI-TOF-MS del compuesto comparativo 2 (SEQ ID NO: 5) obtenido en el ejemplo comparativo 2.

La figura 6A muestra los resultados de HPLC del compuesto comparativo 3 (SEQ ID NO: 6) obtenido en el ejemplo comparativo 3.

La figura 6B muestra los resultados de MALDI-TOF-MS del compuesto comparativo 3 (SEQ ID NO: 6) obtenido en el ejemplo comparativo 3.

La figura 7 muestra los resultados de medición de la tasa de escape del fármaco encapsulado del liposoma 1 con calceína encapsulada en diferentes condiciones de pH.

La figura 8 muestra los resultados de medición de la tasa de escape del fármaco encapsulado del liposoma 1 con dextrano encapsulado marcado con rojo Texas en diferentes condiciones de pH.

La figura 9 muestra los resultados de medición de las tasas de escape del fármaco encapsulado del liposoma 1 con calceína encapsulada y dextrano marcado con rojo Texas en diferentes condiciones de pH.

La figura 10 muestra los espectros de CD del compuesto peptídico 1 solo, y los espectros de CD de un liposoma con péptido introducido.

La figura 11 muestra los efectos antitumorales de doxorubicina (Dox) sola y los efectos antitumorales de un liposoma con Dox encapsulada en el ejemplo de prueba 5.

### Descripción de realizaciones

El liposoma de la presente invención comprende un compuesto peptídico y un componente de formación de liposomas.

El compuesto peptídico de la presente invención consiste en un bloque de aminoácidos hidrófilo y un bloque de aminoácidos hidrófobo, y contiene de 24 a 36, preferiblemente de 24 a 32, y más preferiblemente de 24 a 28 aminoácidos en total. El bloque de aminoácidos hidrófilo contiene de 4 a 10, y preferiblemente de 4 a 8 aminoácidos en total. El bloque de aminoácidos hidrófobo contiene de 20 a 32, y preferiblemente de 20 a 24 aminoácidos en total.

El compuesto peptídico de la presente invención consiste en un bloque de aminoácidos hidrófilo y un bloque de aminoácidos hidrófobo que están unidos mediante un enlace peptídico. Cualquiera de los bloques de aminoácidos puede situarse en el extremo N-terminal; sin embargo, es preferible que el bloque de aminoácidos hidrófilo se sitúe en el extremo N-terminal.

Además, el bloque de aminoácidos hidrófobo del compuesto peptídico de la presente invención tiene uno o más residuos de His; sin embargo, en lo que se refiere a la capacidad de respuesta a la acidez débil, es esencial que los aminoácidos, incluyendo la His, que tienen un índice de hidropatía de -3,0 o menos no sean adyacentes entre sí. Además, la secuencia del compuesto peptídico tiene preferiblemente de 1 a 13 residuos de His.

El bloque de aminoácidos hidrófilo y el bloque de aminoácidos hidrófobo, que constituyen el compuesto peptídico de la presente invención, tienen índices de hidropatía medios específicos. El índice de hidropatía de los aminoácidos usados en la presente invención se describe, por ejemplo, en J. Mol. Biol., (1982) 157, págs. 105-132, e indica el grado de hidrofobicidad específica para cada uno de los aminoácidos que constituyen los organismos (véase la tabla 1). El índice de hidropatía medio se describe, por ejemplo, en Molecular Medicine, 4: 240-257, 1998, y se obtiene dividiendo la suma de los índices de hidropatía de los aminoácidos en cada uno de los siguientes bloques por el número de aminoácidos.

Tabla 1

Aminoácido (abrev.)	Índice de hidropatía	Aminoácido	Índice de hidropatía
Isoleucina (Ile, I)	4,5	Serina (Ser, S)	-0,8
Valina (Val, V)	4,2	Tirosina (Tyr, Y)	-1,3
Leucina (Leu, L)	3,8	Prolina (Pro, P)	-1,6

Fenilalanina (Phe, F)	2,8	Histidina (His, H)	-3,2
Cisteína (Cys, C)	2,5	Ácido glutámico (Glu, E)	-3,5
Metionina (Met, M)	1,9	Glutamina (Gln, Q)	-3,5
Alanina (Ala, A)	1,8	Ácido asparagínico (Asp, D)	-3,5
Glicina (Gly, G)	-0,4	Asparagina (Asn, N)	-3,5
Treonina (Thr, T)	-0,7	Lisina (Lys, K)	-3,9
Triptófano (Trp, W)	-0,9	Arginina (Arg, R)	-4,5

En la presente invención, el bloque de aminoácidos hidrófilo comprende aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de 0 o menos, y el bloque de aminoácidos hidrófobo comprende His y un aminoácido que tiene un índice de hidropatía mayor de 0. Por tanto, el límite entre el bloque de aminoácidos hidrófilo y el bloque de aminoácidos hidrófobo se determina mediante el índice de hidropatía de los aminoácidos distintos de His. La His situada en el límite está contenida en el bloque de aminoácidos hidrófilo.

El bloque de aminoácidos hidrófilo que constituye el compuesto peptídico de la presente invención puede tener cualquier combinación de aminoácidos que tengan un índice de hidropatía medio de -3,0 a -1,0, y preferiblemente de -2,0 a -1,5. Se prefiere una combinación de un aminoácido que tenga un índice de hidropatía de -3,0 o menos y un aminoácido que tenga un índice de hidropatía de 0 a -1,0; se prefiere más una combinación de His o Glu, y Gly; e incluso se prefiere más una combinación de His y Gly. Además, la secuencia peptídica del bloque de aminoácidos hidrófilo tiene preferiblemente de 0 a 5 residuos de His. Más específicamente, se prefiere particularmente un bloque de aminoácidos hidrófilo representado por la siguiente fórmula (I):

(AA<sub>1</sub>) (AA<sub>2</sub>) (AA<sub>3</sub>) (AA<sub>4</sub>) (I)

en la que dos cualesquiera de AA<sub>1</sub>, AA<sub>2</sub>, AA<sub>3</sub> y AA<sub>4</sub> son His o Glu, y los otros dos son Gly (de manera particularmente preferible, dos cualesquiera son His, y los otros dos son Gly).

El bloque de aminoácidos hidrófobo que constituye el compuesto peptídico de la presente invención puede tener cualquier combinación de aminoácidos que tengan un índice de hidropatía medio de 1,0 a 2,5, y preferiblemente de 1,5 a 2,0. Se prefiere una combinación de His y un aminoácido que tenga un índice de hidropatía mayor de 0; se prefiere más una combinación de His y cualquier aminoácido seleccionado de Leu, Ala, Met, Cys, Phe, Val e Ile; y se prefiere particularmente una combinación de His y cualquiera de Leu y Ala, que son aminoácidos que probablemente tienen una estructura de hélice  $\alpha$ . Además, la secuencia peptídica del bloque de aminoácidos hidrófobo tiene preferiblemente de 1 a 8 residuos de His. Más específicamente, se prefiere particularmente un bloque de aminoácidos hidrófobo que contiene de 5 a 8 unidades representadas por la siguiente fórmula (II):

(AA<sub>5</sub>) (AA<sub>6</sub>) (AA<sub>7</sub>) (AA<sub>8</sub>) (II)

en la que AA<sub>5</sub>, AA<sub>6</sub>, AA<sub>7</sub> y AA<sub>8</sub> son iguales o diferentes, y representan cada uno His, Leu o Ala, con la condición de que dos residuos de His entre las unidades o en cada unidad no sean adyacentes entre sí; cada unidad puede tener la misma o diferente secuencia de aminoácidos.

Los ejemplos particularmente preferidos del compuesto peptídico de la presente invención incluyen los siguientes:

His-Gly-His-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-His-Ala-Leu-Leu-Ala-His-Ala-

Ala-Leu-Ala-His-Ala-Ala-Leu-Ala (SEQ ID NO: 1);

Gly-His-His-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-His-Ala-Leu-His-Leu-Ala-Ala-Ala-Ala-Leu-His-Ala-Ala-Ala-Leu-Ala (SEQ ID NO: 2); y

Glu-Gly-Glu-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-His-Ala-Leu-Leu-Ala-His-Ala-Ala-Leu-Ala-His-Ala-Ala-Leu-Ala (SEQ ID NO: 3).

El compuesto peptídico de la presente invención comprende esencialmente el bloque de aminoácidos hidrófilo y el bloque de aminoácidos hidrófobo anteriormente mencionados. No se considera que los compuestos peptídicos que comprenden solo bloques de aminoácidos hidrófobos induzcan un cambio estructural en los liposomas por el siguiente motivo: dichos compuestos peptídicos son captados por la región hidrófoba de los liposomas, y los protones no pueden entrar en los liposomas; por tanto, los compuestos peptídicos no responden ni siquiera cuando se acidifica el entorno circundante. Comparativamente, no pueden incorporarse en liposomas compuestos peptídicos que comprenden solo bloques de aminoácidos hidrófilos.

El compuesto peptídico de la presente invención puede tener un grupo protector C-terminal en el extremo C-terminal. El grupo protector C-terminal incluye un grupo que forma una amida con el átomo de carbono del grupo carboxilo C-terminal, o un grupo que forma un éster con el átomo de oxígeno del grupo carboxilo. Los ejemplos del grupo que forma un éster incluyen grupos alquilo, en particular grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> lineales o ramificados (grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), tales como metilo, etilo y propilo. Los ejemplos del grupo que forma una amida incluyen grupos funcionales de amina, tales como amino; y grupos funcionales de alquilamino, tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y otros grupos mono o di-alquilamino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>. Es preferible el grupo que forma una amida; es más preferible amino.

El compuesto peptídico de la presente invención puede producirse mediante un método de síntesis de péptidos conocido, en particular, un método de síntesis en fase líquida o un método de síntesis en fase sólida. También es posible sintetizar el compuesto peptídico de la presente invención mediante un método que comprende introducir ADN que codifica el compuesto peptídico de la presente invención en una célula huésped, y expresar el ADN, usando una técnica de recombinación génica. Por ejemplo, en la síntesis en fase sólida, puede obtenerse el compuesto peptídico de la presente invención como sigue: el grupo carboxilo de un aminoácido protegido en N, en el que el grupo amino del aminoácido correspondiente al extremo C-terminal está protegido con un grupo protector de uretano tal como el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), se une a una resina insoluble que tiene grupos amino; se retira entonces el grupo protector del grupo amino para condensar sucesivamente aminoácidos protegidos en la dirección N-terminal; y se retiran la resina insoluble y los grupos protectores de aminoácidos para obtener de este modo el compuesto peptídico de la presente invención. La resina insoluble mencionada anteriormente que tiene grupos amino no está particularmente limitada, pero es preferiblemente una resina de Fmoc-NH-SAL (resina de enlace 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminoetil)fenoxilo); puede proporcionarse directamente una sustancia diana a la misma mediante escisión de resina. Puede obtenerse el aminoácido protegido usado en la síntesis del compuesto peptídico de la presente invención protegiendo un grupo funcional con un grupo protector conocido usando un método conocido. También es posible usar aminoácidos protegidos disponibles comercialmente. Como grupo protector, pueden usarse grupos protectores conocidos. Los ejemplos de los mismos incluyen metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetiloxicarbonilo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo y similares. Para preparar aminoácidos protegidos, por ejemplo, pueden usarse métodos conocidos, tal como un método de DIPCDI-HOBt (diisopropilcarbodiimida-1-hidroxibenzotriazol). Esta reacción de condensación puede realizarse en un disolvente conocido, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como dimetilformamida. El reactivo de desprotección para grupos protectores de amino no está limitado, y puede usarse un reactivo conocido, tal como piperidina/dimetilformamida, para escindir un grupo protector tal como Fmoc. La desprotección de un grupo protector de uretano puede realizarse, por ejemplo, mediante reducción catalítica o con el uso de ácido trifluoroacético. La desprotección de otros grupos protectores puede realizarse también mediante un método conocido. El grado de avance de la reacción de condensación en cada etapa sintética puede confirmarse mediante un método conocido, tal como un método de reacción de ninhidrina. Como tal, puede obtenerse un péptido protegido que tiene una secuencia de aminoácidos deseada. El uso de una resina de Fmoc-NH-SAL como la resina insoluble permite retirar simultáneamente la resina y el grupo protector mediante un tratamiento con TMSBr (trimetilsilbromuro), TFA (ácido trifluoroacético), o similares. El compuesto peptídico puede obtenerse con el extremo C-terminal de COOH o CONH<sub>2</sub>, dependiendo del tipo de la resina usada.

El compuesto peptídico así obtenido de la presente invención puede aislarse y purificarse mediante medios conocidos, tales como extracción, recristalización, una variedad de métodos de cromatografía (de filtración en gel, de intercambio iónico, de reparto y adsorción), electroforesis y distribución a contracorriente. Es preferible un método de cromatografía líquida de alta presión y fase inversa.

Siempre que el liposoma de la presente invención sea una vesícula cerrada con una estructura de bicapa lipídica, puede ser un liposoma multilamelar (MLV), o un liposoma unilamelar, tal como SUV (vesícula unilamelar pequeña), LUV (vesícula unilamelar grande) o GUV (vesícula unilamelar gigante).

Los ejemplos específicos del tipo de lípido que forma una bicapa lipídica en el liposoma de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolinas (por ejemplo, dioleoilfosfatidilcolina, dilauoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina), fosfatidilglicerol (por ejemplo, dioleoilfosfatidilglicerol, dilauoilfosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol y diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG)), fosfatidiletanolamina (por ejemplo, dioleoilfosfatidiletanolamina, dilauoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina y diestearoilfosfatidiletanolamina), fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfolípidos similares o aditivos de hidrógeno de los mismos; y esfingomielina, gangliósido y glucolípidos similares. Estos pueden usarse de manera individual o en una combinación de dos o más. Los fosfolípidos pueden ser lípidos sintéticos, lípidos semisintéticos o lípidos naturales derivados de la yema de huevo, soja u otros animales o plantas (por ejemplo, lecitina de yema de huevo y lecitina de soja). Estos lípidos pueden usarse de manera individual o en una combinación de dos o más.

Para lograr la estabilización física o química de la bicapa lipídica, y ajustar la fluidez de la membrana, la bicapa

lipídica puede comprender uno o más elementos seleccionados de, por ejemplo, colesterol, ácido succínico de colesterol, lanosterol, dihidrolanosterol, desmosterol, dihidrocolesterol y esteroides similares derivados de animales; estigmasterol, sitosterol, campesterol, brasicasterol y esteroides similares derivados de plantas (fitoesteroides); cimosterol, ergosterol y esteroides similares derivados de microorganismos; glicerol, sacarosa y sacáridos similares; y trioleína, trioctanoína y ésteres de ácidos grasos de glicerina similares. La cantidad de los mismos no está particularmente limitada, pero es preferiblemente del 5 al 40 % (proporción molar), y más preferiblemente del 10 al 30 % (proporción molar), basado en la cantidad total de los lípidos que constituyen la bicapa.

La bicapa lipídica puede comprender tocoferol, galato de propilo, palmitato de ascorbilo, hidroxitolueno butilado y agentes antioxidantes similares; estearilamina, oleilamina y materiales cargados similares para proporcionar una carga positiva; fosfato de dicetilo y materiales cargados similares para proporcionar una carga negativa; y proteína extrínseca de membrana, proteína intrínseca de membrana y proteínas de membrana similares. La cantidad de los mismos puede ajustarse adecuadamente.

Es más preferible que el liposoma de la presente invención contenga un lípido catiónico (liposoma catiónico). Los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen DODAC (cloruro de dioctadecildimetilamonio), DOTMA (N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio), DDAB (bromuro de didodecilamonio), DOTAP (1,2-dioleiloxi-3-trimetilamonio-propano), DC-Chol (3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetil-aminoetano)-carbamoil]colesterol), DMRIE (1,2-dimiristoiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio), DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermincarboxamida)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino), DSTAP (1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano), DODAP (dioleoil-3-dimetilamonio-propano), y similares. Un lípido catiónico preferido es DOTMA, DSTAP o DODAP; y un lípido catiónico particularmente preferido es DOTAP. Los lípidos catiónicos pueden usarse de manera individual o en una mezcla de dos o más.

De los lípidos catiónicos, DOTMA y DSTAP tienen una amina cuaternaria y siempre tienen una carga positiva, mientras que DODAP tiene una amina terciaria y no tiene una carga a un pH fisiológico. Los lípidos catiónicos pueden tener por tanto diversas estructuras y características cambiando el tipo y la cantidad de lípidos catiónicos.

El liposoma de la presente invención comprende preferiblemente un lípido auxiliar (lípido cooperador). Los ejemplos de lípidos auxiliares incluyen EPC (fosfatidilcolina de huevo), DLPC (dilinoleoilfosfatidilcolina), DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DSPC (diestearoilfosfatidilcolina), POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina), DOPC (dioleoilfosfatidilcolina), DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), SOPE (esteariloleoilfosfatidilcolina) y similares. De estos, son preferibles EPC, DOPC, DOPE y SOPE.

El liposoma de la presente invención tiene el compuesto peptídico de la presente invención como componente constituyente. Cuando se usa el compuesto peptídico de la presente invención, es preferible añadirlo en una cantidad de aproximadamente del 1 al 10 % en moles basado en el 100 % en moles de los lípidos que constituyen el liposoma.

El liposoma de la presente invención puede modificarse con un polímero hidrófilo.

Los ejemplos de polímeros hidrófilos incluyen polialquilenglicoles (copolímeros de polialquilenglicol, tales como copolímeros de bloque de polipropilenglicol y polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol o polietilenglicol), dextrano, pululano, ficol, poli(alcohol vinílico), copolímeros alternos de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímeros alternos de divinil éter-anhídrido de ácido maleico, amilosa, amilopectina, quitosano, manano, ciclodextrina, pectina, carragenano y similares; preferiblemente polialquilenglicoles (copolímeros de polialquilenglicol, tales como copolímeros de bloque de polipropilenglicol y polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol o polietilenglicol); y de manera particularmente preferible polietilenglicol (PEG). Es preferible modificar el liposoma con un polímero hidrófilo de este tipo. Los ejemplos de PEG incluyen DSPE (diestearoilfosfatidiletanolamina)-PEG2000, DMPE (dimiristoilfosfatidiletanolamina)-PEG2000, DSG (diestearoilglicerol)-PEG2000, DMG (dimiristoilglicerol)-PEG2000, colesterol PEG2000, estearilo PEG2000, ceramida C8 PEG2000, ceramida C16 PEG2000 y similares. De estos, es preferible estearilo PEG2000 o ceramida C8 PEG2000. La longitud de PEG puede seleccionarse adecuadamente dentro de un intervalo de peso molecular de aproximadamente 500 a 10.000. Un experto en la técnica puede seleccionar también adecuadamente el peso molecular de otros polímeros hidrófilos de la misma manera.

Por ejemplo, cuando los liposomas están modificados por PEG, es preferible usar PEG estearilado (STR-PEG), ceramida C8-PEG, o colesterol-PEG, con el fin de conferir una estabilidad durante el almacenamiento excelente a los liposomas, sin afectar a la expresión funcional de una sustancia diana (por ejemplo, un fármaco de ácido nucleico, tal como ARNip). También es preferible usar DSPE-PEG, DSG-PEG, ceramida C16-PEG o similares, con el fin de mejorar la estabilidad en sangre. Cuando se modifican los liposomas con un polímero hidrófilo, es preferible modificar los liposomas con el polímero hidrófilo en una cantidad aproximadamente del 1 al 15 % en moles basado en el 100 % en moles de los lípidos que constituyen el liposoma.

El liposoma de la presente invención puede producirse usando un método conocido, tal como un método de hidratación, método de ultrasonificación, método de inyección de etanol, método de inyección de éter, método de evaporación en fase inversa, método de congelación y descongelación o similares.

A continuación se describe un ejemplo de producción de liposomas que usa un método de hidratación.

5 Se disuelven los lípidos, que son un componente constituyente de una bicapa lipídica y el compuesto peptídico de la presente invención en un disolvente orgánico, seguido por la retirada del disolvente orgánico mediante evaporación, obteniendo de este modo una membrana lipídica. Los ejemplos del disolvente orgánico usado en el presente documento incluyen hidrocarburos, tales como pentano, hexano, heptano y ciclohexano; hidrocarburos halogenados, tales como cloruro de metileno y cloroformo; hidrocarburos aromáticos, tales como benceno y tolueno; alcoholes inferiores, tales como metanol y etanol; ésteres, tales como acetato de metilo y acetato de etilo; cetonas, tales como acetona; y similares. Estos pueden usarse de manera individual o en una combinación de dos o más. Posteriormente, se hidrata la membrana lipídica, y se agita o ultrasónica, produciendo de este modo liposomas que tienen el compuesto peptídico de la presente invención.

15 Además, a continuación se describe otro ejemplo de producción de liposomas usando un método de hidratación.

Se disuelven los lípidos, que son un componente constituyente de una bicapa lipídica, en un disolvente orgánico, seguido por la retirada del disolvente orgánico mediante evaporación, obteniendo de este modo una membrana lipídica. Se hidrata esta membrana, y se agita o ultrasónica para producir liposomas. Posteriormente, se añade el compuesto peptídico de la presente invención al líquido externo de los liposomas. El compuesto peptídico de la presente invención puede introducirse de este modo en los liposomas.

20 Por ejemplo, la preparación de liposomas usando una amina cuaternaria como lípido catiónico puede realizarse mediante el mismo método que en el ejemplo 4, descrito más adelante, un método similar, o una combinación de tales métodos y un método convencional. Además, la preparación de liposomas usando una amina terciaria como lípido catiónico puede realizarse mediante el mismo método que en el ejemplo 4, descrito más adelante, un método similar, o una combinación de tales métodos y un método convencional.

25 En la preparación de liposomas, la proporción de lípido auxiliar (disolución de EtOH)/lípido catiónico (disolución de EtOH) puede cambiarse adecuadamente.

30 Los ejemplos preferidos del liposoma de la presente invención incluyen liposomas que tienen la composición de EPC/DOTAP/el compuesto peptídico de presente invención, EPC/el compuesto peptídico de la presente invención o EPC/DSPG/el compuesto peptídico de la presente invención; y más preferiblemente liposomas que tienen la composición de EPC/DOTAP/el compuesto peptídico de la presente invención.

35 El liposoma de la presente invención tiene un potencial zeta aproximadamente de -50 a +50 mV, de manera preferible aproximadamente de -40 a +40 mV, y de manera más preferible aproximadamente de -30 a +30 mV, a aproximadamente un pH neutro (por ejemplo, pH 7 o 7,4). El potencial zeta puede medirse usando un dispositivo Zetasizer.

40 Los liposomas de la presente invención tienen un diámetro de partícula medio, por ejemplo, de 30 a 1.000 nm, preferiblemente de 50 a 500 nm, y más preferiblemente de 60 a 200 nm, aunque no se limita a los mismos. El diámetro de partícula medio puede medirse, por ejemplo, mediante un método de dispersión de luz dinámica, un método de dispersión de luz estática, observación en microscopio electrónico, observación en microscopio de fuerza atómica, o similares.

45 Una sustancia diana que va a administrarse a una célula puede encapsularse en el liposoma de la presente invención.

50 Cuando la sustancia diana es soluble en agua, se añade a un disolvente acuoso que se usa cuando se hidrata una membrana lipídica durante la producción de liposomas. La sustancia diana puede encapsularse de este modo en la fase acuosa de los liposomas. Cuando es liposoluble, la sustancia diana se añade al disolvente orgánico usado durante la producción de liposomas; la sustancia diana puede encapsularse de este modo en la bicapa lipídica de los liposomas. El término "encapsular", tal como se usa en la presente solicitud, indica el caso en el que se incluye una sustancia diana dentro de una partícula hueca tal como un liposoma.

55 La especie de organismo a la que se administra una sustancia diana no está limitada siempre que sean animales vertebrados. Son preferibles los mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen humanos, simios, vacas, ovejas, cabras, caballos, cerdos, conejos, perros, gatos, ratas, ratones, cobayas y similares.

60 El liposoma de la presente invención puede usarse en un estado de dispersión. Como disolvente de dispersión, puede usarse una disolución tampón tal como una solución salina fisiológica, una disolución de tampón fosfato, una disolución de tampón citrato o una disolución de tampón ácido acético. Pueden añadirse a la dispersión aditivos tales como un sacárido, un alcohol polihidroxilado, un polímero soluble en agua, un tensioactivo no iónico, un agente antioxidante, un regulador de pH y un acelerador de la hidratación.

65

El liposoma de la presente invención puede usarse también en un estado de dispersión secada (por ejemplo, liofilizada o secada por pulverización). Los liposomas secados pueden añadirse a una disolución tampón, tal como una solución salina fisiológica, una disolución de tampón fosfato, una disolución de tampón citrato o una disolución de tampón acetato para preparar una dispersión.

5 El liposoma de la presente invención puede usarse tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando el liposoma de la presente invención se usa como composición farmacéutica, la vía de administración puede ser, por ejemplo, inyección intravenosa, goteo intravenoso o similares. La frecuencia de administración y la dosis pueden ajustarse adecuadamente según el tipo y la cantidad de la sustancia diana encapsulada en el liposoma de la presente invención.

10 Cuando se usa como composición farmacéutica, el liposoma de la presente invención puede contener un vehículo farmacéutico, si es necesario. Pueden usarse diversas formas de dosificación según el propósito, tal como el diagnóstico o el tratamiento. Por ejemplo, pueden usarse inyecciones como formas de dosificación. Pueden producirse diversas formas de dosificación mediante métodos de preparación conocidos usados comúnmente por un experto en la técnica.

15 Cuando se preparan inyecciones, puede añadirse un regulador de pH, tampón, agente estabilizante, agente isotónico, etc., a una sustancia diana. Pueden producirse inyecciones subcutáneas, intramusculares e intravenosas mediante métodos convencionales.

20 Los ejemplos de reguladores de pH y tampones incluyen citrato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio y similares. Los ejemplos de agentes estabilizantes incluyen piro-sulfato de sodio, EDTA, ácido tioglicólico, ácido tioláctico y similares. Los ejemplos de agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio, glucosa, D-manitol, glicerol y similares.

25 El liposoma de la presente invención no produce ni pérdida de peso ni hepatopatía, y por tanto puede administrarse de manera segura.

30 El agente de inducción de sustancias de la presente invención puede usarse o bien *in vitro* o bien *in vivo* para administrar una sustancia diana a un sitio de pH débilmente ácido. Los ejemplos de sitios de pH débilmente ácido incluyen sitios de inflamación, sitios tumorales, sitios infectados y similares. En particular, son preferibles los sitios tumorales.

35 Los ejemplos de la sustancia diana que va a encapsularse incluyen, pero no se limitan particularmente a, uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en fármacos, ácidos nucleicos, péptidos (por ejemplo, oxitocina, bradiquinina, factor de liberación de tiotropina, encefalina y péptidos biológicamente activos y hormonas peptídicas similares), proteínas (por ejemplo, enzima, interleucina y diversas citocinas similares, factor de transferencia celular, factor de crecimiento celular y anticuerpos), azúcar y materiales compuestos de los mismos. Estos pueden seleccionarse según el propósito, tal como diagnóstico o tratamiento. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, así como análogos y derivados de ADN y ARN (por ejemplo, ARNip, ácido nucleico peptídico (PNA) y ADN fosforotioato). Los ácidos nucleicos pueden ser o bien monocatenarios o bien bicatenarios, y pueden ser ácidos nucleicos o bien lineales o bien circulares.

40 Además, el liposoma de la presente invención puede diseñarse para liberar, en diferentes sitios, varios tipos de sustancias diana que tienen diferentes pesos moleculares encapsulados en el mismo liposoma. Por ejemplo, el liposoma de la presente invención puede diseñarse para liberar una sustancia de bajo peso molecular con un peso molecular de 700 o menos de manera específica para pH débilmente ácido, y no liberar una sustancia de alto peso molecular con un peso molecular de 700 o más en un entorno con pH débilmente ácido, sino liberarla después de que el liposoma sea captado por una célula tumoral.

45 La sustancia diana está contenida en una cantidad de 0,1 a 60 partes en masa, y preferiblemente de 1 a 40 partes en masa, basado en 100 partes en masa en total del péptido y los lípidos que constituyen el liposoma.

50 Cuando la sustancia diana es un fármaco, puede usarse cualquier fármaco que se use en tejidos en un entorno débilmente ácido (pH alrededor de 6,5). Por ejemplo, pueden usarse agentes antineoplásicos. Los ejemplos específicos de fármacos antineoplásicos incluyen tegafur, doxorubicina, daunorubicina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, paclitaxel, irinotecán, SN-38, actinomicina D, vincristina, vinblastina, metotrexato, azatioprina, fluorouracilo, mitomicina C, docetaxel, ciclofosfamida, capecitabina, epirubicina, gemcitabina, mitoxantrona, leucovorina, vinorelbina, trastuzumab, etopósido, estramustina, prednisona, interferón  $\alpha$ , interleucina-2, bleomicina, ifosfamida, mesna, altretamina, topotecán, citarabina, metilprednisolona, dexametasona, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, gemtuzumab, idarubicina, mitoxantrona, tretinoína, alemtuzumab, clorambucilo, cladribina, imatinib, epirubicina, dacarbazina, procarbazona, mecloretamina, rituximab, denileucina diftotox, trimetoprima/sulfametoxazol, alopurinol, carmustina, tamoxifeno, filgrastim, tomosolomida, melfalán, vinorelbina, azacitidina, talidomida, mitomicina y similares. Además, pueden usarse también agentes antiinflamatorios como sustancia diana porque los sitios antiinflamatorios también son regiones débilmente ácidas. Los ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen

agentes antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, indometacina, aspirina, diclofenaco, piroxicam, paracetamol, celecoxib y rofecoxib) y agentes antiinflamatorios esteroideos (por ejemplo, hidrocortisona, prednisolona, dexametasona y betametasona).

5 Los ejemplos preferibles de ácidos nucleicos usados como sustancia diana incluyen cualquiera de los ARN bicatenarios (ARNbc) seleccionados del grupo que consiste en ARN merodúplex (ARNmd), ARNbc mellado (ARNbcm), ARNbc con huecos (ARNbch), ácido nucleico de interferencia pequeño (ANip), ARNip, micro-ARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido de interferencia pequeño, oligonucleótido sustituido de interferencia pequeño, oligonucleótido modificado de interferencia pequeño, ARNbc modificado químicamente y ARN  
10 de silenciamiento de genes postranscripcional (ARNptgs). La sustancia diana puede usarse de manera individual o en una combinación de dos o más. Por ejemplo, pueden usarse dos o más tipos de ARNip en combinación.

En una realización en lo que se refiere a sustitución y modificación (incluyendo modificación química), un ARN bicatenario puede comprender una protuberancia de uno a cuatro nucleótidos en uno o ambos extremos 3' del ARN bicatenario, tal como una protuberancia que comprende un desoxirribonucleótido o dos desoxirribonucleótidos (por ejemplo, timidina, adenina). Un ARN bicatenario puede tener un extremo romo en uno o ambos extremos del ARN bicatenario. En una realización, el extremo 5' de la primera o segunda cadena está fosforilado. En cualquiera de las realizaciones de ARN bicatenario, las protuberancias de nucleótido en el extremo 3' pueden comprender ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos químicamente modificados en un azúcar, base o estructura principal del  
15 ácido nucleico. En cualquiera de las realizaciones de ARN bicatenario, las proyecciones de nucleótido en el extremo 3' pueden comprender uno o más ribonucleótidos de base universales. En cualquiera de las realizaciones de ARN bicatenario, las extensiones de nucleótido en el extremo 3' pueden comprender uno o más nucleótidos acíclicos. En cualquiera de las realizaciones de ARN bicatenario, el ARNbc puede comprender además un grupo fosfato terminal, tal como un 5'-fosfato (véase Martínez *et al.*, Cell, 110: 563-574, 2002; y Schwarz *et al.*, Molec. Cell, 10: 537-568,  
20 2002) o un 5',3'-difosfato.

Un ARN bicatenario puede comprender además una sustitución de 2'-azúcar, tal como 2'-desoxi, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, 2'-O-2-metoxietilo, halógeno, 2'-fluro o 2'-O-alilo, o una combinación de los mismos. En realizaciones adicionales, un ARN bicatenario comprende además un sustituyente caperuza terminal en uno o ambos extremos de la primera cadena o uno o más de las segundas cadenas, tales como un resto alquilo, abásico, desoxi-abásico, glicerilo, de dinucleótido, de nucleótido acíclico, de desoxinucleótido invertido o una combinación de los mismos.  
30

En realizaciones adicionales, un ARN bicatenario puede comprender además al menos un enlace internucleósido modificado, tal como independientemente un enlace fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, fosfonato de metilo, fosfonato de alquilo, 3'-alquilenfosfonato, 5'-alquilenfosfonato, fosfonato quiral, fosfonoacetato, tiofosfonoacetato, fosfinato, fosforamidato, 3'-aminofosforamidato, aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, selenofosfato, boranofosfato, o una combinación de los mismos.  
35

Un ARN bicatenario puede sustituirse o modificarse (incluyendo modificación química) usando 5-metilcitosina; 5-hidroximetilcitosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; 6-metilo, 2-propilo, u otros derivados alquílicos de adenina y guanina; adeninas y guaninas sustituidas en 8 (por ejemplo, 8-aza, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo); 7-metilo, 7-deaza, y adeninas y guaninas 3-deaza; 2-tiouracilo; 2-tiotimina; 2-tiocitosina; 5-metilo, 5-propinilo, 5-halo (por ejemplo, 5-bromo o 5-fluoro), 5-trifluorometilo, u otros uracilos y citosinas sustituidos en 5; y análogos de nucleótido, tales como 6-azouracilo.  
40 45

Los ARN, tales como ARN bicatenarios (ARNbc), pueden modificarse químicamente. Los ejemplos de tales modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a, enlaces internucleótido fosforotioato, 2'-desoxirribonucleótidos, 2'-O-metilribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluorribonucleótidos, nucleótidos "acíclicos", 5'-C-metilnucleótidos, e incorporación de residuo desoxi-abásico invertido y/o glicerilo terminal. Estas modificaciones químicas pueden conservar la actividad de ARNi en las células.  
50

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el liposoma anterior. Las enfermedades diana que van a prevenirse o tratarse mediante la composición farmacéutica de la presente invención pueden seleccionarse dependiendo del tipo de sustancia diana, y no están particularmente limitadas. Los ejemplos de la composición farmacéutica de la presente invención incluyen agentes antitumorales y similares.  
55

En esta realización, el cáncer diana no está particularmente limitado. Los ejemplos del mismo incluyen cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar y conducto colédoco, cáncer de vías biliares, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer renal, cáncer vesical, cáncer prostático, tumor testicular, sarcoma de huesos y tejidos blandos, mieloma múltiple, cáncer de piel, tumor cerebral, mesotelioma, melanoma y similares.  
60

65

## Ejemplos

La presente invención se describe a continuación en más detalle con referencia a los ejemplos y ejemplos de prueba. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Síntesis de HGHGLALLAHALLAHAALHAALA (SEQ ID NO: 1, compuesto peptídico 1)

5 Usando una resina de Fmoc-Ala-HMP como material de partida, a una escala de 0,1 mM, se sintetizó el péptido de SEQ ID NO: 1 mediante síntesis en fase sólida con Fmoc usando aminoácidos, un agente de condensación (HBTU/HOBt) y un acelerador de reacción (DIEA) (4 equivalentes cada uno en relación con la resina). (HBTU: p.m. 379,2, HOBt, anhidro: p.m. 135,1, DIEA: p.m. 129,2). Se añadió una disolución cóctel de TFA (ácido trifluoroacético) (TFA: 125 ml; H<sub>2</sub>O: 0,25 ml; fenol: 0,375 g; etanoditiol: 0,125 ml; y tioanisol: 0,25 ml) a la resina sintetizada y se hizo reaccionar bajo enfriamiento con hielo durante 15 minutos, y a temperatura ambiente durante 2 horas. Se escindió un péptido de la resina, y se hizo precipitar en dietil éter para obtener un péptido en bruto. Se realizó la purificación mediante HPLC, seguida de liofilización. Se midió la pureza mediante HPLC y MALDI-TOF-MS. Se realizó el análisis en las siguientes condiciones de HPLC, y se obtuvo el compuesto peptídico 1 diana (SEQ ID NO: 1) como un único pico. Se muestra el índice de hidropatía medio en la tabla 3, proporcionada más adelante.

Tampón A: TFA al 0,1 %/H<sub>2</sub>O; Tampón B: TFA al 0,1 %/acetoneitrilo; Columna: Columna SunFire C18, 5 µm, 4,6 x 150 mm; caudal: 1 ml/min; longitud de onda: 220 nm.

20 Se usó un sistema Voyager de Applied Biosystems para MALDI-TOF-MS. Peso molecular calc.: 2320,7; hallado: 2321,40. La figura 1 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS.

Escala de síntesis: una escala de 0,1-mM (peso molecular: 2020,7);

25 Resina usada: resina de Fmoc-Ala-HMP;

Cantidad de resina usada: 208,0 mg (cantidad de resina introducida: 0,48 mmol/g);

30 Valor teórico del péptido obtenido usando esta resina: 232,3 mg;

Cantidad en bruto realmente obtenida: 228,6 mg (rendimiento: el 98,4 %).

Ejemplo 2: Síntesis de GHHGLALLHALHLAAAALHAAALA (compuesto peptídico 2)

35 Se realizó la síntesis como en el ejemplo 1 para obtener el compuesto peptídico 2 (SEQ ID NO: 2). Peso molecular calc.: 2320,7; hallado: 2320,04. La figura 2 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS. El índice de hidropatía medio se muestra en la tabla 3, proporcionada más adelante.

40 Escala de síntesis: una escala de 0,1-mM (peso molecular: 2320,7);

Resina usada: resina de Fmoc-Ala-HMP;

Cantidad de resina usada: 140,1 mg (cantidad de resina introducida: 0,72 mmol/g);

45 Valor teórico del péptido obtenido usando esta resina: 234,0 mg;

Cantidad en bruto realmente obtenida: 95,5 mg (rendimiento: el 40,8 %)

Ejemplo 3: Síntesis de EGEGLALLAHALLAHAALHAALA (compuesto peptídico 3)

50 Se realizó la síntesis como en el ejemplo 1 para obtener el compuesto peptídico 3 (SEQ ID NO: 3). Peso molecular calc.: 2304,6; hallado: 2305,14. La figura 3 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS. El índice de hidropatía medio se muestra en la tabla 3, proporcionada más adelante.

55 Escala de síntesis: una escala de 0,1-mM (peso molecular: 2304,6);

Resina usada: resina de Fmoc-Ala-HMP;

Cantidad de resina usada: 175,6 mg (cantidad de resina introducida: 0,60 mmol/g);

60 Valor teórico del péptido obtenido usando esta resina: 242,7 mg;

Cantidad en bruto realmente obtenida: 240,1 mg (rendimiento: el 98,9 %).

65 Ejemplo comparativo 1: Síntesis de HHGGLLLLHHHAAAAALLLAAAAA (compuesto comparativo 1)

Se realizó la síntesis como en el ejemplo 1 para obtener el compuesto comparativo 1 (SEQ ID NO: 4). Peso molecular calc.: 2320,7; hallado: 2320,65. La figura 4 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS. El índice de hidropatía medio se muestra en la tabla 3, proporcionada más adelante.

5 Escala de síntesis: una escala de 0,1-mM (peso molecular: 2320,7);

Resina usada: resina de Fmoc-Ala-HMP;

Cantidad de resina usada: 179,8 mg (cantidad de resina introducida: 0,58 mmol/g);

10

Valor teórico del péptido obtenido usando esta resina: 242,0 mg;

Cantidad en bruto realmente obtenida: 233,4 mg (rendimiento del 96,4 %).

15 Ejemplo comparativo 2: Síntesis de HGHGGGGGGGGGAHALLAHAALAH (compuesto comparativo 2)

Se realizó la síntesis como en el ejemplo 1 para obtener el compuesto comparativo 2 (SEQ ID NO: 5). Peso molecular calc.: 2040,1; hallado: 2040,49. La figura 5 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS. El índice de hidropatía medio se muestra en la tabla 3, proporcionada más adelante.

20

Escala de síntesis: una escala de 0,1-mM (peso molecular: 2040,1);

Resina usada: resina de H-His(Trt)-Trt(2-Cl);

25 Cantidad de resina usada: 217,6 mg (cantidad de resina introducida: 0,50 mmol/g);

Valor teórico del péptido obtenido usando esta resina: 222,0 mg;

Cantidad en bruto realmente obtenida: 182,9 mg (rendimiento: el 82,4 %).

30

Ejemplo comparativo 3: Síntesis de HGHGLALLAHALLAHAAAAL (compuesto comparativo 3)

Se realizó la síntesis como en el ejemplo 1 para obtener el compuesto comparativo 3 (SEQ ID NO: 6). Peso molecular calc.: 1928,2; hallado: 1929,58. La figura 6 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS. El índice de hidropatía medio se muestra en la tabla 3, proporcionada más adelante.

35

Escala de síntesis: una escala de 0,1-mM (peso molecular: 1928,2);

Resina usada: resina de Fmoc-Leu-HMP;

40

Cantidad de resina usada: 208,2 mg (cantidad de resina introducida: 0,50 mmol/g);

Valor teórico del péptido obtenido usando esta resina: 200,7 mg;

45 Cantidad en bruto realmente obtenida: 111,8 mg (rendimiento: el 55,7 %).

Ejemplo 4: Preparación de liposoma catiónico y capacidad de respuesta al pH

(1) Se prepararon liposomas como sigue. Específicamente, se dispensó una disolución lipídica en etanol preparada a partir de una mezcla de fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC) y dioleoiltrimonio-propano (DOTAP) a una proporción molar de 1:1 en un tubo de ensayo. Se añadió una disolución en etanol del compuesto peptídico 1 obtenido en el ejemplo 1 en una cantidad del 5 % en moles del contenido de lípido total, y se mezcló con una cantidad igual de cloroformo, seguido de evaporación hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno para obtener una membrana lipídica delgada. Se añadió a la misma un tampón que tiene un pH de 7,4, y se hidrató suficientemente la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras la finalización de la hidratación, se ultrasonizó el tubo de ensayo usando un dispositivo ultrasónico de tipo tanque de agua para preparar el liposoma 1 que comprende EPC, DOTAP y compuesto peptídico 1 (concentración de lípido: 10 mM).

50

55

(2) Se midieron el diámetro de partícula (tamaño) y el potencial superficial (potencial  $\zeta$ ) del liposoma 1 diluido y suspendido en disoluciones tampón que tienen diferentes pH mediante un dispositivo Zetasizer Nano producido por Malvern Instruments Ltd. Además, se midieron también el tamaño de partícula y el potencial superficial de un liposoma de referencia (EPC/DOTAP = 1/1 (proporción molar) en el que no se había introducido compuesto peptídico de la misma manera. La tabla 2 muestra los resultados.

60

65

Tabla 2

(1) Liposoma 1				
pH	5,5	6,0	6,5	7,4
Tamaño (nm)	248 ± 30	243 ± 53	211 ± 44	110 ± 14
potencial ζ (mV)	21,2 ± 4,2	14,6 ± 2,9	9,8 ± 4,5	-2,0 ± 2,2
2) Liposoma de referencia				
pH	5,5	6,0	6,5	7,4
Tamaño (nm)	117	117	116	119
potencial (mV)ζ	34,4	32,3	33,5	37,2

Los resultados muestran que la capacidad de respuesta al pH del liposoma de referencia en el que no se había introducido el compuesto peptídico de la presente invención apenas cambió de diámetro de partícula ni de potencial superficial. En cambio, el diámetro de partícula del liposoma en el que se había introducido el compuesto peptídico de la presente invención fue aproximadamente de 100 nm cuando el pH era 7,4. Cuando el pH era 6,5, el diámetro de partícula aumentó aproximadamente al doble de eso cuando el pH era 7,4. Además, el potencial superficial era de -2,0 mV cuando el pH era 7,4; sin embargo, el potencial superficial cambió a +9,8 mV cuando el pH era 6,5. Estos resultados sugieren que la protonación de histidina contenida en el péptido debida a pequeños cambios de pH conduce a cambios en el diámetro de partícula y el potencial superficial. Se considera que la causa del aumento en el diámetro de partícula cuando el pH se redujo desde 7,4 hasta 6,5 es la siguiente: la protonación de histidina indujo una reducción de la interacción hidrófoba entre regiones hidrófobas y condujo a la repulsión electrostática entre regiones hidrófilas, por lo cual se debilitó la estructura del liposoma.

Ejemplo de prueba 1: Medición del escape de fármacos encapsulados en diferentes condiciones de pH

(1) Tras prepararse una membrana lipídica que contenía péptido como en el ejemplo 4, se añadió una disolución de calceína (p.m.: 622,55) 30 mM, y se preparó el liposoma 1 con calceína encapsulada como en el ejemplo 4. Se retiró la calceína no encapsulada mediante filtración en gel (Sephadex G50).

Para medir el escape de la calceína encapsulada de los liposomas, se diluyeron los liposomas y se suspendieron en tampones que tenían diferentes pH, y luego se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se midió la fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 517 nm) de la calceína escapada mediante un lector de placas (Infinite M200, producido por Tecan). La fluorescencia de la calceína escapada cuando se mezclaron los liposomas con el Triton al 1 %-X100 se consideró como escape completo. Se calculó la tasa de escape mediante la siguiente fórmula. La figura 7 muestra los resultados.

$$\text{Tasa de escape (\%)} = (F_{\text{muestra}} - F_{\text{pH } 7,4}) / (F_{\text{triton}} - F_{\text{pH } 7,4}) \times 100$$

$F_{\text{muestra}}$ : Fluorescencia de calceína escapada de los liposomas a cada pH

$F_{\text{pH } 7,4}$ : Fluorescencia de calceína escapada de los liposomas a pH de 7,4

$F_{\text{triton}}$ : Fluorescencia de calceína cuando se mezclaron los liposomas con Triton al 1 %-X100

Los resultados muestran que no se observó escape a un pH de 7,4, mientras que se observó un escape de aproximadamente el 100 % de calceína a un pH de 6,5. Esto sugirió que la His del bloque hidrófilo y el bloque hidrófobo del compuesto peptídico incrustado en la membrana lipídica se protonó debido a pequeños cambios de pH, que produjeron la repulsión entre el péptido y las moléculas de lípido, permitiendo de este modo el escape de la calceína encapsulada.

(2) Tras prepararse una membrana lipídica que contenía péptido como en el ejemplo 4, se añadió una disolución de dextrano marcado con rojo Texas (p.m. 3,000) 2 mg/ml, y se preparó el liposoma 1 con dextrano encapsulado como en el ejemplo 4. Con el fin de aumentar la tasa de encapsulación del dextrano marcado con rojo Texas en el liposoma, se realizó congelación con nitrógeno líquido, seguido de descongelación a 37 °C. Se repitió el procedimiento de congelación-descongelación 5 veces. Se retiró el dextrano marcado con rojo Texas no encapsulado mediante filtración en gel (Sephadex CL-6B). Se midió el escape del dextrano marcado con rojo Texas encapsulado del liposoma de la misma manera que la descrita anteriormente. La figura 8 muestra los resultados.

Los resultados muestran que no se observó escape a un pH de 7,4, y no se observó escape de dextrano del liposoma incluso a un pH de 6,5 o menos. Esto sugirió que este liposoma podría dejar escapar selectivamente un compuesto de bajo peso molecular, sin dejar escapar un compuesto de alto peso molecular, dependiendo de pequeños cambios de pH.

(3) Tras prepararse una membrana lipídica que contenía péptido como en el ejemplo 4, se añadieron una disolución de calceína (p.m. 622,55) 15 mM y una disolución de dextrano marcado con rojo Texas (p.m. 3.000) 1 mg/ml, y se preparó un liposoma 1 con dos componentes encapsulados como en el ejemplo 4. Se retiraron la calceína y el dextrano no encapsulados mediante diálisis usando una membrana de diálisis (punto de corte molecular: 14.000).

Se midió el escape del dextrano marcado con rojo Texas y calceína encapsulados del liposoma de la misma manera que se describió anteriormente. La figura 9 muestra los resultados.

5 Los resultados muestran que cuando se encapsularon calceína y dextrano juntos en el liposoma, el escape de calceína era aproximadamente del 60 % a un pH de 6,5, y aproximadamente del 80 % a un pH de 6,0 o menos. Por otro lado, no se observó escape de dextrano en todos los pH. Esto confirmó que este liposoma podría dejar escapar selectivamente un compuesto de bajo peso molecular dependiendo de pequeños cambios de pH, tal como se describió anteriormente.

10 El liposoma de la presente invención puede dejar escapar un compuesto de bajo peso molecular de manera dependiente del pH. Cuando se encapsulan compuestos que tienen diferentes pesos moleculares en el liposoma de la presente invención, los compuestos pueden escaparse gradualmente según sus pesos moleculares.

15 Ejemplo de prueba 2: Espectros de CD de péptido solo o liposoma con péptido introducido en diferentes condiciones de pH (con capacidad de respuesta al pH y la necesidad de un sustrato con estructura de membrana)

20 Se suspendieron el compuesto peptídico 1 obtenido en el ejemplo 1 solo y un liposoma con péptido introducido obtenido según el ejemplo 4 (cada uno tenía una concentración de péptido de 20  $\mu$ M) en PBS (-) con diferentes pH, y se registraron los espectros de CD (dicroísmo circular) en un espectropolarímetro J-720WI (producido por JASCO Corporation). La figura 10 muestra los resultados.

La "hélice  $\alpha$ " representa una estructura de hélice  $\alpha$ , y la "estructura helicoidal desordenada" representa un estado en el que no se forma una estructura secundaria clara.

25 Los resultados muestran que la estructura del compuesto peptídico 1 solo, era hélice  $\alpha$  (un pico positivo a alrededor de 196 nm, y picos negativos a alrededor de 207 y 222 nm) a un pH de 7,4; sin embargo, se transformó secuencialmente en una estructura helicoidal desordenada (un pico negativo a alrededor de 196 nm), a medida que se redujo el pH. En cambio, la estructura del liposoma con péptido introducido era de manera similar una hélice  $\alpha$  a un pH de 7,4; sin embargo, se transformó casi completamente en una estructura helicoidal desordenada a un pH de 30 6,5. Por tanto, el péptido solo y el liposoma con péptido introducido experimentaron diferentes transiciones estructurales asociadas con cambios de pH. Estos resultados sugieren que un sustrato con estructura de membrana es esencial para la capacidad de respuesta al pH de los péptidos.

Ejemplo 5: Preparación de liposomas que tienen diferentes composiciones lipídicas

35 (1) Se preparó el liposoma neutro 2 (EPC/compuesto peptídico 1 = el 1/5 % en moles) como en el ejemplo 4.

(2) Se preparó el liposoma aniónico 3 (EPC/DSPG/compuesto peptídico 1 = el 1/1/5 % en moles) como en el ejemplo 4.

40 Ejemplo de prueba 3: Medición del escape de fármacos encapsulados en diversos liposomas

45 Se encapsuló la calceína en el liposoma 1 obtenido en el ejemplo 4, y los liposomas 2 y 3 obtenidos en el ejemplo 5, y se examinó la capacidad de respuesta al pH como en el ejemplo de prueba 1. Los resultados muestran que no se observó escape de calceína de ninguno de los liposomas a un pH de 7,4; sin embargo, a un pH de 6,5, el liposoma catiónico 1 mostró el mayor escape. El escape se redujo en el orden de liposoma aniónico 3 y liposoma neutro 2. Esto sugiere que lo más preferible era introducir un compuesto peptídico en liposomas catiónicos de modo que los liposomas mostraran capacidad de respuesta a un pH ligeramente ácido.

50 Ejemplo 6

Se produjo el liposoma 2 en el que se había introducido el compuesto peptídico 2 obtenido en el ejemplo 2 según el método descrito en el ejemplo 4, y se preparó el liposoma 2 con calceína encapsulada mediante el mismo método de producción que en el ejemplo de prueba 1.

55 Ejemplo 7

60 Se produjo el liposoma 3 en el que se había introducido el compuesto peptídico 3 obtenido en el ejemplo 3 según el método descrito en el ejemplo 4, y se preparó el liposoma 3 con calceína encapsulada mediante el mismo método de producción que en el ejemplo de prueba 1.

Ejemplo comparativo 4

65 Se produjo el liposoma comparativo 1 en el que se había introducido el compuesto comparativo 1 obtenido en el ejemplo comparativo 1 según el método descrito en el ejemplo 4, y se preparó el liposoma comparativo 1 con calceína encapsulada mediante el mismo método de producción que en el ejemplo de prueba 1.

Ejemplo comparativo 5

5 Se produjo el liposoma comparativo 2 en el que se había introducido el compuesto comparativo 2 obtenido en el ejemplo comparativo 2 según el método descrito en el ejemplo 4, y se preparó el liposoma comparativo 2 con calceína encapsulada mediante el mismo método de producción que en el ejemplo de prueba 1.

Ejemplo comparativo 6

10 Se produjo el liposoma comparativo 3 en el que se había introducido el compuesto comparativo 3 obtenido en el ejemplo comparativo 3 según el método descrito en el ejemplo 4, y se preparó el liposoma 3 con calceína encapsulada mediante el mismo método de producción que en el ejemplo de prueba 1.

15 Ejemplo de prueba 4: Índice de hidropatía medio de liposoma con péptido introducido, y tasa de escape de fármaco encapsulado

20 Se calculó la tasa de escape de calceína de los liposomas con calceína encapsulada obtenidos en los ejemplos 4, 6, y 7, y los ejemplos comparativos 4 a 6 a un pH de 7,4 y a un pH de 6,5 como en el ejemplo de prueba 1. La tabla 3 muestra los resultados.

Tabla 3

Compuesto	Secuencia de aminoácidos (bloque hidrófilo)-(bloque hidrófobo)	Índice de hidropatía medio		Número de residuos	Tasa de escape de calceína (%)	
		Bloque hidrófilo	Bloque hidrófobo		pH 7,4	pH 6,5
Compuesto peptídico 1	HGHG-LALLAHALLAHAALA	-1,8	1,75	24	0	100
Compuesto peptídico 2	GHHG-LALLHALHLAAAALHAAALA	-1,8	1,75	24	0	90
Compuesto peptídico 3	EGEG-LALLAHALLAHAALA	-1,95	1,75	24	0	65
Compuesto comparativo 1	HHGG-LLLLHHHAAAAALLLAAAAA	-1,8	1,75	24	0	30
Compuesto comparativo 2	HGHGGGGGGGGG-AHALLAHAALAH	-0,87	1,05	24	0	30
Compuesto comparativo 3	HGHG-LALLAHALLAHAAAAL	-1,8	1,925	20	-	-

25 Los resultados muestran que en los liposomas en los que se habían introducido los compuestos peptídicos de la presente invención, no se observó escape en condiciones fisiológicas de pH 7,4; sin embargo, se observó un alto escape (el 60 % o más) del fármaco encapsulado a un pH débilmente ácido de 6,5. En particular, se observó un escape significativamente alto del fármaco encapsulado en los compuestos peptídicos que tienen His en el bloque de aminoácidos hidrófilo y en el bloque de aminoácidos hidrófobo. En cambio, incluso con los mismos aminoácidos constituyentes, en el liposoma en el que se había introducido el compuesto comparativo 1 que tenía residuos de histidina adyacentes en el bloque hidrófobo del péptido, y el liposoma en el que se había introducido el compuesto comparativo 2, cuyo índice de hidropatía medio cambió al cambiar la proporción del número de aminoácidos en el bloque hidrófilo y en el bloque hidrófobo del compuesto peptídico a 1:1, el escape de los fármacos encapsulados se redujo notablemente, incluso cuando el pH cambió desde 7,4 hasta 6,5. Por tanto, la capacidad de respuesta al pH era insuficiente. Además, se prepararon liposomas en los que se había introducido el compuesto comparativo 3 que tiene cuatro residuos menos que el compuesto peptídico 1; sin embargo, se agregaron notablemente a un pH de 6,5 o menos. Además, se realizó un intento de encapsular calceína en los liposomas; sin embargo, a un pH de 7,4 se observó una intensidad de fluorescencia al mismo nivel que cuando se realizó el tratamiento con Triton. Esto sugirió que los liposomas que contienen el péptido que tiene una secuencia con cuatro residuos menos eran inestables, y que no podría encapsularse un fármaco en los mismos.

40 Ejemplo de prueba 5: Efecto antitumoral del liposoma 4 con doxorubicina encapsulada (Dox)

45 Se preparó el liposoma 4 con Dox encapsulada como sigue. Específicamente, se dispensó una disolución lipídica en etanol preparada a partir de una mezcla de fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC) y dioleoiltrimonomio-propano (DOTAP) a una proporción molar de 1:1 en un tubo de ensayo. Se añadió una disolución en etanol de compuesto peptídico 1 obtenido en el ejemplo 1 en una cantidad del 5 % en moles del contenido de lípido total, y se añadió

además una disolución en etanol de polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) en una cantidad del 5 % en moles del contenido de lípido total. Se mezcló además con la misma una cantidad igual de cloroformo, seguido de evaporación hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno para obtener una membrana lipídica delgada. Posteriormente, se añadió a la misma sulfato de amonio 250 mM (pH 8,5), y se hidrató suficientemente la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras la finalización de la hidratación, se ultrasonizó el tubo de ensayo usando un dispositivo ultrasónico de tipo tanque de agua para preparar el liposoma 4 que comprende EPC, DOTAP, PEG-DSPE, y compuesto peptídico 1 (concentración de lípido: 10 mM). Se sometió el liposoma 4 preparado a filtración en gel usando una columna Sephadex G-50 equilibrada con el 10 % de sacarosa (pH 8,5). Se cuantificó la concentración de lípido en las fracciones recogidas usando la prueba de fosfolípido Wako. Se añadió una disolución de Dox (2 mg/ml) al liposoma 4, y se incubó la mezcla a 65 °C durante 1 hora. Entonces, se retiró la Dox no encapsulada mediante filtración en gel usando una columna Sephadex G-50. Se cuantificó la cantidad de Dox encapsulada en el liposoma 4 solubilizando el liposoma con tratamiento con Triton-X, y midiendo luego la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas (Infinite M200, producido por Tecan).

Para evaluar el efecto antitumoral del liposoma 4 con Dox encapsulada, se administró una disolución de Dox o liposoma 4 con Dox encapsulada a ratones sin pelo que portaban un tumor en los que el tumor formado a partir de células B16-F1 implantadas por vía subcutánea creció hasta un tamaño de 100 mm<sup>3</sup>, mediante inyección en la vena de la cola a una concentración de Dox de 0,5 mg/kg por inyección 5, 8, 12 ó 15 días tras la implantación. Se calculó el volumen tumoral a partir de la longitud y la anchura del tumor usando la siguiente fórmula:

$$(\text{Volumen tumoral}) = 0,5 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$$

Además, se calculó el volumen tumoral relativo mediante la siguiente fórmula:

$$(\text{Volumen tumoral relativo}) = (\text{volumen tumoral 8, 12, 15 ó 19 días tras la implantación}) / (\text{volumen tumoral 5 días tras la implantación})$$

La figura 11 muestra los resultados. Tal como se muestra en la figura 11, cuando se administró Dox a dosis baja, el liposoma 4 con Dox encapsulada mostró un efecto inhibitor del crecimiento tumoral mayor que el de la disolución de Dox.

#### Lista de secuencias

<110> TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Péptido sensible a pH débilmente ácido, y liposoma que contiene el mismo

<130> P13-137

<150> Documento JP 2012-233011

<151> 22-10-2012

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 1

His Gly His Gly Leu Ala Leu Leu Ala His Ala Leu Leu Ala His Ala  
1 5 10 15

Ala Leu Ala His Ala Ala Leu Ala  
20

<210> 2

<211> 24

ES 2 627 056 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 2

Gly His His Gly Leu Ala Leu Leu His Ala Leu His Leu Ala Ala Ala  
1 5 10 15

Ala Leu His Ala Ala Ala Leu Ala  
20

10 <210> 3  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Péptido sintético

20 <400> 3

Glu Gly Glu Gly Leu Ala Leu Leu Ala His Ala Leu Leu Ala His Ala  
1 5 10 15

Ala Leu Ala His Ala Ala Leu Ala  
20

25 <210> 4  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 4

His His Gly Gly Leu Leu Leu Leu His His His Ala Ala Ala Ala Ala  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Ala  
20

35 <210> 5  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Péptido sintético

45 <400> 5

ES 2 627 056 T3

His Gly His Gly Ala His Ala Leu  
1 5 10 15

Leu Ala His Ala Ala Leu Ala His  
20

<210> 6  
<211> 20  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Péptido sintético

<400> 6

His Gly His Gly Leu Ala Leu Leu Ala His Ala Leu Leu Ala His Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Leu  
20

15

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto peptídico que consiste en un bloque de aminoácidos hidrófilo y un bloque de aminoácidos hidrófobo;
- 5 [1] conteniendo el compuesto peptídico de 24 a 36 aminoácidos en total;
- [2] conteniendo el bloque de aminoácidos hidrófilo de 4 a 10 aminoácidos en total y teniendo un índice de hidropatía medio de -3,0 a -1,0; y
- 10 [3] conteniendo el bloque de aminoácidos hidrófobo de 20 a 32 aminoácidos en total, conteniendo uno o más residuos de His, y teniendo un índice de hidropatía medio de 1,0 a 2,5,
- 15 en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo consiste en aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de 0 o menos y el bloque de aminoácidos hidrófobo consiste en uno o más residuos de His y aminoácidos que tienen un índice de hidropatía mayor de 0 y
- 20 en el que aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de -3,0 o menos no son adyacentes entre sí en el bloque de aminoácidos hidrófobo cuando el bloque de aminoácidos hidrófobo comprende dos o más aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de -3,0 o menos.
2. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo tiene un índice de hidropatía medio de -2,0 a -1,5; y
- 25 el bloque de aminoácidos hidrófobo tiene un índice de hidropatía medio de 1,5 a 2,0.
3. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo comprende un aminoácido que tiene un índice de hidropatía de -3,0 o menos y un aminoácido que tiene un índice de hidropatía de 0 a -1,0; y
- 30 el bloque de aminoácidos hidrófobo comprende His y un aminoácido que tiene un índice de hidropatía mayor de 0.
4. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, en el que los aminoácidos que constituyen el bloque de aminoácidos hidrófilo son His o Glu, y Gly; y
- 35 los aminoácidos que constituyen el bloque de aminoácidos hidrófobo son His y cualquier aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ala, Met, Cys, Phe, Val e Ile.
- 40 5. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo tiene una secuencia peptídica que contiene de 0 a 5 residuos de His; y
- el bloque de aminoácidos hidrófobo tiene una secuencia peptídica que contiene de 1 a 8 residuos de His.
- 45 6. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo está representado por la siguiente fórmula (I):
- (AA<sub>1</sub>) (AA<sub>2</sub>) (AA<sub>3</sub>) (AA<sub>4</sub>) (I)
- 50 en la que dos cualesquiera de AA<sub>1</sub>, AA<sub>2</sub>, AA<sub>3</sub> y AA<sub>4</sub> son His o Glu, y los otros dos son Gly; y
- el bloque de aminoácidos hidrófobo contiene de 5 a 8 unidades representadas por la siguiente fórmula (II):
- (AA<sub>5</sub>) (AA<sub>6</sub>) (AA<sub>7</sub>) (AA<sub>8</sub>) (II)
- 55 en la que AA<sub>5</sub>, AA<sub>6</sub>, AA<sub>7</sub> y AA<sub>8</sub> son iguales o diferentes, y representan cada uno His, Leu o Ala, con la condición de que al menos una de las unidades de la fórmula (II) contenga uno o dos residuos de His; cada unidad puede tener la misma o diferente secuencia de aminoácidos.
- 60 7. Compuesto peptídico que consiste en un bloque de aminoácidos hidrófilo y un bloque de aminoácidos hidrófobo;
- [1] consistiendo el compuesto peptídico en de 24 a 36 aminoácidos en total;
- 65 [2] consistiendo el bloque de aminoácidos hidrófilo en de 4 a 10 aminoácidos en total y teniendo un índice de hidropatía medio de -3,0 a -1,0; y

[3] consistiendo el bloque de aminoácidos hidrófobo en de 20 a 32 aminoácidos en total, conteniendo uno o más residuos de His, y teniendo un índice de hidropatía medio de 1,0 a 2,5,

5 en el que el bloque de aminoácidos hidrófobo contiene de 5 a 8 unidades representadas por la siguiente fórmula (II):

(AA<sub>5</sub>) (AA<sub>6</sub>) (AA<sub>7</sub>) (AA<sub>8</sub>) (II)

10 en la que AA<sub>5</sub>, AA<sub>6</sub>, AA<sub>7</sub> y AA<sub>8</sub> son iguales o diferentes, y representan cada uno His, Leu o Ala, con la condición de que dos residuos de His entre las unidades o en cada unidad no sean adyacentes entre sí cuando el bloque de aminoácidos hidrófobo contiene dos o más residuos de His; y cada unidad puede tener la misma o diferente secuencia de aminoácidos

15 en el que el bloque de aminoácidos hidrófilo consiste en aminoácidos que tienen un índice de hidropatía de 0 o menos y el bloque de aminoácidos hidrófobo consiste en uno o más residuos de His y aminoácidos que tienen un índice de hidropatía mayor de 0.

20 8. Liposoma que comprende el compuesto peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un lípido.

9. Liposoma según la reivindicación 8, en el que el liposoma comprende del 1 al 10 % en moles del compuesto peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 basado en la cantidad total de lípidos en el liposoma.

25 10. Liposoma según la reivindicación 9, en el que el liposoma es un liposoma catiónico.

11. Liposoma según la reivindicación 8, en el que el liposoma encapsula una sustancia diana.

30 12. Composición farmacéutica que comprende el liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

13. Agente antitumoral que comprende el liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

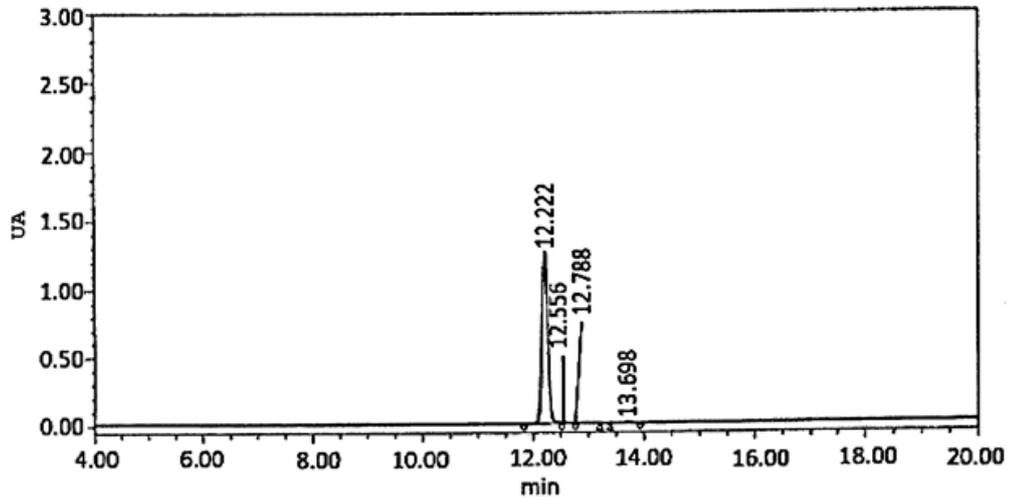
35 14. Liposoma según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer.

Fig. 1A

~datos de análisis por HPLC~

información de la muestra

Nombre de la muestra: 6939-Pure	Disolución A : H2O en TFA al 0.1%
Fecha del análisis: 29/07/2011 14:12:55	Disolución B : ACN en TFA al 0.1%
Cantidad de inyección: 10.00 µl	Condiciones de análisis: min %A %B
Velocidad de flujo: 1.0ml/min	0 90 10
Longitud de onda: 220nm	20 40 60



	Nombre de componente	Tiempo de retención (min)	Área (µV seg)	% de área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1		12.222	9032781	98.64	1262380		
2		12.556	66080	0.72	7067		
3		12.788	18971	0.21	2186		
4		13.698	39774	0.43	5203		

Fig. 1B

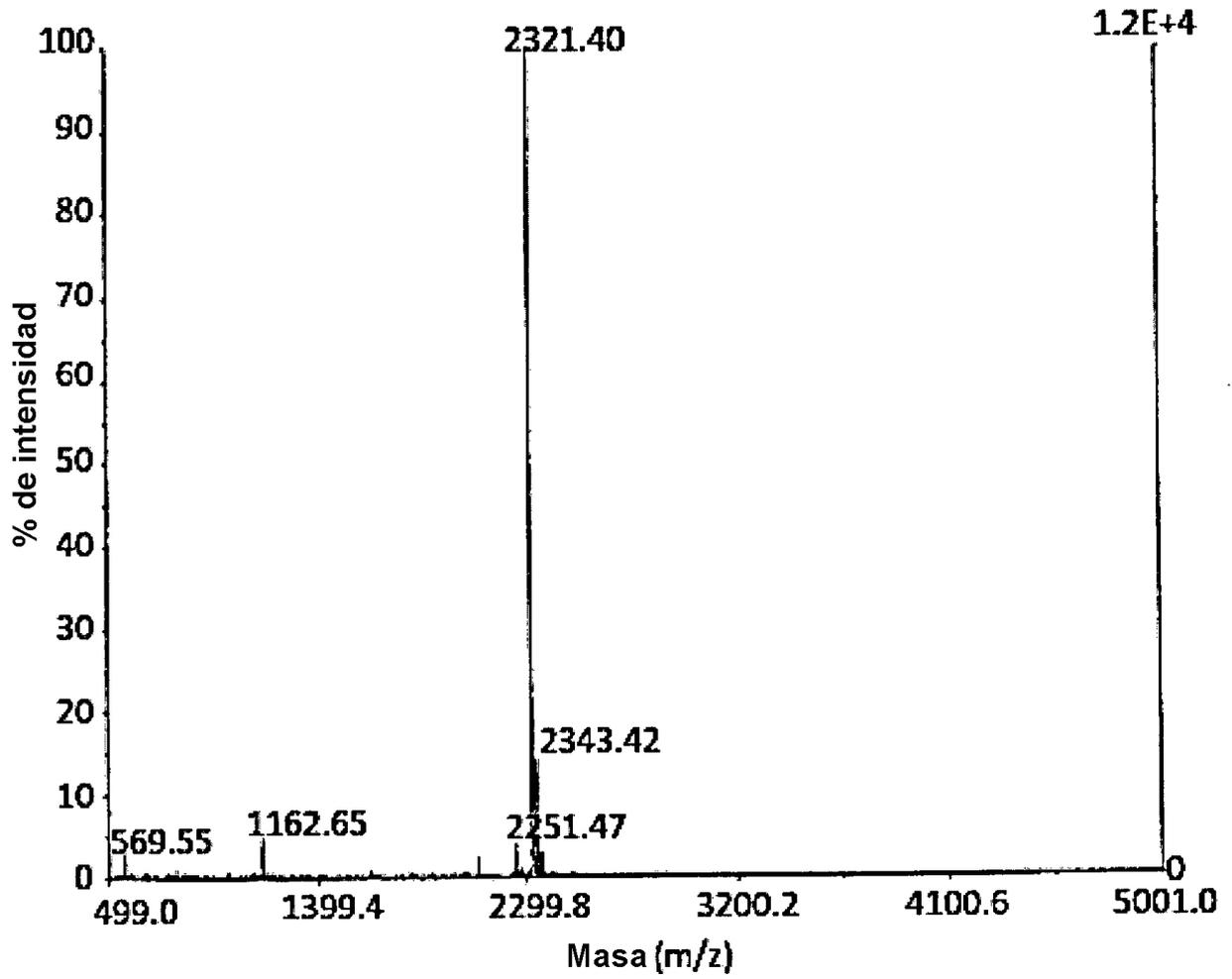
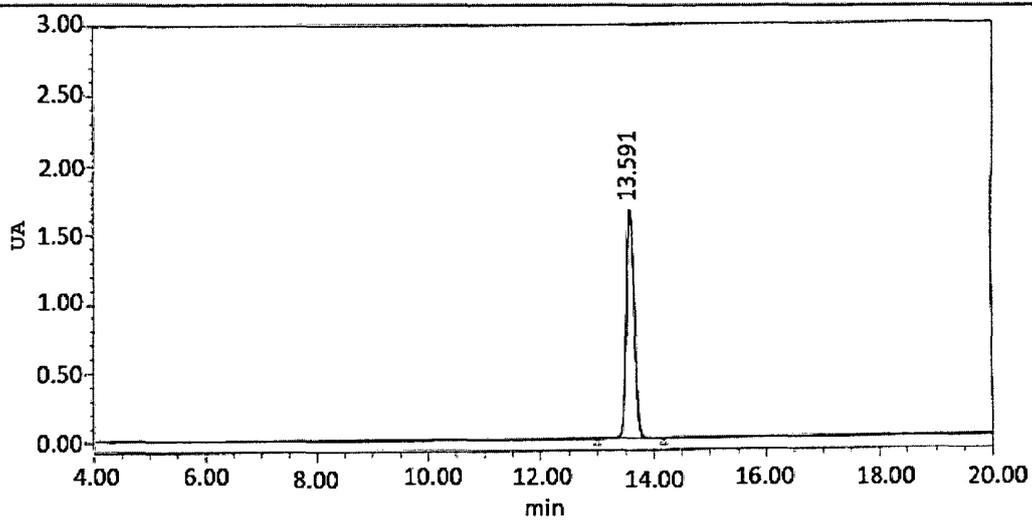


Fig. 2A

~ datos de análisis por HPLC ~

información de la muestra

Nombre de la muestra: 8303-Pure	Disolución A : H2O en TFA al 0.1%
Fecha del análisis: 25/04/2012 12:18:24	Disolución B : ACN en TFA al 0.1%
Cantidad de inyección: 10.00 µl	Condiciones de análisis: min %A %B
Velocidad de flujo: 1.0ml/min	0 90 10
Longitud de onda: 220nm	20 40 60



	Nombre de componente	Tiempo de retención (min)	Área (µV seg)	% de área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1		13.591	15864138	100.00	1654223		

Fig. 2B

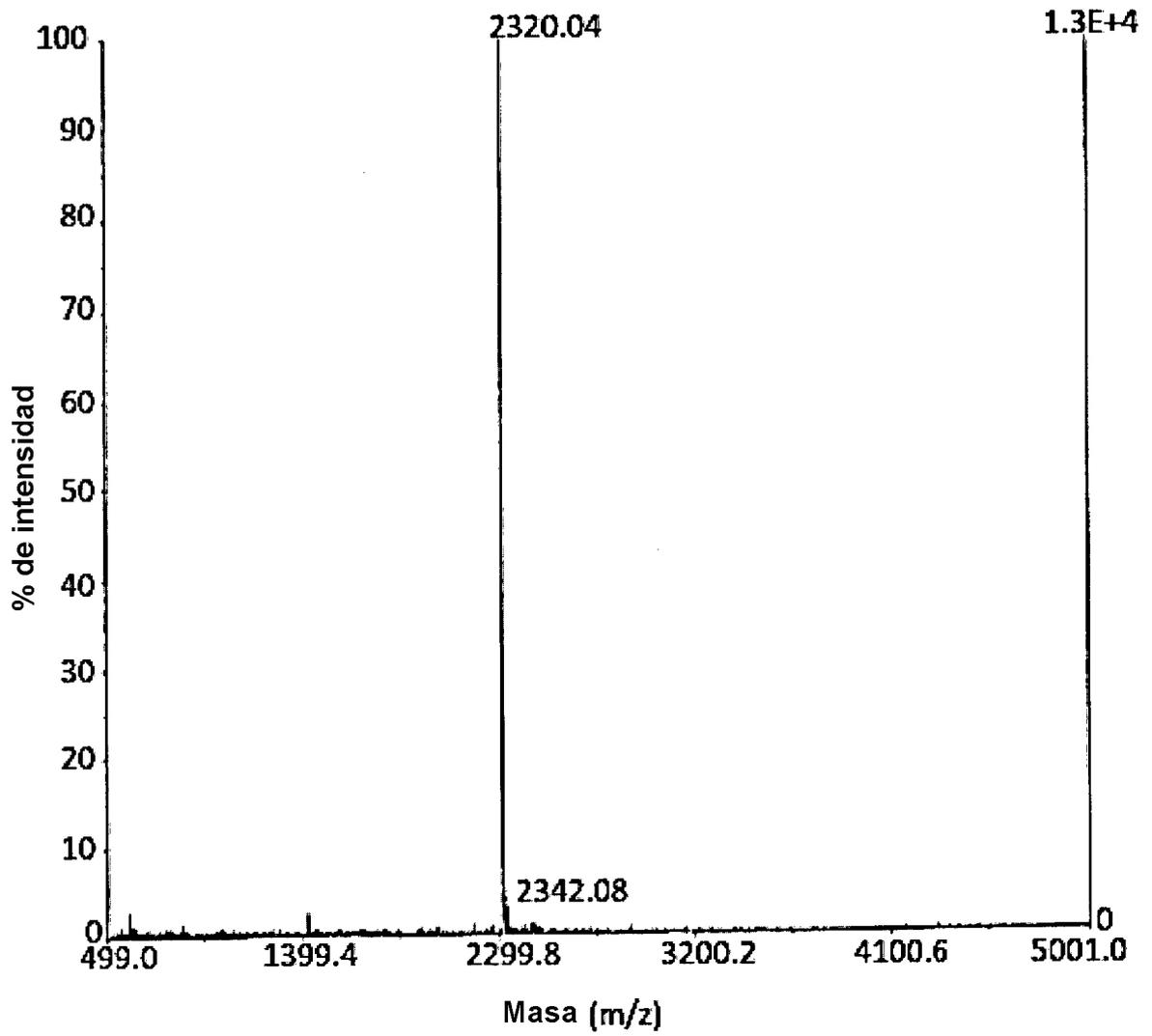


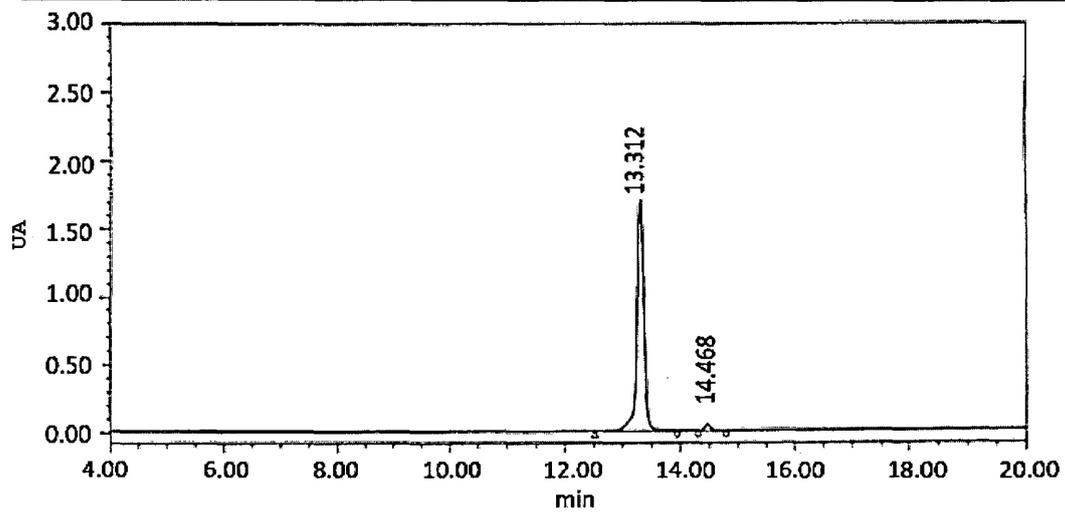
Fig. 3A

~ datos de análisis por HPLC ~

información de la muestra

Nombre de la muestra: 8769-Pure  
 Fecha del análisis: 27/08/2012 20:35:24  
 Cantidad de inyección: 10.00 µl  
 Velocidad de flujo: 1.0ml/min  
 Longitud de onda: 220nm

Disolución A : H2O en TFA al 0.1%  
 Disolución B : ACN en TFA al 0.1%  
 Condiciones de análisis: min %A %B  
 0 90 10  
 20 40 60



	Nombre de componente	Tiempo de retención (min)	Área (µV seg)	% de área	Altura	Concentración	Unidad
1		13.312	14418427	97.82	1706395		
2		14.468	321337	2.18	45377		

Fig. 3B

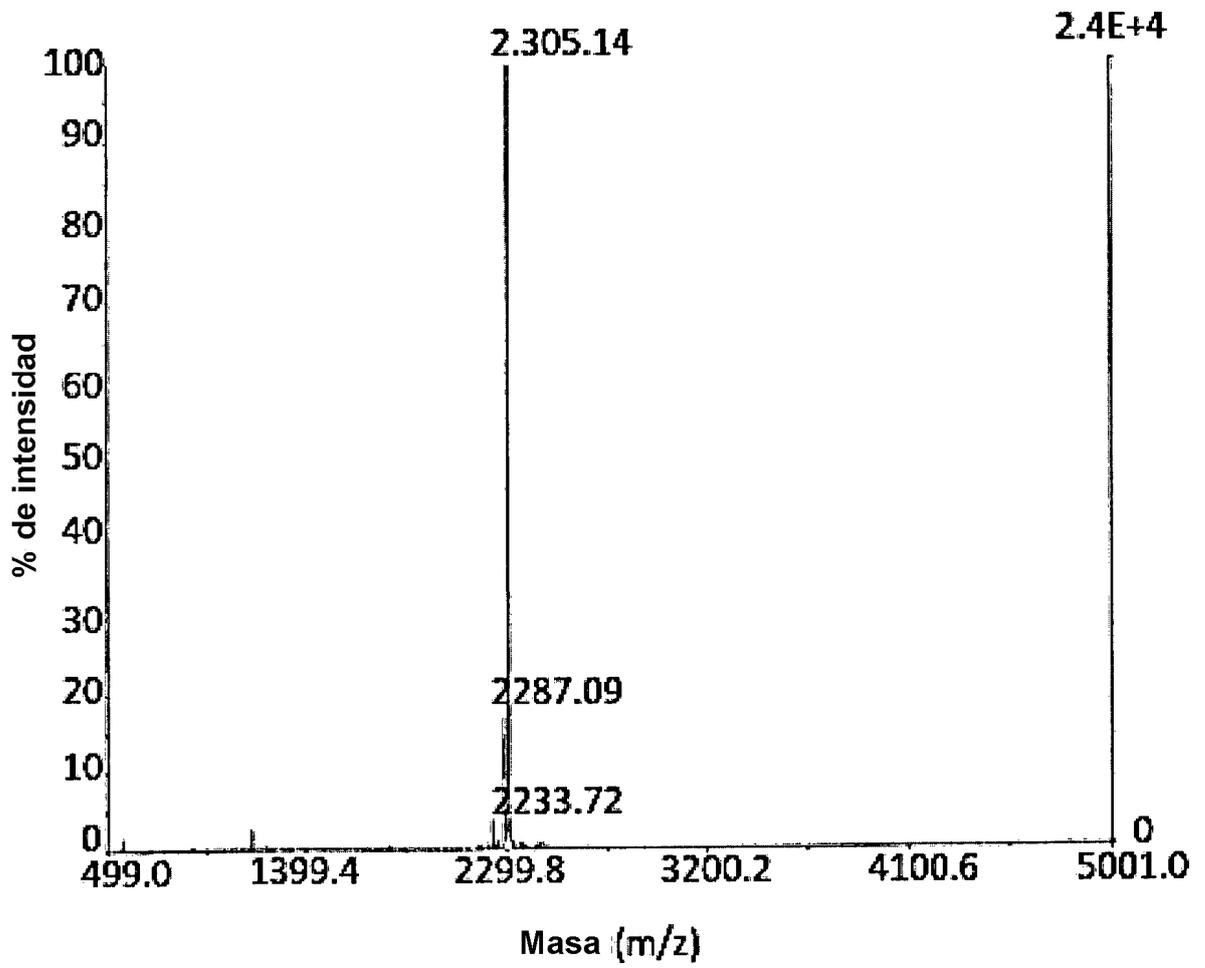
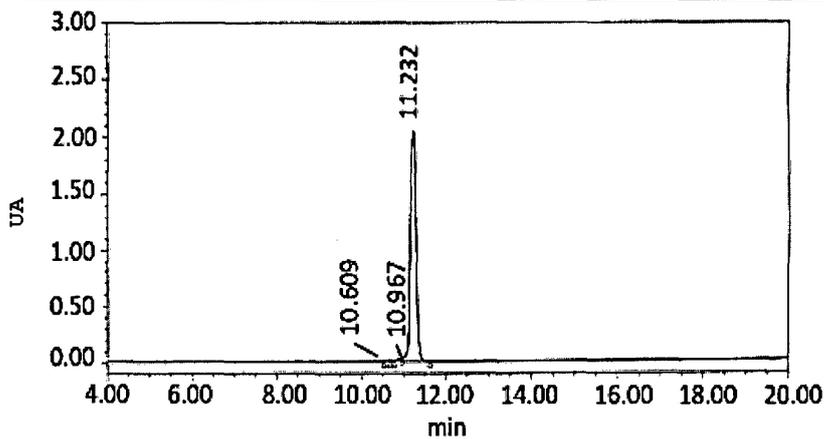


Fig. 4A

~ datos de análisis por HPLC ~

información de la muestra

Nombre de la muestra: 8767-Pure	Disolución A : H2O en TFA al 0.1%
Fecha del análisis: 24/08/2012 20:13:22	Disolución B : ACN en TFA al 0.1%
Cantidad de inyección: 10.00 µl	Condiciones de análisis: min %A %B
Velocidad de flujo: 1.0ml/min	0 90 10
Longitud de onda: 220nm	20 40 60



	Nombre de componente	Tiempo de retención (min)	Área (µV seg)	% de área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1		10.609	26266	0.13	5563		
2		10.967	136140	0.70	23305		
3		11.232	19367421	99.17	2041537		

Fig. 4B

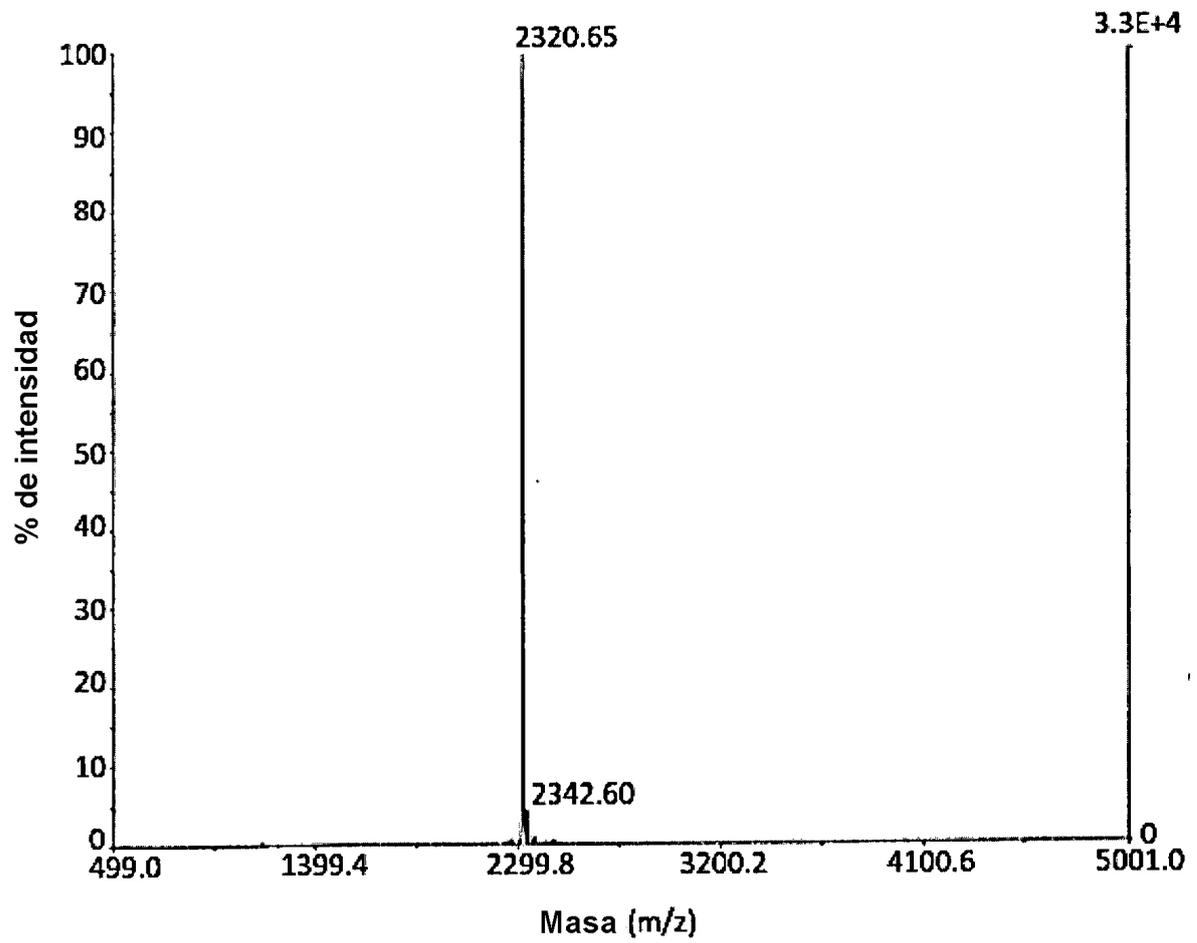
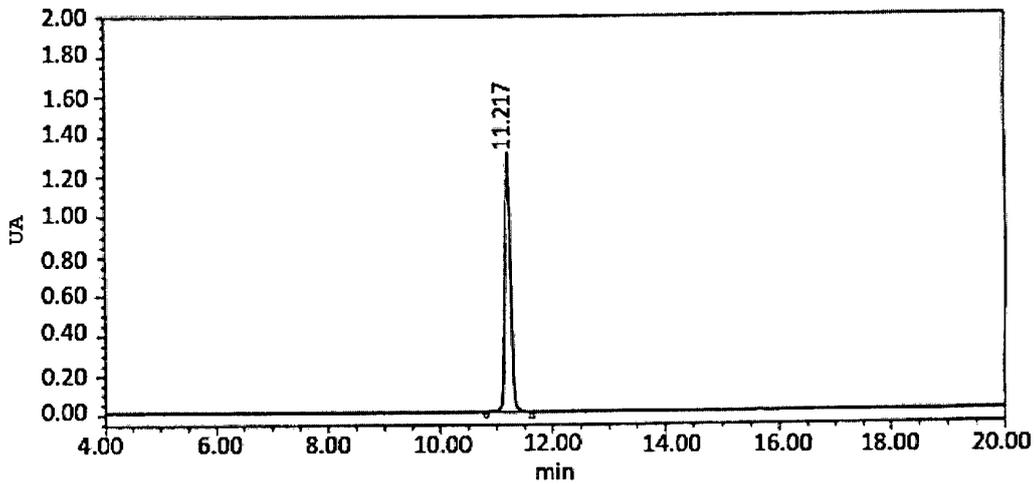


Fig. 5A

~ datos de análisis por HPLC ~

información de la muestra

Nombre de la muestra: 8768-Pure	Disolución A: H2O en TFA al 0.1%
Fecha del análisis: 27/08/2012 19:53:36	Disolución B: ACN en TFA al 0.1%
Cantidad de inyección: 10,00 µl	Condiciones de análisis: min %A %B
Velocidad de flujo: 1.0ml/min	0 95 5
Longitud de onda: 220nm	20 60 40



	Nombre de componente	Tiempo de retención (min)	Área (µV seg)	% de área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1		11.217	9115913	100.00	1301210		

Fig. 5B

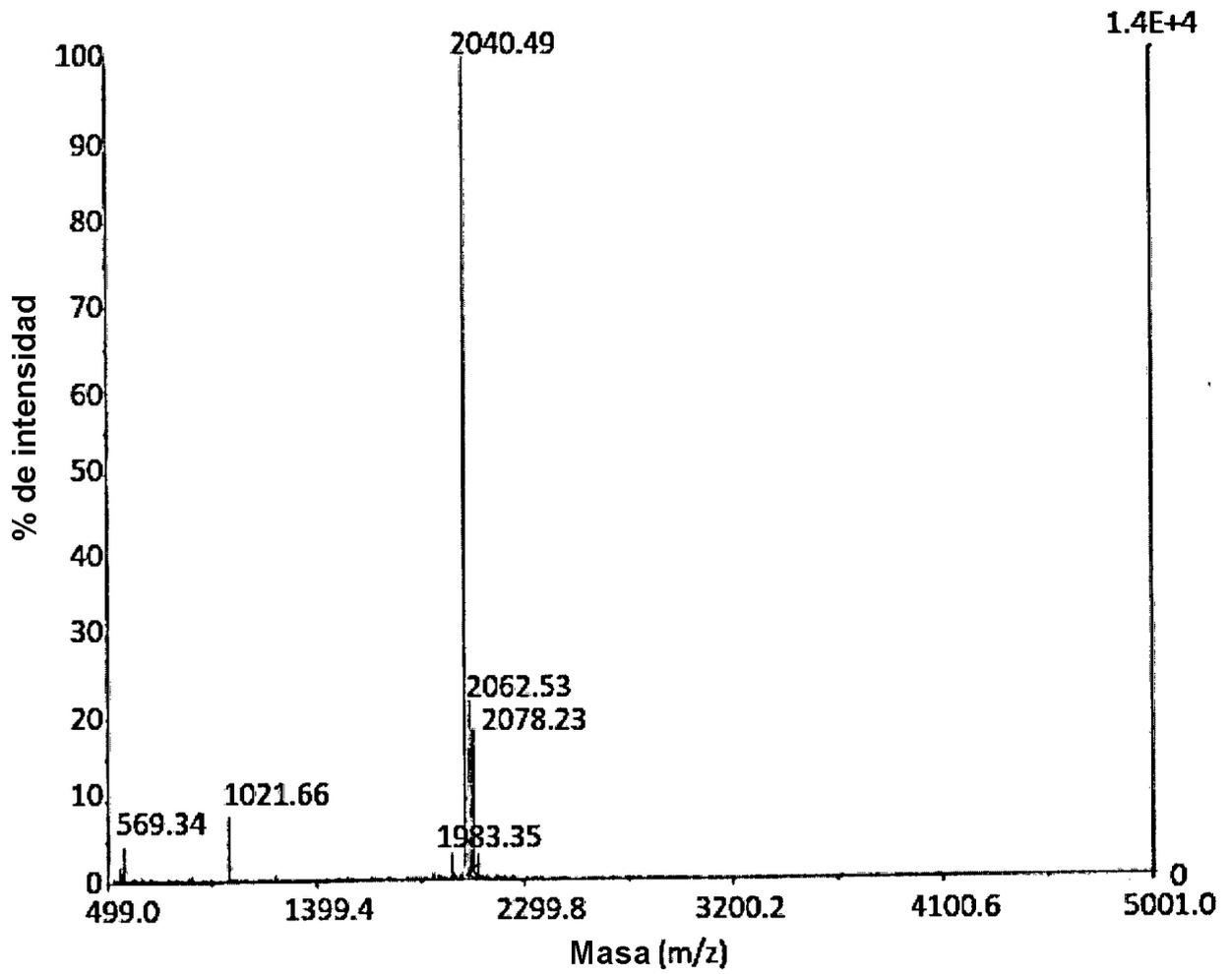


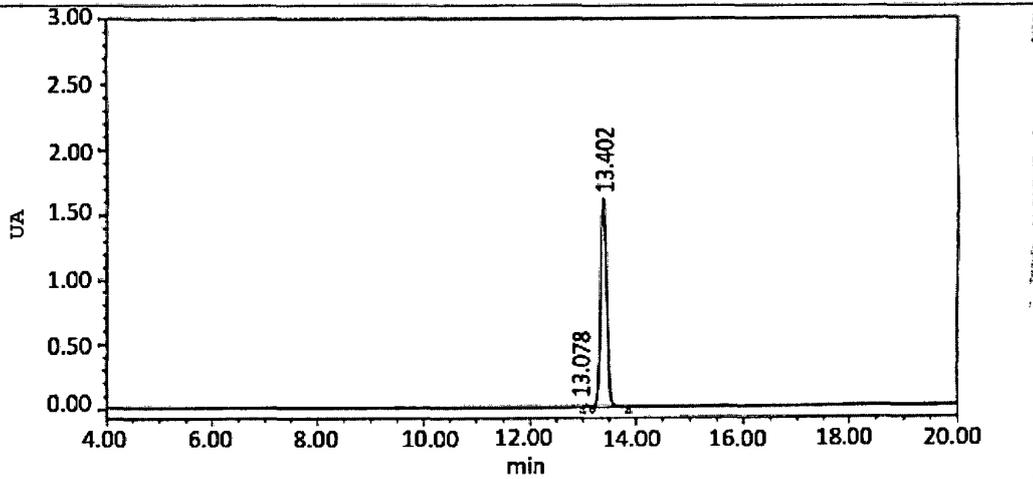
Fig. 6A

~ datos de análisis por HPLC ~

información de la muestra

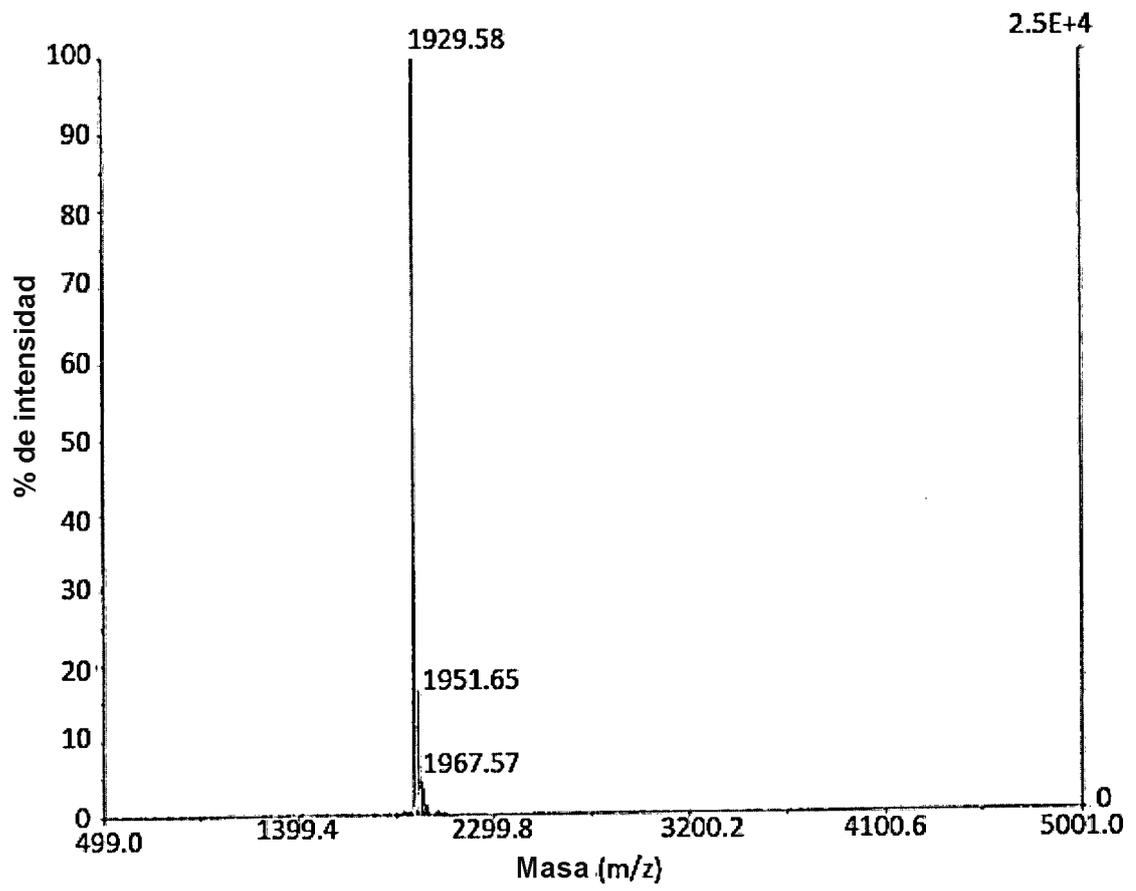
Nombre de la muestra: 8770-Pure  
 Fecha del análisis: 22/08/2012 11:53:01  
 Cantidad de inyección: 10.00 µl  
 Velocidad de flujo: 1.0ml/min  
 Longitud de onda: 220nm

Disolución A: H2O en TFA al 0.1%  
 Disolución B: ACN en TFA al 0.1%  
 Condiciones de análisis: min %A %B  
 0 90 10  
 20 40 60

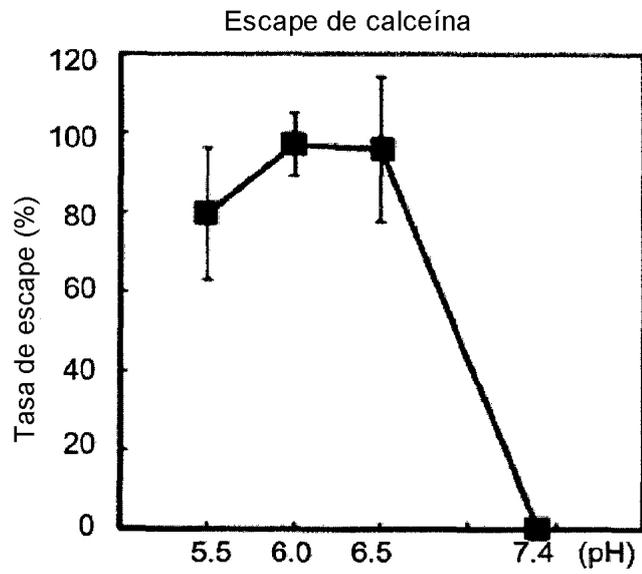


	Nombre de componente	Tiempo de retención (min)	Área (µV seg)	% de área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1		13.078	86324	0.66	15046		
2		13.402	12902083	99.34	1617808		

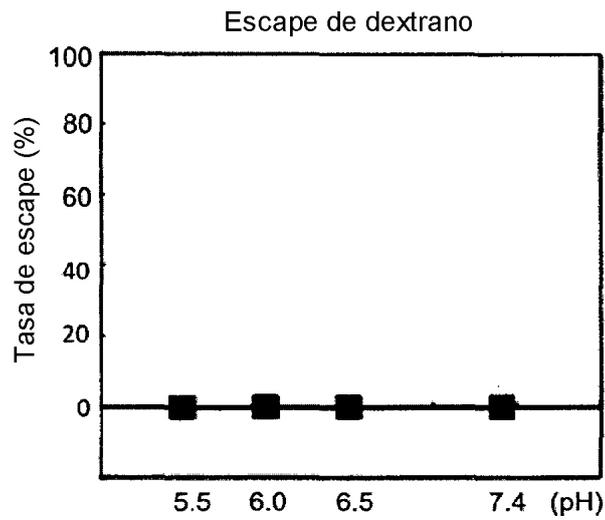
Fig. 6B



**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**

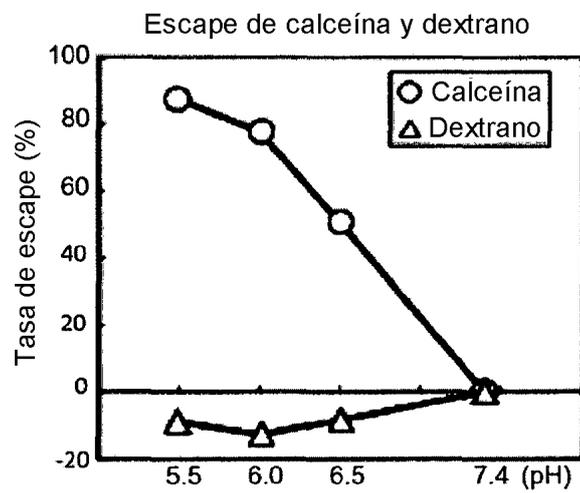


Fig. 10

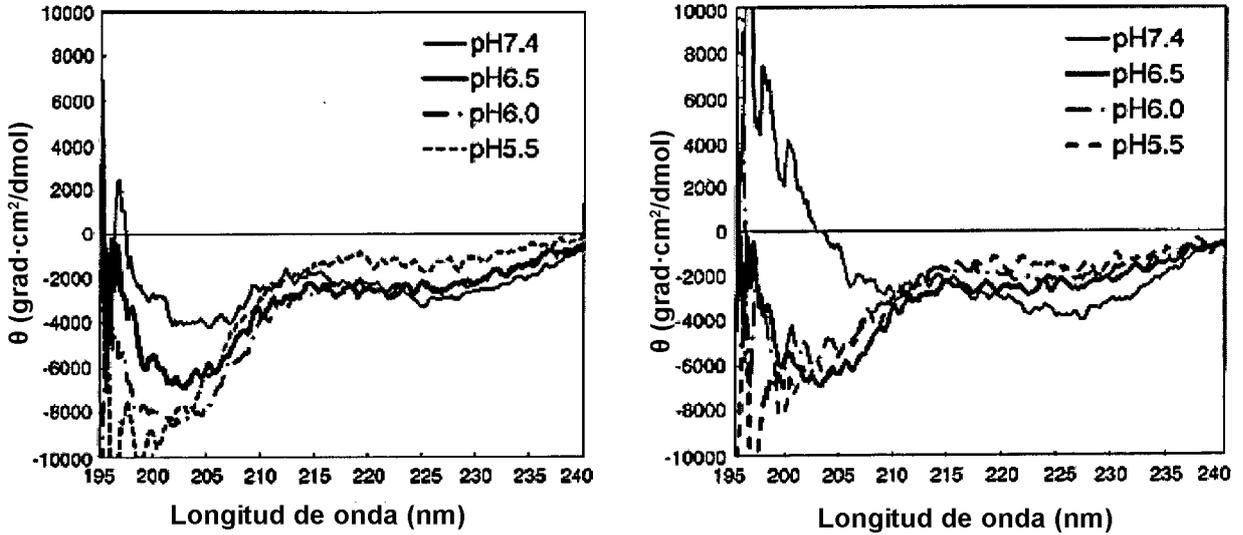


Fig. 11

