

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 778**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7084** (2006.01)

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61K 47/24** (2006.01)

**A61K 47/34** (2007.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2011** E 15159795 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017** EP 2918267

54 Título: **Composición farmacéutica particulada**

30 Prioridad:

**12.02.2010 JP 2010029486**

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

**09.10.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ISHII, ATSUSHI y  
KATO, YASUKI**

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 2 636 778 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 farmacéutica particulada

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica particulada que puede usarse como sistema de administración de fármacos (DDS) y está constituida por un fármaco y una composición de portador particulada que encapsula el fármaco.

**Técnica anterior**

10 Los productos farmacéuticos basados en biotecnología, que usan biomacromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos, son más propensos a degradación enzimática susceptible o eliminación por el sistema inmunitario, en comparación con productos farmacéuticos convencionales basados en compuestos de bajo peso molecular. Los documentos de patente 1 a 3 dan a conocer un DDS que contiene una biomacromolécula dentro de un liposoma constituido por una membrana de bicapa lipídica, lo cual pretende mejorar la estabilidad *in vivo* de productos farmacéuticos basados en biotecnología.

**Referencias de la técnica anterior**

15 **Documentos de patente**

Documento de patente 1: WO2001/034115

Documento de patente 2: WO1998/58630

Documento de patente 3: WO2005/092389

**Divulgación de la invención**

20 **Problemas que van a resolverse por la invención**

25 Los DDS convencionales descritos en los documentos de patente 1 a 3, en los que el fármaco de biomacromolécula está protegido con una membrana de bicapa lipídica, son superiores en cuanto a la estabilidad *in vivo* del fármaco, pero son inferiores en cuanto a la capacidad de liberación del fármaco a partir del portador. Además, debido al gran tamaño de partícula y también debido a la carga eléctrica del lípido que constituye la membrana de bicapa lipídica, es probable que los DDS convencionales se capturen por el sistema reticuloendotelial, tal como los pulmones, el hígado y el bazo, eliminándose así de la sangre antes de alcanzar la diana de administración.

30 Puede usarse como portador de DDS una micela polimérica formada con una unidad de copolímero de bloque que tiene un segmento de cadena polimérica hidrófobo y un segmento de cadena polimérica hidrófilo, y el DDS resultante puede tener un tamaño de partícula mucho más pequeño (por ejemplo, el tamaño de partícula promedio puede ser de 100 nm o más pequeño) que los DDS convencionales que usan un liposoma. Sin embargo, un DDS de este tipo que usa una micela polimérica como portador todavía tiene dificultad, en algunos casos, para administrar el fármaco a la diana de administración, debido a la falta de fuerza de encapsulación suficiente para mantener la biomacromolécula dentro de la partícula de DDS tal como se muestra en los ejemplos comparativos, lo cual se explicará a continuación. Además, un DDS de este tipo puede provocar algunas veces que el fármaco se desprenda del portador durante el periodo de almacenamiento tras la producción.

40 Los presentes inventores han desarrollado un DDS de micela polimérica. Se evita que la superficie exterior del DDS de micela recoja una sustancia cargada como consecuencia de una menor carga eléctrica (solicitud de patente japonesa n.º 2009-200681). Se evita que este DDS administre fármacos de forma errónea a la diana de administración como consecuencia de una menor adhesión de una biomolécula sobre la superficie del portador. Sin embargo, este DDS todavía tiene capacidad para prolongar la duración del efecto de encapsulación de fármaco.

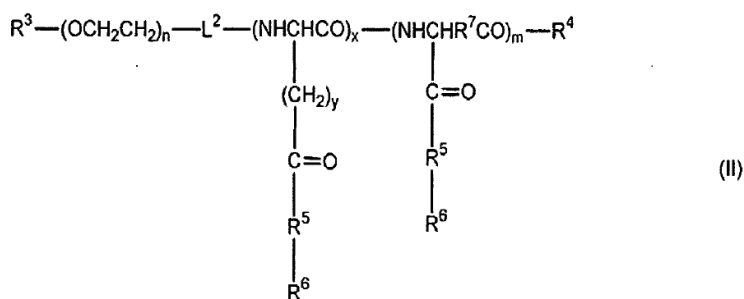
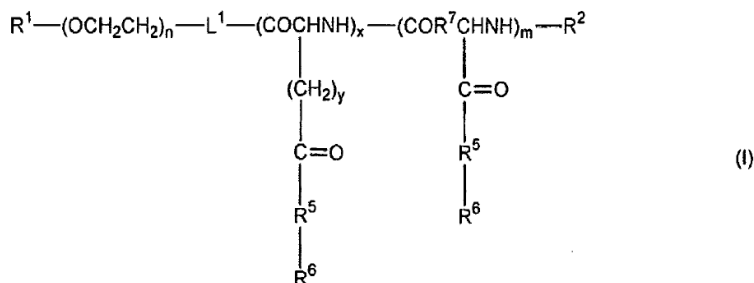
**Medios para resolver los problemas**

La presente invención proporciona una composición farmacéutica particulada que comprende:

un fármaco que incluye al menos una biomacromolécula seleccionada del grupo que consiste en una proteína y un ácido nucleico; y

una composición de portador que comprende una unidad de copolímero de bloque que tiene un segmento de cadena polimérica hidrófobo y un segmento de cadena polimérica hidrófilo soluble en agua, y un lípido cargado que porta una carga opuesta a la carga del fármaco,

en la que la unidad de copolímero de bloque es un compuesto representado por la fórmula (I) o la fórmula (II):



5

en las que

10  $R^1$  y  $R^3$ , independientemente uno de otro, son o bien un átomo de hidrógeno o bien un grupo representado por  $R^8(R^9)CH(CH_2)_q-$ , en el que  $R^8$  y  $R^9$ : i) independientemente uno de otro, son un átomo de hidrógeno, grupo alcoxilo  $C_{1-6}$ , grupo ariloxilo, grupo aril- $C_{1-3}$ -oxilo, grupo ciano, grupo carboxilo, grupo amino, grupo alcoxicarbonilo  $C_{1-6}$ , grupo acilamida  $C_{2-7}$ , grupo tri-(alquil  $C_{1-6}$ )-siloxilo, grupo siloxilo, o grupo sililamino, ii) juntos entre sí, forman un grupo etilendioxilo o grupo propilendioxilo, que están o bien no sustituidos o bien sustituidos con grupo alquilo  $C_{1-3}$ , o iii) junto con un grupo CH al que están unidos, forman un grupo formilo,

q es un número entero de desde 0 hasta 10,

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

15  $R^4$  es un grupo hidroxilo, grupo oxilo alifático  $C_1-C_{30}$  saturado o insaturado, o grupo aril-(alquil inferior)-oxilo,

$R^5$  es -O- o -NH-,

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

$R^7$  es un grupo metileno,

20 n es un número entero de desde 55 hasta 4.600,

x es un número entero de desde 10 hasta 200,

25 m es un número entero de desde 0 hasta 200, en el que cuando m es uno o más, las unidades (COCHNH) y la(s) unidad(es) (COR<sup>7</sup>CHNH) se disponen en cualquier orden, y cuando m es dos o más,  $R^6$  se selecciona para cada unidad de aminoácido independientemente unos de otros y se disponen en el copolímero de bloque en un orden aleatorio, siempre que los átomos de hidrógeno no representen el 75% o más de  $R^6$ ,

y es 1 ó 2,

$L^1$  es un grupo de unión seleccionado de -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, -CH<sub>2</sub>- y -O-Z-S-Z-NH-, en los que Z,

independientemente uno de otro, significa grupo alquileo  $C_1-C_6$ , y

$L^2$  es un grupo de unión seleccionado de  $-OCO-Z-CO-$  y  $-NHCO-Z-CO-$ , en los que Z es un grupo alquileo  $C_1-C_6$ , y

5 en la que una pluralidad de las unidades de copolímero de bloque se disponen radialmente con los segmentos de cadena polimérica hidrófobos radialmente en el interior y los segmentos de cadena polimérica hidrófilos radialmente en el exterior; atrayéndose el lípido cargado al segmento de cadena polimérica hidrófobo; y el fármaco está colocado radialmente en el interior de los segmentos de cadena polimérica hidrófobos, mediante lo cual se evita que el fármaco se desprenda de la partícula.

10 La unidad de copolímero de bloque que tiene un segmento de cadena polimérica hidrófilo y un segmento de cadena polimérica hidrófobo (con frecuencia derivado de una cadena de poliaminoácido, en la que parte o la totalidad de la cadena de poliaminoácido puede formar una hélice  $\alpha$ ); un fármaco; y un lípido cargado que porta una carga opuesta a la carga del fármaco (en la que el lípido cargado puede disponerse alrededor de la hélice  $\alpha$ ). El fármaco incluye al menos una biomacromolécula seleccionada del grupo que consiste en una proteína y un ácido nucleico. En la composición farmacéutica particulada, una pluralidad de las unidades de copolímero de bloque se disponen radialmente con los segmentos de cadena polimérica hidrófobos radialmente en el interior y los segmentos de

15 cadena polimérica hidrófilos radialmente en el exterior. El lípido cargado se atrae al segmento de cadena polimérica hidrófobo. El fármaco se coloca radialmente en el interior de los segmentos de cadena polimérica hidrófobos, mediante lo cual se evita que el fármaco se desprenda de la partícula.

### Efectos de la invención

20 La composición farmacéutica según la presente invención tiene una estabilidad de encapsulación de fármaco mejorada y es adecuada para DDS. Esta composición farmacéutica puede administrar el fármaco de manera más fiable que los DDS convencionales, y es especialmente útil para una diana de administración que requiere un periodo más largo de administración de fármaco.

### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1(a) y 1(b) ilustran un ejemplo de la estructura de la composición farmacéutica de la presente invención;

25 las figuras 2(a) y 2(b) ilustran un ejemplo de cambio de distribución de fármaco en la partícula entre antes y después de una operación de congelación;

las figuras 3(a) y 3(b) indican resultados de evaluación de la estabilidad de encapsulación de fármaco de composiciones farmacéuticas; y

las figuras 4(a) y 4(b) indican resultados de

### 30 Descripción de realizaciones

En la siguiente descripción se hace referencia a las figuras 1 y 2 únicamente con el fin de ayudar a entender la presente invención. Las figuras 1 y 2 son meros diagramas ilustrativos a los que no debe limitarse la presente invención. Por ejemplo, aunque las figuras 1 y 2 ilustran un ejemplo en el que el lípido cargado es catiónico y el fármaco es aniónico, la presente invención no debe limitarse a este ejemplo.

35 La figura 1 (a) ilustra un ejemplo de la estructura de la composición farmacéutica particulada según la presente invención (también denominada a continuación en el presente documento "composición farmacéutica"). La composición 1 farmacéutica contiene una unidad 2 de copolímero de bloque, un lípido 3 cargado, y un fármaco 4. La figura 1 (b) es una vista aumentada de la unidad 2 de copolímero de bloque, que tiene un segmento 2a de cadena polimérica hidrófilo y un segmento 2b de cadena polimérica hidrófobo. Las unidades 2 de copolímero de bloque

40 están dispuestas radialmente en la composición 1 farmacéutica con los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos radialmente en el interior y los segmentos 2a de cadena polimérica hidrófilos radialmente en el exterior. El lípido 3 cargado porta una carga opuesta a la carga del fármaco 4, y se atrae a los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos.

45 En la composición 1 farmacéutica según la presente invención, el fármaco 4 se coloca radialmente en el interior de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos, tal como se muestra en la figura 1 (a). Esto no significa que todos los fármacos 4 contenidos en la composición 1 farmacéutica deban colocarse radialmente en el interior de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos; algunos de los fármacos 4 pueden colocarse radialmente en el exterior de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos. Esta disposición en la composición 1 farmacéutica de la presente invención sirve para evitar que los fármacos 4 se desprendan de la partícula, es decir, para mejorar la

estabilidad de encapsulación de los fármacos 4.

La composición 1 farmacéutica puede producirse, por ejemplo, llevando a cabo una operación de congelación con un precursor de composición farmacéutica, en el que el fármaco se coloca fuera de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos. El precursor 1' de composición farmacéutica puede formarse fácilmente incorporando los fármacos dentro de una composición de portador de una manera conocida, tal como se explicará a continuación. La figura 2(a) ilustra la distribución de los fármacos 4 en la partícula del precursor 1' de composición farmacéutica antes de la operación de congelación, y la figura 2(b) ilustra la distribución de los fármacos 4 en la partícula del precursor 1' de composición farmacéutica tras la operación de congelación. Tal como se muestra en la figura 2(a), los fármacos 4 se colocan fuera de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos en la partícula del precursor 1' de composición farmacéutica. Mediante la operación de congelación, los fármacos 4 se mueven radialmente hacia el interior, dando como resultado la composición 1 farmacéutica en la que, tal como se muestra en la figura 2(b), los fármacos 4 se colocan radialmente en el interior de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos. Por tanto, la composición 1 farmacéutica de la presente invención puede producirse transfiriendo los fármacos 4, que se colocan radialmente en el exterior de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos en el precursor 1' de composición farmacéutica, radialmente hacia el interior de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos mediante la operación de congelación. El motivo por el cual se produce tal transferencia de fármaco no queda exactamente claro, pero se cree que la disposición de los copolímeros 2 de bloque y los lípidos 3 cargados que forman la composición de portador se ve alterada por la operación de congelación provocando huecos, a través de los cuales se introducen los fármacos 4 al interior de la parte interna de la partícula. La operación de congelación puede llevarse a cabo al menos una vez, pero preferiblemente debe llevarse a cabo dos veces o más. Repetir la operación de congelación puede facilitar la introducción de los fármacos 4 al interior de la parte interna de la partícula.

La operación de congelación puede ser cualquier operación siempre que implique la congelación de una determinada composición, tal como una operación de secado por congelación y una operación de congelación y descongelación.

La operación de secado por congelación (liofilización) incluye las etapas de: congelar la composición (etapa de congelación A); y secar la composición congelada (etapa de secado). La etapa de congelación A puede realizarse manteniendo la composición a una temperatura de -200°C o superior, preferiblemente -100°C o superior, y -10°C o inferior, preferiblemente -20°C o inferior durante un periodo de una hora o más, preferiblemente 5 horas o más, y 72 horas o menos, preferiblemente 24 horas o menos. La etapa de secado puede realizarse despresurizando la presión ambiental de la composición congelada hasta un estado de vacío (por ejemplo, de 15 Pa o inferior) para inducir que el contenido de agua se sublime. Con el fin de facilitar la sublimación, preferiblemente debe aumentarse la temperatura ambiental durante la despresurización, de manera o bien gradual o bien continua, hasta una temperatura superior a la temperatura en la etapa de congelación, por ejemplo, de -20°C o superior o -10°C o superior. El límite superior para la temperatura ambiental aumentada puede ser de aproximadamente 25°C. La duración temporal de la etapa de secado puede ser de 5 horas o más, preferiblemente 20 horas o más. El límite superior para la duración temporal de la etapa de secado puede ser de 100 horas, aunque no se limita a ello. Dado que la composición 1 farmacéutica obtenida mediante la operación de secado por congelación está en el estado seco, preferiblemente debe disolverse en un disolvente conocido, tal como agua, cuando se usa.

La operación de congelación y descongelación incluye las etapas de: congelar la composición de una manera similar a la etapa de congelación A; y descongelar la composición congelada (etapa de descongelación). La etapa de descongelación puede realizarse manteniendo la composición a una temperatura de 4°C o superior, preferiblemente 10°C o superior, y 40°C o inferior, preferiblemente 30°C o inferior durante un periodo de 30 minutos o más, preferiblemente una hora o más, y 24 horas o menos, preferiblemente 5 horas o menos.

Puede determinarse si los fármacos 4 se colocan radialmente en el interior de los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos basándose, por ejemplo, en si el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 farmacéutica es superior al de una partícula que contiene fármaco que tiene la misma constitución que la composición 1 farmacéutica pero se produce sin operación de congelación. Esto es así porque los fármacos 4 se alejan de la superficie exterior de la partícula hacia la parte interna de la partícula mediante la operación de congelación, mediante lo cual los lípidos 3 cargados aumentan su influencia sobre el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 farmacéutica.

El lípido 3 cargado en el presente documento significa o bien un lípido aniónico, que tiene más cargas negativas que cargas positivas en un medio acuoso con un pH fisiológico (por ejemplo, pH 7,4), o un lípido catiónico, que tiene más cargas positivas que cargas negativas en el medio acuoso. Los lípidos que tienen grupos tanto catiónicos como aniónicos (es decir, los denominados lípidos anfóteros) también deben considerarse basándose en el mismo criterio.

El lípido 3 cargado retiene el fármaco 4 dentro de la composición 1 farmacéutica mediante unión electrostática. El lípido 3 cargado sólo puede tener una carga eléctrica opuesta a la carga del fármaco 4 al menos en el entorno de almacenamiento de la composición 1 farmacéutica. El lípido 3 cargado debe tener preferiblemente una carga opuesta a la del fármaco 4 en entornos fisiológicos, tales como en la sangre (por ejemplo, pH 7,4).

Los lípidos 3 cargados se atraen a los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos mediante el siguiente mecanismo. La composición de portador, que es un material de base para la composición 1 farmacéutica de la presente invención, puede formarse mediante un método que incluye, por ejemplo, la etapa de suspender las unidades 2 de copolímero de bloque y los lípidos 3 cargados en una disolución acuosa. Los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos de las unidades 2 de copolímero de bloque no pueden dispersarse, sino que forman un agregado, en la disolución acuosa debido a su hidrofobia, mientras que los segmentos 2a de cadena polimérica hidrófilos pueden dispersarse, y moverse libremente, en la disolución acuosa. Por tanto, las unidades 2 de copolímero de bloque se disponen radialmente en la disolución acuosa, con los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos radialmente en el interior y los segmentos 2a de cadena polimérica hidrófilos radialmente en el exterior. Los lípidos 3 cargados se atraen a los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos, ya que son altamente hidrófobos y tienen mayor afinidad por los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos que por el agua o los segmentos 2a de cadena polimérica hidrófilos. Por tanto, los lípidos 3 cargados se disponen alejados de la superficie exterior de la composición de portador e, incluso tras la operación de congelación explicada a continuación, siguen atrayéndose a los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos.

En la composición 1 farmacéutica de la presente invención, los lípidos 3 cargados se atraen a los segmentos 2b de cadena polimérica hidrófobos, mediante lo cual se evita que la superficie exterior de la composición 1 farmacéutica se cargue como para atraer una sustancia que tiene una carga opuesta a la de los lípidos 3 cargados (por ejemplo, proteínas de la sangre). Este estado puede confirmarse basándose en, es decir, si el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 farmacéutica es inferior a un valor predeterminado. Más específicamente, el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 farmacéutica debe ser preferiblemente de 15 mV o inferior, más preferiblemente 12 mV o inferior, todavía más preferiblemente 6 mV o inferior, incluso más preferiblemente 3 mV o inferior. El potencial zeta puede medirse añadiendo la composición de portador o la composición 1 farmacéutica a una disolución de tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) en una cantidad tal como para que la razón de los lípidos cargados totales con respecto a la disolución de tampón sea de 0,1 mg/ml.

La razón en peso de la cantidad de las unidades de copolímero de bloque con respecto a la cantidad de los lípidos 3 cargados debe ser preferiblemente de 1,0 o superior, más preferiblemente 1,5 o superior, todavía más preferiblemente 2,0 o superior, y preferiblemente 50 o inferior, más preferiblemente 20 o inferior, todavía más preferiblemente 10 o inferior. Cuanto mayor es la razón, menor es el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 farmacéutica. Por otro lado, pueden introducirse fármacos de manera más activa en la partícula a medida que la razón de los lípidos 3 cargados se vuelve mayor, motivo por el cual la razón debe limitarse preferiblemente a 50 o inferior tal como se mencionó anteriormente.

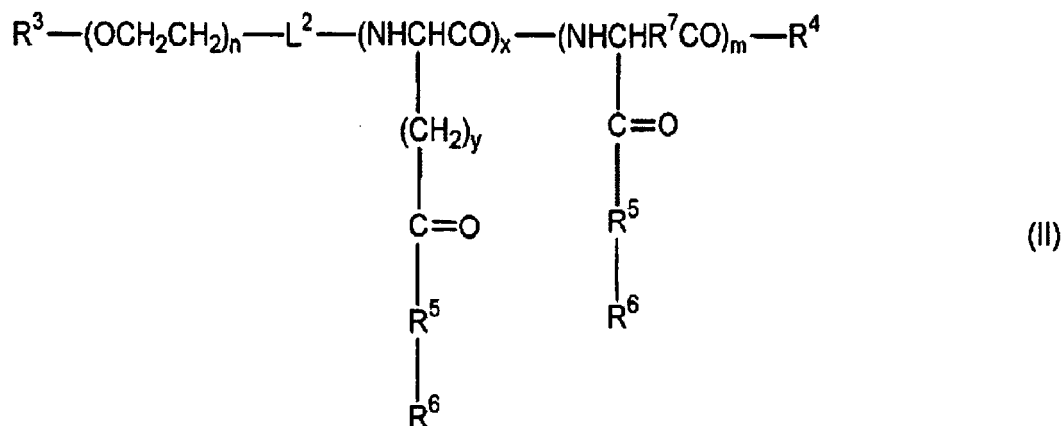
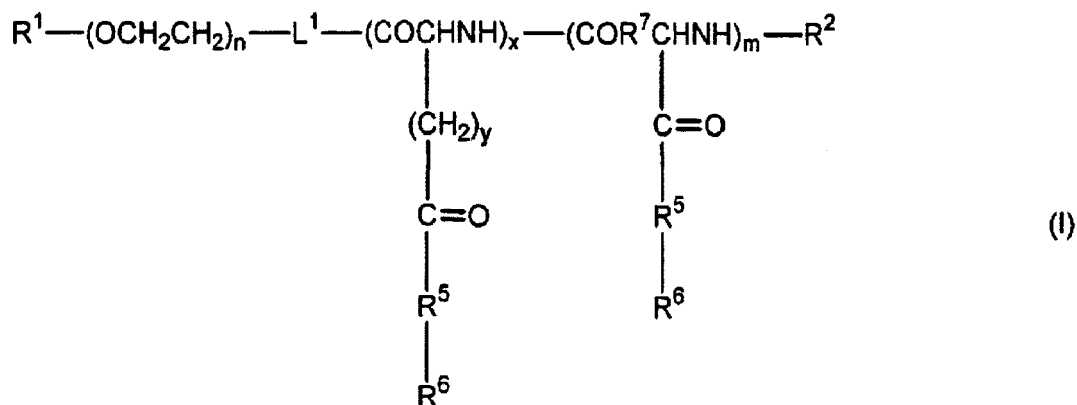
Los lípidos pueden ser un lípido simple, un lípido conjugado o un lípido derivado. Los ejemplos de los mismos incluyen fosfolípidos, glicoglicerolípidos, glucoesfingolípidos, esfingoides y esteroides. Específicamente, los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen 1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano (DOTAP), cloruro de N-(2,3-dioleoiloxipropan-1-il)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2-(esperminacarboxiamida)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxiethylamonio (DMRIE), bromuro de 1,2-dioleoiloxipropil-3-dietilhidroxiethylamonio (DORIE) y 3[3--[N-(N<sup>1</sup>-dimetilaminoetil)carbamoil]colesterol (DC-Chol). Los ejemplos de lípidos aniónicos incluyen cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-succinilfosfatidiletanolamina (N-succinil-PE), ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidiletilenglicol y succinato de colesterol. La composición 1 farmacéutica puede contener dos o más clases de lípidos 3 cargados.

El segmento 2a de cadena polimérica hidrófilo debe ser preferiblemente un segmento de cadena polimérica soluble en agua compuesto por polietilenglicol o polioxietileno. El peso molecular del segmento 2a de cadena polimérica hidrófilo debe ser preferiblemente de 2.500 Da o superior, más preferiblemente 5.000 Da o superior, todavía más preferiblemente 8.000 Da o superior, y preferiblemente 200.000 Da o inferior, más preferiblemente 20.000 Da o inferior, todavía más preferiblemente 15.000 Da o inferior. El segmento 2b de cadena polimérica hidrófobo debe ser preferiblemente un segmento derivado de una cadena de poliaminoácido, parte o la totalidad de la cual puede formar la hélice  $\alpha$  en la composición 1 farmacéutica, mediante lo cual los lípidos 3 cargados pueden atraerse a la hélice  $\alpha$  de la cadena de poliaminoácido, es decir, dispersarse alrededor de la hélice  $\alpha$ . El número de unidades de repetición en el segmento 2b de cadena polimérica hidrófobo debe ser preferiblemente de 10 o superior, más preferiblemente 20 o superior, y preferiblemente 200 o inferior, más preferiblemente 100 o inferior, todavía más preferiblemente 60 o inferior. Con el fin de reducir el valor absoluto del potencial zeta de la composición 1 farmacéutica, es decir, para reducir la carga superficial de la composición 1 farmacéutica (para que sea más próxima a la neutra), el tamaño del segmento 2a de cadena polimérica hidrófilo (peso molecular) debe ser preferiblemente mayor que el tamaño del segmento 2b de cadena polimérica hidrófobo (el número de unidades de repetición) en la unidad 2 de copolímero de bloque. El segmento 2a de cadena polimérica hidrófilo y/o el segmento 2b de cadena polimérica hidrófobo pueden formar una estructura ramificada. Por ejemplo, una única cadena de un segmento puede acoplarse a dos o más cadenas del otro segmento.

El segmento 2a de cadena polimérica hidrófilo y el segmento 2b de cadena polimérica hidrófobo también pueden tener un sustituyente cargado tal como un grupo amino y grupo carboxilo, siempre que la superficie de partícula exterior de la composición 1 farmacéutica no porte una carga que pueda atraer una sustancia cargada.

El segmento 2a de cadena polimérica hidrófilo y el segmento 2b de cadena polimérica hidrófobo pueden unirse entre sí mediante formación de enlaces covalentes de los extremos terminales de sus cadenas principales. Más específicamente, ejemplos de la unidad 2 de copolímero de bloque son los compuestos representados por las fórmulas generales (I) y (II). La composición 1 farmacéutica contiene dos o más clases de las unidades 2 de copolímero de bloque.

5



En las fórmulas (I) y (II),

10  $R^1$  y  $R^3$ , independientemente uno de otro, son o bien un átomo de hidrógeno o bien un grupo representado por  $R^8(R^9)CH(CH_2)_q$ , en el que  $R^8$  y  $R^9$ : i) independientemente uno de otro, son un átomo de hidrógeno, grupo alcoxilo  $C_{1-6}$ , grupo ariloxilo, grupo aril- $C_{1-3}$ -oxilo, grupo ciano, grupo carboxilo, grupo amino, grupo alcoxycarbonilo  $C_{1-6}$ , grupo acilamida  $C_{2-7}$ , grupo tri-(alquil  $C_{1-6}$ )-siloxilo, grupo siloxilo, o grupo sililamino; ii) juntos entre sí, forman un grupo etilendioxilo o grupo propilendioxilo, que están o bien no sustituidos o bien sustituidos con grupo alquilo  $C_{1-3}$ ; o iii) junto con un grupo CH al que están unidos, forman un grupo formilo;

15 q es un número entero de desde 0 hasta 10;

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

$R^4$  es un grupo hidroxilo, grupo oxilo alifático  $C_1-C_{30}$  saturado o insaturado, o grupo aril-(alquil inferior)-oxilo;

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

20  $R^6$  es un átomo de hidrógeno, grupo fenilo, grupo bencilo, grupo  $-(CH_2)_4$ -fenilo, grupo alquilo  $C_9-C_{15}$  que está o bien no sustituido o bien sustituido con grupo amino o grupo carbonilo, o residuo derivado de esteroil;

$R^7$  es un grupo metileno;

n es un número entero de desde 55 hasta 4.600;

x es un número entero de desde 10 hasta 200;

m es un número entero de desde 0 hasta 200 (en el que cuando m es uno o más, las unidades (COCHNH) y la(s) unidad(es) (COR<sup>7</sup>CHNH) pueden disponerse en cualquier orden, y cuando m es dos o más, R<sup>6</sup> se selecciona para cada unidad de aminoácido independientemente unos de otros y pueden disponerse en el copolímero de bloque en un orden aleatorio, siempre que los átomos de hidrógeno no deben representar más del 75% o más de R<sup>6</sup>);

5 y es 1 ó 2;

L<sup>1</sup> es un grupo de unión seleccionado de -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, -CH<sub>2</sub>- y -O-Z-S-Z-NH- (en los que Z, independientemente uno de otro, significa grupo alquileo C<sub>x</sub>-C<sub>s</sub>); y

L<sup>2</sup> es un grupo de unión seleccionado de -OCO-Z-CO- y -NHCO-Z-CO- (en los que Z es un grupo alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).

10 En las fórmulas (I) y (II), n es un número entero de preferiblemente 110 o mayor, más preferiblemente 180 o mayor, y preferiblemente 460 o menor, más preferiblemente 340 o menor; x es un número entero de preferiblemente 20 o mayor, y preferiblemente 100 o menor, más preferiblemente 60 o menor; y m es un número entero de preferiblemente 100 o menor, más preferiblemente 60 o menor.

15 La unidad 2 de copolímero de bloque puede ser un polímero aniónico, un polímero catiónico, o un polímero neutro. Tal como se usa en el presente 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 aniónicos, los polímeros que tienen más cargas positivas que cargas negativas en el medio acuoso se consideran catiónicos, y los polímeros que tienen cantidades sustancialmente iguales de cargas positivas y cargas negativas en el medio acuoso se consideran neutros.

20 La unidad 2 de copolímero de bloque puede formarse, por ejemplo, acoplado un polímero que tiene una cadena polimérica hidrófila y un polímero que tiene una cadena de poliaminoácido de una manera conocida, opcionalmente tras purificar los polímeros, si es necesario, para limitar la distribución de peso molecular. La unidad 2 de copolímero de bloque según la fórmula (I) también puede formarse, por ejemplo, mediante las etapas de: realizar polimerización viva de aniones usando un iniciador que puede añadir R<sup>1</sup> para formar una cadena de polietilenglicol; introducir un grupo amino al extremo en crecimiento; y polimerizar, en el extremo amino, un N-carboxianhídrido (NCA) de un aminoácido protegido, tal como Nε-Z-L-lisina, β-L-aspartato de bencilo o γ-L-glutamato de bencilo.

30 La composición de portador puede formarse, por ejemplo, de la siguiente manera. En primer lugar, se disuelve o dispersa completamente una unidad de copolímero de bloque y un lípido cargado, opcionalmente junto con un lípido neutro, en una disolución de formación que contiene un disolvente orgánico, tras lo cual se elimina el disolvente orgánico mediante evaporación. Los ejemplos de disolventes orgánicos incluyen acetona, diclorometano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, tetrahidrofurano y metanol. La disolución de formación puede contener dos o más disolventes orgánicos, y también puede contener una pequeña cantidad de agua. Se combina el sólido o la pasta resultante con agua o una disolución acuosa que contiene un aditivo tal como una sal o estabilizador apropiado, seguido por agitación para dispersar la unidad de copolímero de bloque y el/los lípido(s). Se dispersa/pulveriza adicionalmente el producto resultante por medio, por ejemplo, de irradiación por ultrasonidos, emulsificación a alta presión o prensa extrusora para formar de ese modo la composición de portador.

40 El fármaco 4 se retiene en la composición 1 farmacéutica por medio de unión electrostática con el lípido 3 cargado. Por tanto, la unión entre el lípido 3 cargado y el fármaco 4 es reversible, y no implica ningún cambio estructural químico. El fármaco 4 puede introducirse en la composición de portador o bien añadiendo el fármaco 4 a la disolución de formación en la producción de la composición de portador, o bien añadiendo la composición de portador a una disolución del fármaco 4.

Los ejemplos del fármaco 4 incluyen: compuestos aniónicos, 5 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 más cargas positivas que cargas negativas en el medio acuoso. Los compuestos deben ser preferiblemente compuestos macromoleculares.

45 El fármaco 4 debe ser preferiblemente una biomacromolécula. La biomacromolécula en el presente documento significa una macromolécula de origen biológico o un análogo estructural de la misma, y más específicamente, debe ser preferiblemente al menos una seleccionada de una proteína y un ácido nucleico. No hay limitaciones en cuanto a las alternativas y los tamaños de proteínas y ácidos nucleicos, y las proteínas incluyen péptidos. Una biomacromolécula de este tipo es al menos parcialmente hidrófila; especialmente, los ácidos nucleicos muestran una hidrofilia muy alta.

50 Por consiguiente, aunque se prepare un material compuesto de una biomacromolécula (por ejemplo, un ácido nucleico) y un lípido con carga opuesta a la biomacromolécula, y se intente introducir el material compuesto en una partícula de micela polimérica convencional que no contiene un lípido cargado, sería difícil transferir el material



compuesto al interior de la partícula de micela polimérica por medio de interacción hidrófoba. Esto es así porque la biomacromolécula que tiene una parte polar rodeará al lípido cargado y hará que la superficie del material compuesto se vuelva casi hidrófila (es decir, mucho menos hidrófoba que al menos la de la parte hidrófoba del copolímero de bloque que existe cerca de la superficie de micela polimérica).

- 5 Con el fin de evitar que el fármaco 4 o bien se desprenda de la composición 1 farmacéutica en la sangre demasiado pronto o bien se encapsule en la composición 1 farmacéutica durante demasiado tiempo, la razón de carga entre el lípido 3 cargado y el fármaco 4 en la composición 1 farmacéutica debe controlarse preferiblemente para que esté dentro de un intervalo particular. Cuando el fármaco 4 es, por ejemplo, un ácido nucleico, la razón de carga puede definirse como [la concentración en mol de grupos catiónicos del lípido cargado contenido en la composición farmacéutica]/[la concentración en mol de grupos fosfóricos en el ácido nucleico]. Por otro lado, cuando el fármaco 4 es un compuesto que tiene grupos tanto aniónicos como catiónicos, por ejemplo, una proteína, la razón de carga puede definirse como [la concentración en mol de grupos catiónicos del lípido cargado contenido en la composición farmacéutica]/([la concentración en mol de grupos en el fármaco que tienen carga opuesta al lípido cargado] - [la concentración en mol de grupos en el fármaco que tienen carga similar al lípido cargado]). La razón de carga debe ser preferiblemente de 0,5 o superior, más preferiblemente uno o superior, todavía más preferiblemente 2 o superior, y preferiblemente 50 o inferior, más preferiblemente 20 o inferior, todavía más preferiblemente 10 o inferior.

Los tamaños de partícula promedio de la composición de portador y la composición 1 farmacéutica deben ser preferiblemente de 10 nm o mayor, más preferiblemente 30 nm o mayor, y preferiblemente 300 nm o menor, más preferiblemente 200 nm o menor.

## 20 Ejemplos

La presente invención se explicará con más detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos.

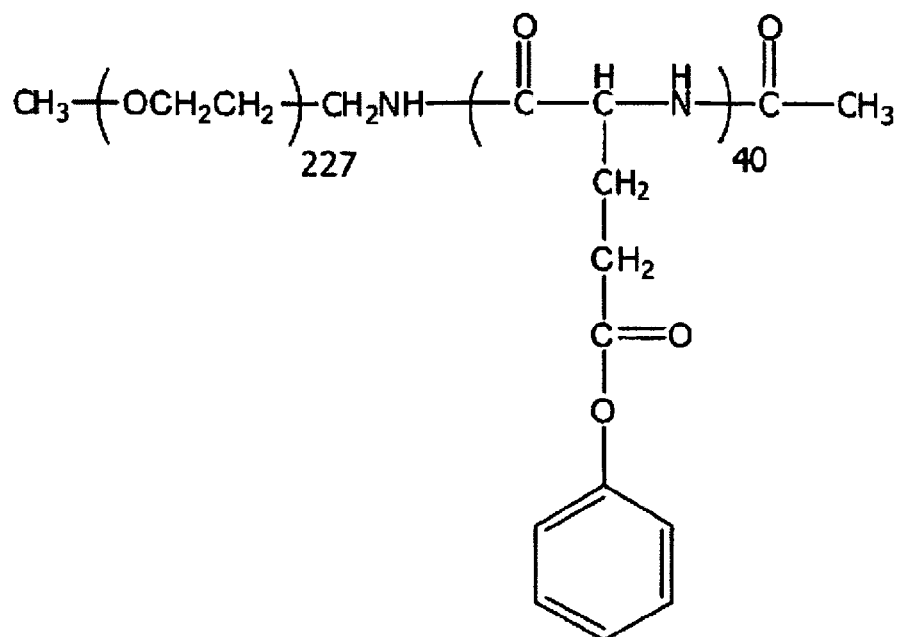
### I. Preparación de composiciones farmacéuticas particuladas:

Se prepararon composiciones farmacéuticas particuladas según el siguiente procedimiento, y se sometieron a las mediciones explicadas a continuación.

#### 25 I-1. Preparación de composiciones de portador particuladas:

##### I-1-1. Preparación de composición de portador particulada A (con PEG-PBLG):

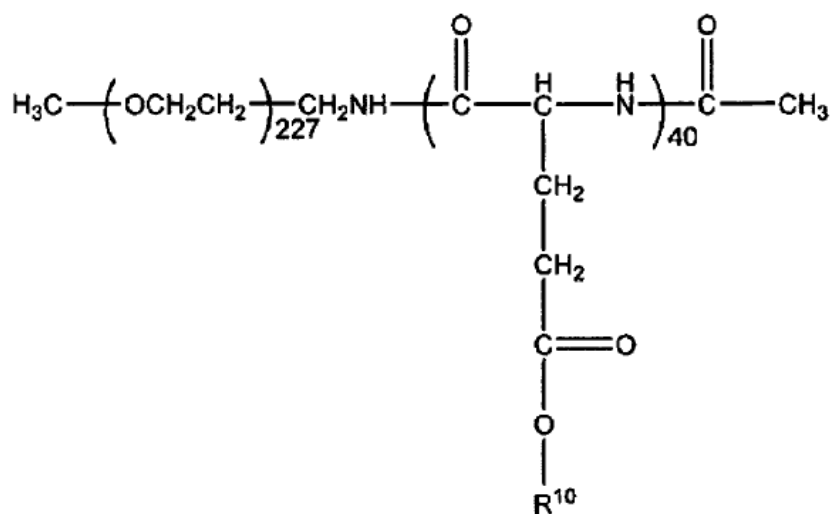
- Se disolvieron cinco gramos de co-metoxi-co-amino-polietilenglicol (también denominado a continuación en el presente documento "PEG") que tiene un peso molecular promedio en peso (Mw) de 10000 (fabricado por NOF Corp.) en 50 ml de dimetilsulfóxido, que se hizo reaccionar con 5,5 g (42 partes con respecto a polietilenglicol) de N-carboxianhídrido (NCA) de  $\gamma$ -L-glutamato de bencilo (también denominado a continuación en el presente documento "PBLG") a 40°C durante 24 horas. Se vertió la disolución de reacción en 1 l de un disolvente de mezcla de hexano y acetato de etilo (razón en volumen de 1:1) para provocar la precipitación de un polímero, que se recuperó mediante filtración a presión reducida y después se secó para proporcionar 8,6 g de un producto sólido. Se disolvió este producto en 86 ml de DMF, con lo que se mezclaron 432  $\mu$ l de anhídrido acético y se hicieron reaccionar a 40°C durante 24 horas. Se vertió gota a gota la disolución de reacción en 1 l de un disolvente de mezcla de hexano y acetato de etilo (razón en volumen de 1:1) para provocar la precipitación de un polímero, que se recuperó mediante filtración a presión reducida y después se secó adicionalmente para proporcionar 8,1 g de copolímero de bloque de polietilenglicol-poli( $\gamma$ -L-glutamato de bencilo)-Ac (también denominado a continuación en el presente documento "PEG-PBLG"), que es un polímero neutro. A continuación se muestra la fórmula estructural de PEG-PBLG. Un análisis de  $^1\text{H}$ -RMN reveló que el grado de polimerización del bloque de PBLG era de 40.



Se mezcló el PEG-PBLG(10-40) resultante (unidad de copolímero de bloque) con DOTAP (lípidio catiónico) y DOPE (lípidio neutro) a las razones de 2,5/1/1 en peso en cloroformo, y se secó a presión reducida hasta que se obtuvo un sólido. Se combinó esta mezcla con tampón HEPES 10 mM (pH 7,4), se agitó a 4°C durante la noche, se pulverizó mediante irradiación por ultrasonidos y se hizo pasar a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para así proporcionar una disolución de micela lipídica que contenía PEG-PBLG (también denominada a continuación en el presente documento "composición de portador particulada A").

#### I-1-2. Preparación de composición de portador particulada B (con PEG-pGlu(Bn)):

Se trató PEG-PBLG con álcali para desproteger los grupos bencilo de las cadenas laterales del ácido glutámico, mediante lo cual se obtuvo copolímero de bloque de polietilenglicol/poli(ácido L-glutámico) (también denominado a continuación en el presente documento "PEG-pGlu"). Se modificaron parcialmente las cadenas laterales del ácido glutámico de PEG-pGlu con grupos bencilo ( $\text{PhCH}_2$ ) mediante reacción de condensación usando alcohol bencílico para proporcionar de ese modo copolímero de bloque de polietilenglicol/poli(ácido L-glutámico) con introducción de bencilo (también denominado a continuación en el presente documento "PEG-pGlu(Bn)"), que es un polímero aniónico. Un análisis de  $^1\text{H-RMN}$  reveló que el número de grupos bencilo introducidos era de 35 por polímero. A continuación se muestra la fórmula estructural de PEG-pGlu(Bn).



$\text{R}^{10}$ : H (5 unidades),  $\text{PhCH}_2$  (35 unidades)

Se mezcló un mililitro de una disolución en acetona (50 mg/ml) del PEG-pGlu(Bn) resultante (unidad de copolímero de bloque) con 0,5 ml de una disolución en metanol (40 mg/ml) de DOTAP (lípidio cargado catiónico) y 0,5 ml de una disolución en metanol (40 mg/ml) de DOPE (lípidio neutro), y se secó a presión reducida hasta que se obtuvo un sólido. Se combinó la mezcla resultante con 2,5 ml de tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 7,4), se agitó durante tres horas a temperatura ambiente, se pulverizó mediante irradiación por ultrasonidos (130 W, pulso de 1 segundo, 10 minutos), y se hizo pasar a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore) para proporcionar de ese modo una disolución de micela lipídica que contenía PEG-pGlu(Bn) (también denominada a continuación en el presente documento "composición de portador particulada B").

I-2. Preparación de composiciones farmacéuticas mediante operación de congelación:

I-2-1. Preparación de composiciones farmacéuticas usando operación de congelación y descongelación:

Se disolvió ARNip en tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) para preparar una disolución de ARNip 40  $\mu\text{M}$ , que se mezcló con la disolución de micela lipídica que contenía PEG-PBLG como unidad de copolímero de bloque (composición de portador particulada A), tampón HEPES 10 mM y disolución de sacarosa al 50% para preparar una disolución de micela lipídica que contenía, como fármaco, ARNip mostrada en cada ejemplo (también denominada a continuación en el presente documento "composición farmacéutica particulada A"). Se ajustaron las concentraciones de ARNip y sacarosa en la disolución de composición farmacéutica particulada hasta 10  $\mu\text{M}$  y el 10%, respectivamente. También se ajustó la razón de mezcla entre el lípidio catiónico (DOTAP) y el ARNip para que la razón de carga (+/-) de la concentración de cargas positivas (grupo catiónico) del lípidio catiónico (DOTAP) con respecto a la concentración de cargas negativas (grupo fosfórico) de ARNip fuera de 8.

En cada uno de los ejemplos descritos en la presente descripción, se seleccionó ARNip de los explicados a continuación, todos los cuales están disponibles de Nippon EGT Co., Ltd.

\*ARNip(Luc): Diseñado para seleccionar como diana el gen de luciferasa de luciérnaga, este ARNip está compuesto por una cadena sentido de 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (SEQ ID NO: 1) y una cadena antisentido de 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (SEQ ID NO: 2), en forma bicatenaria de una manera convencional.

\*ARNip(Plk1): Diseñado para seleccionar como diana el gen de Plk1 (cinasa de tipo polo 1) humano, este ARNip está compuesto por una cadena sentido de 5'-CCAUAACGAGCUGCUUAAAdTdT-3' (SEQ ID NO: 3) y una cadena antisentido de 5'-UUAAGCAGCUCGUUAAUGGdTdT-3' (SEQ ID NO: 4), en forma bicatenaria de una manera convencional. El gen de Plk1 es una cinasa que desempeña un papel en la fase M de división celular. ARNip(Plk1) induce apoptosis cuando se introduce en la célula.

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

Se sometió la disolución resultante de micela lipídica con ARNip encapsulado (composición farmacéutica particulada A) a las mediciones explicadas a continuación, o bien sin ningún otro tratamiento o bien tras recibir una operación de congelación y descongelación una vez, dos veces o tres veces. Cada operación de congelación y descongelación se llevó a cabo congelando la composición a -80°C durante 12 horas, y descongelándola a temperatura ambiente durante una hora.

A continuación en el presente documento, la composición farmacéutica particulada A sin tratar también se denomina "la composición farmacéutica del ejemplo de referencia 1", la composición farmacéutica particulada A que recibió la operación de congelación y descongelación una vez también se denomina "la composición farmacéutica del ejemplo 1", la composición farmacéutica particulada A que recibió la operación de congelación y descongelación dos veces también se denomina "la composición farmacéutica del ejemplo 2", y la composición farmacéutica particulada A que recibió la operación de congelación y descongelación tres veces también se denomina "la composición farmacéutica del ejemplo 3". Además, cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 1 y de los ejemplos 1 a 3, así como las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 2 y el ejemplo 4 explicados a continuación, también se denominan simplemente "muestra" sin distinción.

En cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 1 y los ejemplos 1 a 3, el lípidio cargado (DOTAP) retiene el fármaco (ARNip) en la partícula mediante unión electrostática al tiempo que se atrae al segmento de cadena polimérica hidrófobo, mediante lo cual se evita que la superficie de partícula exterior porte una carga que pueda atraer una sustancia con carga opuesta al lípidio cargado. Además, en cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 1 y los ejemplos 1 a 3, se cree que el segmento de cadena polimérica hidrófobo derivado de una cadena de poliaminoácido (PBLG) forma la hélice  $\alpha$ , alrededor de la cual se dispersa el lípidio cargado (DOTAP). Además, en cada una de las composiciones farmacéuticas de los ejemplos 1 a 3, el fármaco se coloca en el interior del segmento de cadena polimérica hidrófobo.

## I-2-2. Preparación de la composición farmacéutica usando una operación de secado por congelación:

A una disolución acuosa de ARNip 100  $\mu\text{M}$ , se le mezclaron una disolución de micela lipídica que contenía PEG-pGlu(Bn) como unidad de copolímero de bloque (composición de portador particulada B) y sacarosa, y se dejó reposar a 4°C durante dos horas para preparar una disolución de micela lipídica que contenía, como fármaco, ARNip mostrado en cada ejemplo (también denominada a continuación en el presente documento "composición farmacéutica particulada B"). Se ajustaron las concentraciones de ARNip y sacarosa en la disolución de composición farmacéutica particulada a 20  $\mu\text{m}$  y al 10%, respectivamente. También se ajustó la razón de mezcla entre el lípido catiónico (DOTAP) y el ARNip para que la razón de carga (+/-) de la concentración de cargas positivas (grupo catiónico) del lípido catiónico (DOTAP) con respecto a la concentración de cargas negativas (grupo fosfórico) de ARNip fuera de 8.

Se sometió la disolución resultante de micela lipídica con ARNip encapsulado (composición farmacéutica particulada B) a las mediciones explicadas a continuación, o bien sin ningún otro tratamiento o bien tras recibir una operación de secado por congelación de una manera convencional para formar una disolución madre, y después disolverse de nuevo en agua. La operación de secado por congelación se llevó a cabo usando un instrumento Triomaster II A-04 (fabricado por NISSEI Ltd.).

A continuación en el presente documento, la composición farmacéutica particulada B sin tratar también se denomina "composición farmacéutica del ejemplo de referencia 2", y la composición farmacéutica particulada B que recibió la operación de secado por congelación también se denomina "composición farmacéutica del ejemplo 4".

En cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 2 y el ejemplo 4, el lípido cargado (DOTAP) retiene el fármaco (ARNip) en la partícula mediante unión electrostática al tiempo que se atrae al segmento de cadena polimérica hidrófobo, mediante lo cual se evita que la superficie exterior de la composición particulada recoja una sustancia cargada, que tiene una carga opuesta al lípido cargado, como consecuencia de una menor carga eléctrica. Además, en cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 2 y el ejemplo 4, se cree que el segmento de cadena polimérica hidrófobo derivado de una cadena de poliaminoácido (pGlu(Bn)) forma la hélice oc, alrededor de la cual se dispersa el lípido cargado (DOTAP). Además, en la composición farmacéutica del ejemplo 4, el fármaco se coloca radialmente en el interior del segmento de cadena polimérica hidrófobo.

## II. Mediciones de composiciones farmacéuticas particuladas:

## II-1. Medición de dispersión de la luz:

Esta medición se llevó a cabo usando, como muestra, cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 1 (sin tratar), ejemplo 1 (congelación y descongelación una vez), ejemplo 2 (congelación y descongelación dos veces) y ejemplo 3 (congelación y descongelación tres veces), que se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en "I. Preparación de composiciones farmacéuticas particuladas" usando ARNip(Luc) como ARNip y PEG-PBLG (polímero neutro) como unidad de copolímero de bloque, así como el ejemplo de referencia 2 (sin tratar) y ejemplo 4 (secado por congelación), que se prepararon del mismo modo pero usando PEG-pGlu(Bn) (polímero catiónico) como unidad de copolímero de bloque.

Se diluyó cada muestra con tampón HEPES 10 mM para que la concentración de ARNip fuera de 1  $\mu\text{M}$ . Se midieron las micelas en cada muestra para determinar el tamaño de partícula, la intensidad de dispersión y el valor absoluto del potencial zeta con el analizador de dispersión de la luz (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments).

En la tabla 1 se muestran los resultados de medición para el tamaño de partícula y el potencial zeta.

La comparación de las composiciones farmacéuticas de los ejemplos 1 a 3 con la composición farmacéutica del ejemplo de referencia 1, cada una de las cuales se preparó usando PEG-PBLG (polímero neutro) como unidad de copolímero de bloque, muestra que en cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo 1 (congelación y descongelación una vez), ejemplo 2 (congelación y descongelación dos veces) y ejemplo 3 (congelación y descongelación tres veces), no hubo cambios significativos en el tamaño de partícula y la intensidad de dispersión de las micelas, pero hubo un aumento en el valor absoluto del potencial zeta, en comparación con la composición farmacéutica del ejemplo de referencia 1 (sin tratar). Teniendo en cuenta el hecho de que el tamaño de partícula y la intensidad de dispersión no cambiaron sustancialmente, se cree que el aumento en el potencial zeta se debe a un aumento relativo en la carga positiva en la superficie de la micela provocado por la transferencia de ARNip a la parte interna de la micela, no se debe a la disociación del lípido con respecto a la micela.

TABLA 1

Composición farmacéutica	Tamaño de partícula (nm)	Valor absoluto de potencial zeta (mV)
Ejemplo de referencia 1 (PEG-PBLG, sin tratar)	116	6,85
Ejemplo 1 (PEG-PBLG, congelación / descongelación x 1)	120	9,00
Ejemplo 2 (PEG-PBLG, congelación / descongelación x 2)	122	11,10
Ejemplo 3 (PEG-PBLG, congelación / descongelación x 3)	122	11,10
Ejemplo de referencia 2 (PEG-pGlu(Bn), sin tratar)	147	0,455
Ejemplo 4 (PEG-pGlu(Bn), secado por congelación)	190	0,421

## II-2. Medición de la tasa de encapsulación:

5 Esta medición se llevó a cabo usando, como muestra, cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 1 (sin tratar), ejemplo 1 (congelación y descongelación una vez), ejemplo 2 (congelación y descongelación dos veces) y ejemplo 3 (congelación y descongelación tres veces), que se prepararon según el procedimiento descrito en "I. Preparación de composiciones farmacéuticas particuladas" usando ARNip(Luc) como ARNip y PEG-PBLG (polímero neutro) como unidad de copolímero de bloque, así como el ejemplo de referencia 2 (sin tratar) y ejemplo 4 (secado por congelación), que se prepararon del mismo modo pero usando PEG-pGlu(Bn) (polímero catiónico) como unidad de copolímero de bloque.

## 10 II-2-1. Preparación de la curva de calibración:

Se preparó una serie de disoluciones de referencia diluidas, cada una de las cuales tiene un volumen de 50  $\mu$ l, diluyendo una disolución de ARNip 40  $\mu$ M con tampón HEPES 10 mM en serie en un tercio (dando como resultado 11 disoluciones de referencia que oscilaban entre 40  $\mu$ M y 68 nM). Se midió cada disolución de referencia de 50  $\mu$ l de la serie resultante para determinar la intensidad de fluorescencia para preparar una curva de calibración según el siguiente procedimiento. Se mezclaron 50  $\mu$ l de cada disolución de referencia con 750  $\mu$ l de tampón HEPES 10 mM y 200  $\mu$ l de disolución acuosa de TRITONX-100 al 1%. Se pusieron 100  $\mu$ l de la disolución de mezcla resultante en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (negra). Tras añadir 100  $\mu$ l de disolución de PicoGreen™ (diluida en 1/200 con tampón HEPES 10 mM) a cada pocillo seguido por mezclado, se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente en ausencia de luz durante cinco minutos, y se midió para determinar la intensidad de fluorescencia usando un lector de placas para trazar una curva de calibración. Dado que la curva de calibración resultante era lineal dentro del intervalo de concentración de ARNip de desde 1,48  $\mu$ M hasta 2 nM, las muestras se midieron dentro de este intervalo.

## II-2-2. Medición de muestras:

25 Se diluyó (normalizó) cada muestra con tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) para que la concentración de ARNip fuera de 1  $\mu$ M. Se sometieron 500  $\mu$ l de la disolución a ultracentrifugación (100.000xg, 4°C, una hora) para sedimentar las micelas, y se recogieron 50  $\mu$ l del sobrenadante en reposo. Se midió el sobrenadante recogido para determinar la intensidad de fluorescencia según el procedimiento explicado en "II-2-1. Preparación de la curva de calibración", y se cotejó la intensidad de fluorescencia obtenida con la curva de calibración para determinar la concentración normalizada de ARNip no encapsulado, que es la concentración de ARNip en el sobrenadante derivado de cada muestra. Se determinó la tasa de encapsulación de ARNip de las micelas en cada muestra según la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de encapsulación de ARNip (\%)} = (1 - x) \times 100$$

donde x significa la concentración normalizada de ARNip no encapsulado ( $\mu$ M).

## II-2-3. Resultados:

35 En la tabla 2 se muestran las tasas de encapsulación de ARNip resultantes. En cada una de las composiciones farmacéuticas de los ejemplos de referencia 1 y 2 y ejemplos 1 a 4, el sobrenadante tras la ultracentrifugación contenía muy poco ARNip, y casi la totalidad del ARNip estaba incluido en las micelas. 5

TABLA 2

Composición farmacéutica	Tasa de encapsulación (%)
Ejemplo de referencia 1 (PEG-PBLG, sin tratar)	99,1
Ejemplo 1 (PEG-PBLG, congelación / descongelación x 1)	99,5
Ejemplo 2 (PEG-PBLG, congelación / descongelación x 2)	99,5
Ejemplo 3 (PEG-PBLG, congelación / descongelación x 3)	99,4
Ejemplo de referencia 2 (PEG-pGlu(Bn), sin tratar)	96,6
Ejemplo 4 (PEG-pGlu(Bn), secado por congelación)	98,3

### II-3. Evaluación de la estabilidad de encapsulación:

5 Esta medición se llevó a cabo usando, como muestra, cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 1 (sin tratar) y ejemplo 3 (congelación y descongelación tres veces), que se prepararon según el procedimiento descrito en "I. Preparación de composiciones farmacéuticas particuladas" usando ARNip(Luc) como ARNip y PEG-PBLG (polímero neutro) como unidad de copolímero de bloque, así como el ejemplo de referencia 2 (sin tratar) y ejemplo 4 (secado por congelación), que se prepararon del mismo modo pero usando PEG-pGlu(Bn) (polímero catiónico) como unidad de copolímero de bloque.

10 Se añadió sulfato de dextrano, un compuesto macromolecular aniónico, a cada muestra, y se midió la razón del ARNip sustituido por sulfato de dextrano y liberado de las micelas (tasa de liberación de ARNip) para evaluar la estabilidad de encapsulación de cada muestra. Más específicamente, la evaluación se llevó a cabo de la siguiente manera. Se mezcló cada muestra con un exceso de sulfato de dextrano (cuya razón de carga con respecto a ARNip es de 80), y se diluyó con tampón HEPES 10 mM (pH 7,4) para que la concentración de ARNip fuera de 1  $\mu\text{M}$  (es decir, normalizado). Se sometieron 500 l de la disolución obtenida a ultracentrifugación (100.000xg, 4°C, una hora) para sedimentar las micelas, y se recogieron 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante en reposo. Se midió el sobrenadante recogido para determinar la intensidad de fluorescencia según el procedimiento explicado en "II-2-1. Preparación de la curva de calibración", y se cotejó la intensidad de fluorescencia obtenida con la curva de calibración obtenida en "II-2-2. Medición de muestras" para determinar la concentración normalizada de ARNip no encapsulado en el sobrenadante derivado de cada muestra, lo cual indica la cantidad del ARNip liberado de las micelas en cada muestra. Se determinó la tasa de liberación de ARNip (la razón de la cantidad de ARNip sustituido por sulfato de dextrano y liberado de las micelas con respecto a la cantidad de ARNip originalmente incluida en la micela) según la siguiente ecuación:

$$\text{tasa de liberación de ARNip (\%)} = \frac{(y-x)}{1} \times 100$$

25 donde x significa la concentración normalizada de ARNip no encapsulado ( $\mu\text{M}$ ); e y significa la cantidad de ARNip liberado de las micelas ( $\mu\text{M}$ ).

30 En la figura 3 se muestran los resultados. La comparación de las composiciones farmacéuticas del ejemplo 3 y ejemplo de referencia 1, ambas de las cuales se prepararon usando PEG-PBLG (polímero neutro) como unidad de copolímero de bloque, muestra que la composición farmacéutica del ejemplo 3, que se obtuvo mediante operación de congelación, tenía una tasa de liberación de ARNip reducida, que es aproximadamente la mitad de la de la composición farmacéutica del ejemplo de referencia 1, que no recibió ninguna operación de congelación. La comparación de las composiciones farmacéuticas del ejemplo 4 y ejemplo de referencia 2, ambas de las cuales se prepararon usando PEG-Glu(Bn) (polímero catiónico) como unidad de copolímero de bloque, también muestra que la composición farmacéutica del ejemplo 4, que se obtuvo mediante operación de congelación, tenía una tasa de liberación de ARNip reducida que es aproximadamente del 30% de la de la composición farmacéutica del ejemplo de referencia 2.

### II-4. Evaluación de la tasa restante en la sangre:

40 Esta medición se llevó a cabo usando, como muestra, 10 cada una de las composiciones farmacéuticas del ejemplo de referencia 1 (sin tratar) y ejemplo 3 (congelación y descongelación tres veces), que se prepararon según el procedimiento descrito en "I. Preparación de composiciones farmacéuticas particuladas" usando F-ARNip(Luc) como ARNip y PEG-PBLG (polímero neutro) como unidad de copolímero de bloque, así como el ejemplo de referencia 2 (sin tratar) y ejemplo 4 (secado por congelación), que se prepararon del mismo modo pero usando PEG-pGlu(Bn) (polímero catiónico) como unidad de copolímero de bloque.

45 Se administró cada muestra a ratones Balb/c (obtenidos de Charles River Laboratories Japan, Inc.) a través de la vena de la cola, y se extrajeron 200  $\mu\text{l}$  de sangre a través de la vena cava inferior una hora después. Se determinó la dosificación de cada muestra para cada ratón para que la razón de F-ARNip con respecto al peso del ratón fuera de 1 mg/kg. Se centrifugó la sangre extraída con 2000xg a 4°C durante 10 minutos, y se recogieron 80  $\mu\text{l}$  de plasma del

sobrenadante. Se midió el plasma para determinar la intensidad de fluorescencia usando 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-ARNip que circula en la sangre, como indicador de la tasa restante en la sangre.

- 5 En la figura 4 se muestran los resultados. La comparación de las composiciones farmacéuticas del ejemplo 3 y ejemplo de referencia 1, ambas de las cuales se prepararon usando PEG-PBLG (polímero neutro) como unidad de copolímero de bloque, muestra que la composición farmacéutica del ejemplo 3, que se obtuvo mediante una operación de congelación, dio como resultado más F-ARNip restante en la sangre, es decir, tasa restante en la sangre superior. La comparación de las composiciones farmacéuticas del ejemplo 4 y ejemplo de referencia 2, ambas de las cuales se prepararon usando PEG-pGlu(Bn) (polímero catiónico) como unidad de copolímero de bloque, también muestra que la composición farmacéutica del ejemplo 4, que se obtuvo mediante una operación de congelación, dio como resultado más F-ARNip restante en la sangre, tasa restante en la sangre superior.

**Lista de secuencias**

- <110> NanoCarrier CO., Ltd.
- 15 <120> COMPOSICIÓN PARTICULADA Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE LA MISMA
- <130> P113842EP-PCTDIV1
- <150> Documento JP\_2010-029486
- <151> 12-02-2010
- <160> 4
- 20 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> una cadena sentido de un ARNip bicatenario diseñado para seleccionar como diana el gen de luciferasa de luciérnaga
- <220>
- <221> misc\_feature
- 30 <222> (20)..(20)
- <223> n representa desoxitimidina
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (21)..(21)
- 35 <223> n representa desoxitimidina
- <400> 1
- cuuacgcuga guacuucgan n 21

- <210> 2
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Artificial
- 5 <220>
- <223> una cadena antisentido de un ARNip bicatenario diseñado para seleccionar como diana el gen de luciferasa de luciérnaga
- <220>
- <221> misc\_feature
- 10 <222> (20)..(20)
- <223> n representa desoxitimidina
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (21)..(21)
- 15 <223> n representa desoxitimidina
- <400> 2
- ucgaaguacu cagcguaagn n 21
- <210> 3
- <211> 21
- 20 <212> ARN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> una cadena sentido de un ARNip bicatenario diseñado para seleccionar como diana el gen de cinasa de tipo polo 1 humano
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (20)..(20)
- <223> n representa desoxitimidina
- <220>
- 30 <221> misc\_feature
- <222> (21)..(21)
- <223> n representa desoxitimidina



<400> 3

ccaauaacga gcugcuuaan n 21

<210> 4

<211> 21

5 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> una cadena antisentido de un ARNip bicatenario diseñado para seleccionar como diana el gen de cinasa de tipo polo 1 humano

10 <220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(20)

<223> n representa desoxitimidina

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (21)..(21)

<223> n representa desoxitimidina

<400> 4

uuaagcagcu cguuaauggn n 21

20

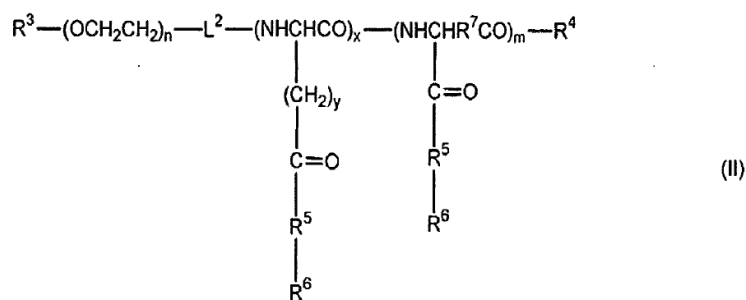
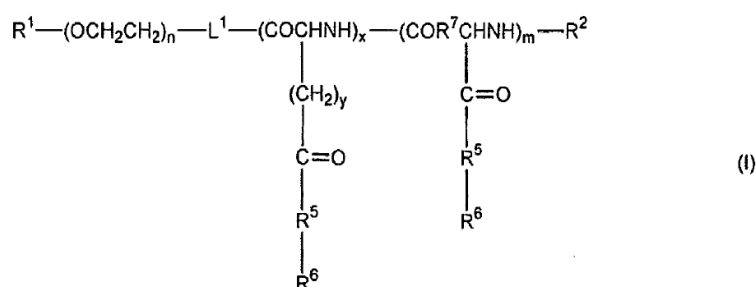
REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica particulada que comprende:

un fármaco que incluye al menos una biomacromolécula seleccionada del grupo que consiste en una proteína y un ácido nucleico; y

5 una composición de portador que comprende una unidad de copolímero de bloque que tiene un segmento de cadena polimérica hidrófobo y un segmento de cadena polimérica hidrófilo soluble en agua, y un lípido cargado que porta una carga opuesta a la carga del fármaco,

en la que la unidad de copolímero de bloque es un compuesto representado por la fórmula (I) o la fórmula (II):



10 en las que

R<sup>1</sup> y R<sup>3</sup>, independientemente uno de otro, son o bien un átomo de hidrógeno o bien un grupo representado por R<sup>8</sup>(R<sup>9</sup>)CH(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>, en el que R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup>: i) independientemente uno de otro, son un átomo de hidrógeno, grupo alcoxilo C<sub>1-6</sub>, grupo ariloxilo, grupo aril-C<sub>1-3</sub>-oxilo, grupo ciano, grupo carboxilo, grupo amino, grupo alcóxicarbonilo C<sub>1-6</sub>, grupo acilamida C<sub>2-7</sub>, grupo tri-(alquil C<sub>1-6</sub>)-siloxilo, grupo siloxilo, o grupo sililamino, ii) juntos entre sí, forman un grupo etilendioxilo o grupo propilendioxilo, que están o bien no sustituidos o bien sustituidos con grupo alquilo C<sub>1-3</sub>, o iii) junto con un grupo CH al que están unidos, forman un grupo formilo,

15

q es un número entero de desde 0 hasta 10,

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

R<sup>4</sup> es un grupo hidroxilo, grupo oxilo alifático C<sub>1-C<sub>30</sub></sub> saturado o insaturado, o grupo aril-(alquil inferior)-oxilo,

20 R<sup>5</sup> es -O- o -NH-,

R<sup>6</sup> es un átomo de hidrógeno, grupo fenilo, grupo bencilo, grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-fenilo, grupo alquilo C<sub>4-C<sub>15</sub></sub> que está o bien no sustituido o bien sustituido con grupo amino o grupo carbonilo, o residuo derivado de esterol,

R<sup>7</sup> es un grupo metileno,

n es un número entero de desde 55 hasta 4.600,

25 x es un número entero de desde 10 hasta 200,

m es un número entero de desde 0 hasta 200, en el que cuando m es uno o más, las unidades (COCHNH) y la(s) unidad(es) (COR<sup>7</sup>CHNH) se disponen en cualquier orden, y cuando m es dos o más, R<sup>6</sup> se selecciona para cada unidad de aminoácido independientemente unos de otros y se disponen en el copolímero de bloque en un orden aleatorio, siempre que los átomos de hidrógeno no representen el 75% o más de R<sup>6</sup>,

5 y es 1 ó 2,

L<sup>1</sup> es un grupo de unión seleccionado de -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, -CH<sub>2</sub>- y -O-Z-S-Z-NH-, en los que Z, independientemente uno de otro, significa grupo alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y

L<sup>2</sup> es un grupo de unión seleccionado de -OCO-Z-CO- y -NHCO-Z-CO-, en los que Z es un grupo alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y

10 en la que una pluralidad de las unidades de copolímero de bloque se disponen radialmente con los segmentos de cadena polimérica hidrófobos radialmente en el interior y los segmentos de cadena polimérica hidrófilos radialmente en el exterior; atrayéndose el lípido cargado al segmento de cadena polimérica hidrófobo; y el fármaco está colocado radialmente en el interior de los segmentos de cadena polimérica hidrófobos, mediante lo cual se evita que el fármaco se desprenda de la partícula.

15 2. Composición farmacéutica particulada según la reivindicación 1, en la que parte o la totalidad del segmento de cadena polimérica hidrófobo forma una hélice  $\alpha$ .

3. Composición farmacéutica particulada según la reivindicación 2, en la que el lípido cargado está dispersado alrededor de la hélice  $\alpha$ .

4. Composición farmacéutica particulada según cualquier reivindicación anterior, producida llevando a cabo una operación de congelación con un precursor de composición farmacéutica.

20 5. Composición farmacéutica particulada según cualquier reivindicación anterior, en la que el lípido cargado es un lípido catiónico.

6. Composición farmacéutica particulada según cualquier reivindicación anterior, en la que el fármaco es una biomacromolécula, preferiblemente un ácido nucleico.

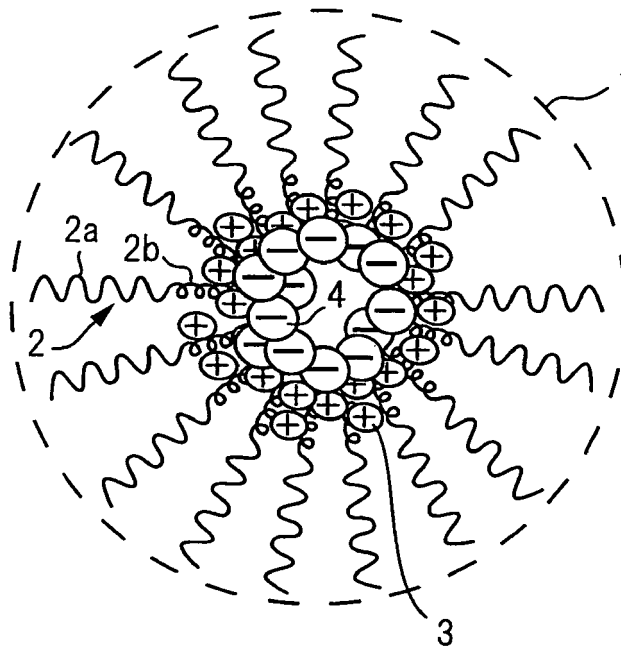
25 7. Composición farmacéutica particulada según cualquier reivindicación anterior, en la que el lípido cargado incluye al menos un lípido cargado dispuesto con su carga radialmente en el interior de los segmentos de cadena polimérica hidrófobos.

8. Composición farmacéutica particulada según cualquier reivindicación anterior, en la que el valor absoluto del potencial zeta de la composición farmacéutica es superior al de una partícula que contiene fármaco que tiene la misma constitución que la composición farmacéutica pero se produce sin operación de congelación.

30 9. Composición farmacéutica particulada según la reivindicación 3, en la que una parte o la totalidad del segmento de cadena polimérica hidrófobo forma una hélice  $\alpha$  y el lípido cargado está dispersado alrededor de la hélice  $\alpha$ , mediante lo cual el lípido cargado incluye al menos un lípido cargado dispuesto con su carga radialmente en el exterior y al menos un lípido cargado dispuesto con su carga radialmente en el interior.

Fig. 1

(a)



(b)

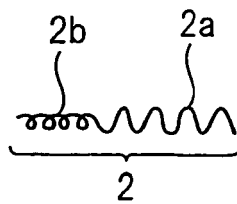


Fig.2

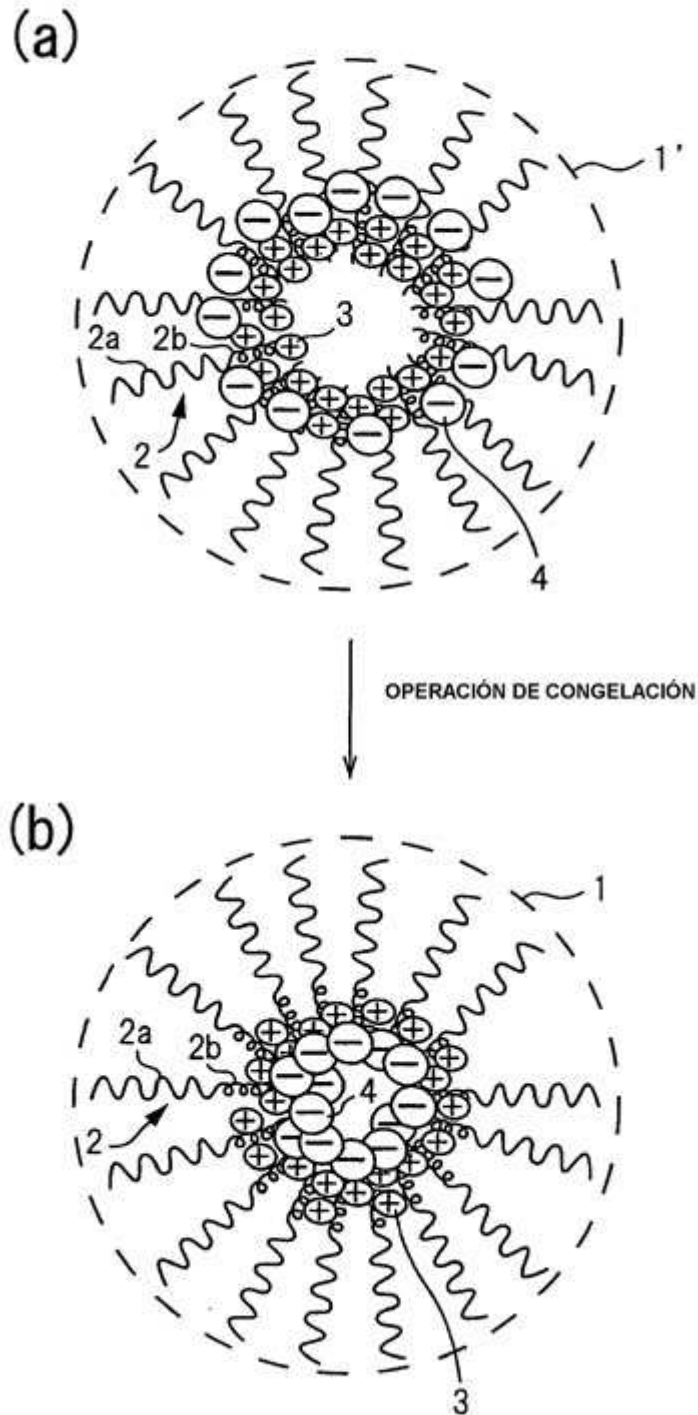


Fig.3

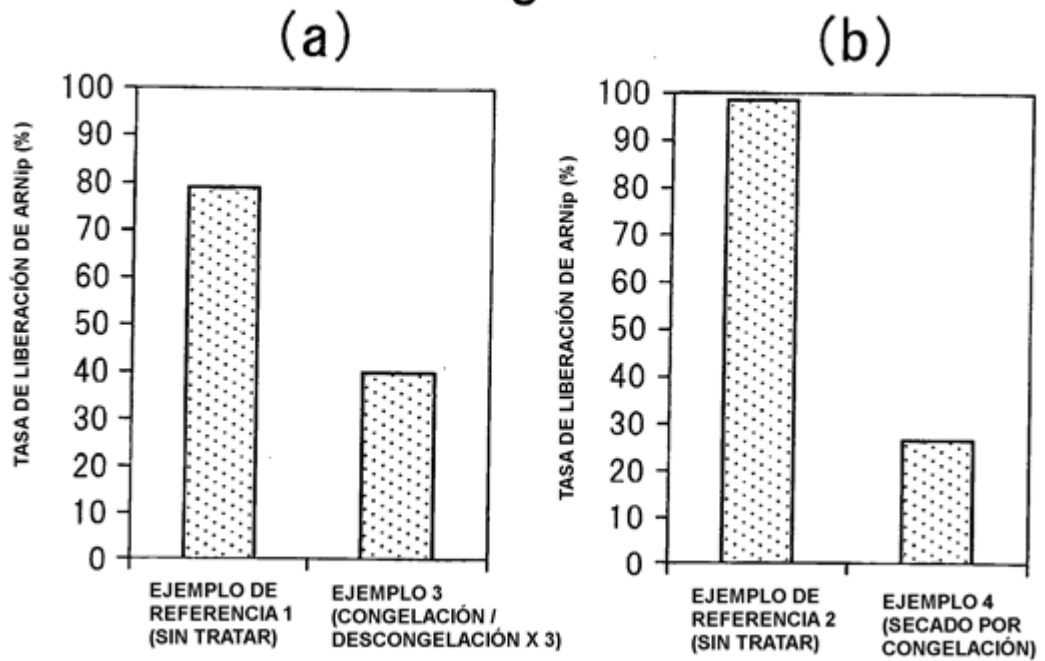


Fig.4

