

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 057**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2012 PCT/JP2012/060905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12147714**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2012 E 12777710 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2703411**

54 Título: **Nanopartículas que contienen un péptido sensible al pH**

30 Prioridad:

25.04.2011 JP 2011097694

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

12.02.2018

73 Titular/es:

**TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
1-27 Kandanshiki-cho
Chiyoda-ku, Tokyo 1018444, JP**

72 Inventor/es:

**KOGURE, KENTARO y
HAMA, SUSUMU**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 654 057 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

Nanopartículas que contienen un péptido sensible al pH

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un péptido sensible al pH débilmente ácido y a una nanopartícula que contiene el péptido. La presente invención se refiere, además, a un agente de administración de sustancias que contiene la nanopartícula.

Antecedentes de la Técnica

10 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 se encuentran en un entorno especial con un pH (un pH de alrededor de 6,5) menor que el de las condiciones fisiológicas (un pH de alrededor de 7,4). Sin embargo, aún no se han desarrollado portadores de administración de fármacos que actúen de forma específica para el tejido tumoral de manera que respondan a este pequeño cambio de pH. Hasta ahora, para mejorar las propiedades de circulación sanguínea mientras se evita la unión con proteínas plasmáticas en la sangre, se ha utilizado polietilenglicol (PEG), que es una macromolécula hidrofílica, para modificar la superficie de los liposomas, etc., y los liposomas modificados se han utilizado como un transportador de, por ejemplo, fármacos contra el cáncer (p. ej., bibliografía de patentes (PTL) 1). Sin embargo, se ha revelado que PEG es antigénico. Un portador que muestra PEG en su superficie tiene una baja afinidad por las células y, por lo tanto, es menos probable que sea absorbido por las células; administrar un fármaco al interior de las células tumorales es, por lo tanto, difícil. El complejo péptido-liposoma descrito en PTL 2 conserva una carga positiva debido a la presencia de un aminoácido de carácter básico (lisina o arginina) en la región N terminal, y no se produce un cambio en la carga dependiendo del pH; por lo tanto, no pueden esperarse suficientes propiedades de circulación de la sangre.

25 La bibliografía no de patente (NPL) 1 utiliza sus segmentos como una región sensible al pH. De acuerdo con la técnica descrita en NPL 1, una disminución drástica en el pH del entorno externo de 7,4 a 5,0 provoca que una His neutra sea cargada positivamente, y la repulsión electrostática así incrementada provoca la ruptura de micelas. Sin embargo, una His no sería protonada solo a un pH débilmente ácido de 6,5; por lo tanto, es difícil provocar una inversión de la carga a un pH de 6,5.

30 NPL 2 revela micelas sensibles al pH, cuya carga superficial cambia de negativa a positiva cuando el ácido dimetilmaleico unido químicamente a un segmento de lisina en un extremo de un polímero de bloque se disocia debido a una disminución en el pH. En el péptido descrito en NPL 2, la disociación del ácido dimetilmaleico provoca la exposición de residuos lisina cargados positivamente; incluso si el pH aumenta, dicho estado no vuelve al estado original. También en un caso en el que pasan a través de un sitio de inflamación u otros tejidos de pH bajo mientras fluyen en la circulación sanguínea, el ácido dimetilmaleico se disociaría para exponer la lisina, lo que provocaría la interacción con los componentes de la sangre; alcanzar un tumor diana es, por lo tanto, difícil.

35 Lista de Citas de Bibliografía de Patentes

PTL 1: documento JP2004-10481A

PTL 2: JP2004-523531A

Bibliografía No de Patentes

40 NPL 1: AIChE Journal Vol. 56, N° 7, 2010, págs. 1922-1931

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

Sumario de la Invención

Problema Técnico

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

45 Solución al Problema

La presente invención proporciona los siguientes puntos (1) a (14), que están dirigidos a una nanopartícula o un agente de administración de sustancias.

(1) Una nanopartícula que comprende un péptido y un componente formador de partículas,

formando el componente formador de partículas un liposoma o una micela, y teniendo el péptido una secuencia con 2 a 8 unidades, en donde cada una de las unidades comienza con His (histidina) y termina con un aminoácido de carácter ácido, y en donde cada una de las unidades es idéntica o diferente,

5 en donde cada una de las unidades tiene de 2 a 5 aminoácidos entre la His y el aminoácido de carácter ácido.

(2) La nanopartícula de acuerdo con el punto (1), en donde cada una de las unidades tiene 3 aminoácidos entre la His y el aminoácido de carácter ácido.

10 (3) La nanopartícula de acuerdo con el punto (1) o (2), en donde los aminoácidos entre la His y el aminoácido de carácter ácido son cualquier aminoácido seleccionado de Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln y Asn.

(4) La nanopartícula de acuerdo con el punto (3), en donde los aminoácidos entre la His y el aminoácido de carácter ácido son cualquier aminoácido seleccionado de Gly, Ala, His, Cys y Ser.

(5) La nanopartícula de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (4), en donde el péptido comprende 2 a 8 unidades representadas por la Fórmula (I) siguiente:

15
$$\text{His}-(\text{AA}_1) (\text{AA}_2) (\text{AA}_3) - \text{Glu/Asp (I)},$$

en donde His es histidina; Glu/Asp es ácido glutámico o ácido aspártico; y AA₁, AA₂ y AA₃ son iguales o diferentes y cada uno representa Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln o Asn, y en donde la secuencia de aminoácidos de cada una de las unidades es igual o diferente.

20 (6) La nanopartícula de acuerdo con el punto (5), en donde el péptido tiene una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID Nos: 1 a 3.

(7) La nanopartícula de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (6), en donde el péptido tiene, en un extremo, un grupo hidrofóbico para ser retenido por el liposoma o la micela.

(8) La nanopartícula de acuerdo con el punto (7), en donde el grupo hidrofóbico es un grupo hidrocarbonado C₁₂₋₂₄ o un grupo acilo C₁₂₋₂₄.

25 (9) La nanopartícula de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (8), en donde el componente formador de partículas contiene fosfolípido.

(10) La nanopartícula de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (9), en donde el componente formador de partículas forma un liposoma.

30 (11) Un agente de administración de sustancias que comprende la nanopartícula de uno cualquiera de los puntos (1) a (10).

(12) Un compuesto peptídico representado por la Fórmula (II) siguiente:



35 en donde His es histidina; Glu/Asp es un ácido glutámico o ácido aspártico; AA₁, AA₂ y AA₃ son iguales o diferentes y cada uno representa Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln o Asn; n representa un número entero de 2 a 8; l y m son iguales o diferentes y cada uno representa 0 o 1; R¹ es un grupo hidrocarbonado C₁₂₋₂₄ o un grupo acilo C₁₂₋₂₄; R² es OH o un grupo protector C-terminal; y Z¹ o Z² representa un enlazador que consiste en 1 a 8 aminoácidos seleccionados de Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln, y Asn, conteniendo el compuesto peptídico 10 a 60 aminoácidos en total.

40 (13) El compuesto peptídico de acuerdo con el punto (12), en donde el péptido en el compuesto peptídico representado por la Fórmula (II) tiene una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID Nos: 1 a 3.

(14) El compuesto peptídico de acuerdo con el punto (12) o (13), en donde R¹ es un grupo acilo C₁₂₋₂₄.

También se describe lo siguiente:

45 La nanopartícula de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (10), en donde la nanopartícula está cargada con al menos una sustancia diana seleccionada del grupo que consiste en fármacos, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, azúcar y materiales compuestos de los mismos.

Efectos Ventajosos de la Invención

La presente invención puede proporcionar un agente de administración de nanopartículas o sustancias capaz de liberar una sustancia diana encapsulada en un entorno celular débilmente ácido que tiene un pH de aproximadamente 6,5.

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

10 La nanopartícula de la presente invención evita la interacción con los componentes del plasma sanguíneo, etc., en condiciones fisiológicas, es decir, pH 7,4, debido a la carga eléctrica negativa de los aminoácidos ácidos, mientras que posee largas propiedades de circulación en sangre. En la nanopartícula de la presente invención, la presencia de un aminoácido de carácter ácido adyacente a His controla la capacidad de respuesta del pH de la His, permitiendo que la nanopartícula de la invención muestre capacidad de respuesta sensible incluso a un pH débilmente ácido. Por esta razón, después de alcanzar un tumor como resultado del efecto EPR (siglas inglesas de efecto de permeación y retención mejorado), la nanopartícula de la presente invención se protonará en condiciones 15 débilmente ácidas en el entorno del tumor, provocando la inversión de la carga; la nanopartícula de la presente invención es absorbida por las células cancerosas. Como tal, la nanopartícula de la presente invención es muy útil.

Breve Descripción de los Dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS del péptido estearoilado (SEQ ID NO: 1; extremo C: CONH₂) obtenido en el Ejemplo de Producción 1.

- 20 La FIG. 2 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS del péptido estearoilado (SEQ ID NO: 2; extremo C: CONH₂) obtenido en el Ejemplo de Producción 2.

La FIG. 3 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS del péptido estearoilado (SEQ ID NO: 3; extremo C: CONH₂) obtenido en el Ejemplo de Producción 3.

- 25 La FIG. 4 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS del péptido estearoilado (SEQ ID NO: 4; extremo C: CONH₂) obtenido en el Ejemplo de Producción 4.

La FIG. 5 muestra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de colorante fluorescente en células utilizando un citómetro de flujo.

La FIG. 6 muestra los resultados obtenidos al observar las células utilizando un microscopio de escaneo láser confocal (Zeiss LSM 510 META).

- 30 La FIG. 7 muestra los resultados obtenidos al observar un núcleo teñido con Hoechst33342 (azul) y endosoma/lisosoma teñido con LysoTracker Green (verde) utilizando un microscopio de escaneo láser confocal (Zeiss LSM 510 META).

La FIG. 8 muestra los resultados de evaluación de la dinámica intratumoral de ratones portadores de cáncer del Ejemplo 4.

- 35 La FIG. 9 muestra los espectros de CD del péptido solo y las nanopartículas modificadas con péptido, así como los resultados predichos de la composición de la estructura secundaria.

La FIG. 10 muestra los resultados de la absorción celular del liposoma modificado con péptido de secuencia desordenada obtenido en el Ejemplo de Producción 4, evaluado utilizando un FACS.

- 40 La FIG. 11 muestra los resultados de la absorción celular del liposoma modificado con péptido obtenido en el Ejemplo de Producción 2, evaluado utilizando un FACS.

Descripción de Realizaciones

La nanopartícula de la presente invención comprende un componente formador de partículas y un péptido como elementos constituyentes.

- 45 El péptido de la presente invención comprende 10 a 60, preferiblemente 12 a 40, y más preferiblemente 14 a 30 aminoácidos en total.

El péptido de la presente invención contiene His (histidina, H) y un aminoácido de carácter ácido (ácido glutámico (Glu, E)) o ácido aspártico (Asp, D) como elementos constituyentes esenciales, y tiene una secuencia con unidades que parten cada una con His y terminan con un aminoácido de carácter ácido. Cada una de estas unidades contiene 2 a 5, y preferiblemente 3 aminoácidos entre His y el aminoácido de carácter ácido. Cada una de estas unidades tiene el mismo número de aminoácidos entre His y el aminoácido de carácter ácido. Por ejemplo, cuando la unidad inicial tiene tres aminoácidos, cada una de las unidades posteriores tiene también tres aminoácidos. Estos aminoácidos se seleccionan de Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln y Asn. De éstos, son preferibles Gly, Ala, His, Cys y Ser. El péptido tiene 2 a 8, preferiblemente 2 a 6, y más preferiblemente 2 a 4 unidades en total, y las unidades adyacentes están directamente unidas entre sí. Específicamente, His está junto al aminoácido de carácter ácido en restos en los que las unidades están unidas entre sí.

En una realización preferible, el péptido de la presente invención tiene 2 a 8, preferiblemente 2 a 6, y más preferiblemente 2 a 4 unidades representadas por la Fórmula (I) que figura a continuación:



en donde His es histidina; Glu/Asp es ácido glutámico o ácido aspártico; y AA₁, AA₂ y AA₃ representan cada uno Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln o Asn.

Cada uno de AA₁, AA₂ y AA₃ es preferiblemente Gly, Ala, Ser, Cys o His, y más preferiblemente Gly, Ala o His. En la secuencia peptídica, el número total de residuos His es mayor que el de los aminoácidos de carácter ácido. Por ejemplo, cuando están presentes 2 aminoácidos de carácter ácido, están presentes de 3 a 7 residuos His. Cuando están presentes 3 aminoácidos de carácter ácido, están presentes 4 a 10 residuos His. Cuando están presentes 4 aminoácidos de carácter ácido, están presentes 5 a 13 residuos His. Cuando están presentes 5 aminoácidos de carácter ácido, están presentes 6 a 16 residuos His. Cuando están presentes 6 aminoácidos de carácter ácido, están presentes 7 a 19 residuos His. Cuando están presentes 8 aminoácidos de carácter ácido, están presentes 9 a 25 residuos His. El péptido de la presente invención contiene 2 a 8, preferiblemente 2 a 6, más preferiblemente 2 a 4 aminoácidos de carácter ácido. El péptido de la presente invención contiene 3 a 25, preferiblemente 3 a 19, y más preferiblemente 3 a 13 residuos His.

En particular, la unidad de la presente invención es preferiblemente His-Gly-Ala-His-Glu, His-Ala-Gly-His-Glu, His-Ala-Ala-Gly-Glu o His-His-Ala-His-Glu. Además de estas unidades, el péptido de la presente invención puede tener, en el extremo N o el extremo C, una secuencia de aminoácidos (Z¹ o Z²; un enlazador) que comprende Gly, Ala, His, y similares. Ejemplos de los aminoácidos que constituyen el enlazador (Z¹ o Z²) incluyen Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln y Asn. De estos, Gly, Ala, Ser y Cys son preferibles; y Gly, Ala y His son más preferibles. Cada uno de los enlazadores (Z¹ o Z²) contiene 1 a 8, y preferiblemente 2 a 6 aminoácidos en total.

El péptido de la presente invención puede tener un grupo protector C-terminal en el extremo C. 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. Ejemplos del grupo que forma un éster incluyen grupos alquilo, en particular grupos alquilo C₁₋₅ lineales o ramificados (grupos alquilo C₁₋₅) tales como metilo, etilo y propilo. Ejemplos del grupo que forma una amida incluyen grupos funcionales de amina tales como amino; y grupos funcionales alquilamino tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y otros grupos mono- o di-alquil C₁₋₅-amino. El grupo que forma una amida es preferible; amino es más preferible.

El péptido de la presente invención está modificado con un grupo hidrófobo. El grupo hidrófobo se introduce en el extremo N o C, preferiblemente el extremo N, del péptido. El grupo hidrofóbico tiene 12 o más, preferiblemente 12 a 24, más preferiblemente 14 a 22, y aún más preferiblemente 16 a 20 átomos de carbono. Ejemplos de los mismos incluyen grupos hidrocarburo y grupos acilo. En particular, son preferibles los grupos acilo. El grupo hidrofóbico puede tener una cadena lineal o ramificada. Ejemplos de los grupos hidrocarburo incluyen grupos alquilo lineales o ramificados que tienen 12 o más átomos de carbono tales como dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, octadecilo y eicosilo. Estearilo es preferible. Ejemplos preferibles de grupos acilo incluyen lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, behenoilo, isoestearoilo, eicosanoilo, lignoceroilo, isopalmitoilo, oleoilo, linoloilo y similares. Son más preferibles grupos acilo seleccionados de lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, isoestearoilo y oleoilo.

Ejemplos preferibles del péptido de la presente invención incluyen aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID N^os: 1 a 3. En una realización preferible, el extremo N de este péptido está unido a un grupo hidrofóbico para ser retenido por un liposoma o una micela. Otra forma de realización preferible es un compuesto peptídico representado por la Fórmula (II) siguiente:



en donde His es histidina; Glu/Asp es un ácido glutámico o ácido aspártico; AA₁, AA₂ y AA₃ son iguales o diferentes y cada uno representa Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln o Asn; n es un número entero de 2 a 8; l y m son iguales o diferentes y representan 0 o 1; R¹ es un grupo hidrocarburo C₁₂₋₂₄ o un grupo acilo

C₁₂₋₂₄; R² es OH o un grupo protector C-terminal; Z¹ o Z² representa un enlazador que consiste en 1 a 8 aminoácidos seleccionados de Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln y Asn, el compuesto peptídico que contiene 10 a 60 aminoácidos en total. Ejemplos de grupos hidrocarbano, grupos acilo y grupos protectores C-terminales son como se indica anteriormente.

5 El péptido de la presente invención se puede producir 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 péptido de la presente invención mediante un método que comprende introducir ADN que codifica un péptido de la presente invención en una célula huésped, y expresar el ADN, utilizando una técnica de recombinación génica. Por ejemplo, en la síntesis en fase sólida, el péptido de la presente invención se puede obtener de la
10 siguiente manera: el grupo carboxilo de un aminoácido N-prottegido, en el que el grupo amino del aminoácido correspondiente al extremo C está protegido con un grupo protector de uretano tal como el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), está unido a una resina insoluble que tiene grupos amino; el grupo protector del grupo amino se separa luego para condensar sucesivamente los aminoácidos protegidos en la dirección N-terminal; y la resina insoluble y los grupos protectores de aminoácidos se separan para obtener de este modo el péptido 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 enlazador 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminoetil)fenoxi); una sustancia diana se puede administrar directamente a la misma mediante escisión de la resina. El aminoácido protegido utilizado en la síntesis del péptido de la presente invención puede obtenerse protegiendo un grupo funcional con un grupo protector conocido utilizando un método conocido. También es posible utilizar aminoácidos protegidos disponibles comercialmente. Como grupo protector se pueden utilizar grupos protectores conocidos. Ejemplos de los mismos incluyen metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, terc.-butoxycarbonilo, 9-fluorenilmetoxycarbonilo, benciloxycarbonilo, 4-metoxibenciloxycarbonilo, 2,2,2-tricloroetiloxycarbonilo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo y similares. Para preparar aminoácidos protegidos, por ejemplo, se pueden utilizar métodos conocidos tales como un método DIPCDI-HOBt (diisopropilcarbodiimida-1-hidroxibenzotriazol). Esta reacción de condensación puede realizarse en un disolvente conocido, p. ej., un disolvente orgánico tal como dimetilformamida. Un reactivo de desprotección para grupos protectores de amino no está limitado, y un reactivo conocido tal como piperidina/dimetilformamida, puede utilizarse 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 también se puede realizar mediante un método conocido. El grado de progreso de la reacción de condensación en cada etapa de síntesis puede confirmarse mediante un método conocido, tal como un método de reacción con ninhidrina. Como tal, se puede obtener un péptido protegido que tiene una secuencia de aminoácidos deseada. El uso de una resina Fmoc-NH-SAL como resina insoluble puede separar simultáneamente la resina y el grupo protector mediante un tratamiento con TMSBr (bromuro de trimetilsililo), TFA (ácido trifluoroacético) o similares. El péptido se puede obtener con el extremo C de COOH (R² = OH) o CONH₂ (R² = NH₂), dependiendo del tipo de resina utilizada.
35

Cuando R² se define como OH, el ácido carboxílico del aminoácido C-terminal del péptido de la presente invención no está sustituido. Asimismo, cuando R² se define como NH₂, etc., el ácido carboxílico del aminoácido C-terminal del péptido de la presente invención es amida (CONH₂).

40 La introducción de un grupo hidrofóbico en el péptido de la presente invención se puede realizar mediante un método conocido. Por ejemplo, se puede introducir un grupo acilo deseado mediante la reacción de un péptido con un extremo N libre y un ácido carboxílico que corresponde al grupo acilo a introducir, junto con un agente de condensación (p. ej., HBTU/HOBt) y un acelerador de la reacción (p. ej., DIEA). La introducción de un grupo hidrocarbonado se puede lograr mediante la reacción con un hidrocarburo halogenado que corresponde al grupo hidrocarbonado que se ha de introducir, en presencia de una base.

45 El péptido así obtenido de la presente invención puede aislarse y purificarse por un medio conocido tal como extracción, recristalización, una variedad de cromatografía (filtración en gel, intercambio iónico, partición y adsorción), electroforesis y distribución a contracorriente. Es preferible un método de cromatografía líquida a alta presión en fase reversa.

50 La nanopartícula de la presente invención tiene un potencial zeta de aproximadamente -100 a 50 mV, preferiblemente de aproximadamente -50 a 30 mV, más preferiblemente de aproximadamente -30 a 10 mV, y particularmente de aproximadamente -30 a 0 mV, a aproximadamente un pH neutro (p. ej., pH 7 o 7,4). El potencial Zeta se puede medir utilizando un equipo Zetasizer.

55 Las nanopartículas de la presente invención tienen un diámetro de partícula medio de, por ejemplo, 30 a 1.000 nm, preferiblemente 50 a 500 nm, más preferiblemente 60 a 400 nm, y particularmente 70 a 300 nm, aunque no está limitado a esto. El diámetro medio de partícula puede medirse, por ejemplo, mediante un método dinámico de dispersión de la luz, un método estático de dispersión de la luz, observación con microscopio electrónico, observación con microscopio de fuerza atómica, o similar.

El agente de administración de sustancias de la presente invención puede utilizarse in vitro o in vivo para administrar una sustancia diana a un sitio de bajo pH.

Ejemplos de sitios de bajo pH incluyen sitios de inflamación, sitios de tumores, sitios infectados y similares. En particular, son preferibles los sitios de tumores.

- 5 Ejemplos de la sustancia diana cargada en la nanopartícula incluyen, pero no se limitan particularmente a uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en fármacos, ácidos nucleicos, péptidos (p. ej., oxitocina, bradiquinina, factor de liberación de tiotropina, encefalina, y similares péptidos y hormonas peptídicas biológicamente activos), proteínas (p. ej., enzima, interleuquina y diversas citoquinas similares, factor de transferencia celular, factor de crecimiento celular y anticuerpos), azúcar y compuestos de los mismos. Éstos se
10 pueden seleccionar de acuerdo con el propósito tal como el diagnóstico o el tratamiento. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, así como análogos y derivados de ADN y ARN (p. ej., ARNip, ácido nucleico peptídico (ANP) y ADN de fosforotioato). Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o doble, y pueden ser ácidos nucleicos lineales o circulares.

- 15 Ejemplos de fármacos utilizados como la sustancia diana incluyen fármacos anticancerosos, fármacos vasodilatadores, agentes antimicrobianos y similares. Ejemplos específicos de fármacos anticancerosos incluyen tegafur, doxorubicina, daunorubicina, cis-platino, oxaliplatino, carboplatino, paclitaxel, irinotecan, SN-38, actinomicina D, vincristina, vinblastina, metotrexato, azatioprina, fluorouracilo, mitomicina C, docetaxel, ciclofosfamida, capecitabina, epirubicina, gemcitabina, mitoxantrona, leucovorina, vinorelbina, trastuzumab, etopósido, estramustina, prednisona, interferón α , interleuquina-2, bleomicina, ifosfamida, mesna, altretamina,
20 topotecán, citarabina, metilprednisolona, dexametasona, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, gemtuzumab, idarrubicina, mitoxantrona, tretinoína, alemtuzumab, clorambucilo, cladribina, imatinib, epirubicina, dacarbazina, procarbazona, mecloretamina, rituximab, denileuquina difitox, trimetoprim/sulfametoxazol, alopurinol, carmustina, tamoxifeno, filgrastim, temozolomida, melfalan, vinorelbina, azacitidina, talidomida, mitomicina, y similares. Ejemplos de fármacos vasodilatadores incluyen bosentán, ambrisentán, beraprost sódico y similares. Ejemplos de agentes antimicrobianos incluyen anfotericina B, penicilina G, ampicilina, cefazolina, imipenem, aztreonam, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, azitromicina, rokitamicina, telitromicina, quinupristina, fosmidosina, ácido nalidíxico, norfloxacin, esparfloxacin, linezolid y similares.

- 25 Ejemplos preferibles de ácidos nucleicos utilizados como la sustancia diana incluyen cualquiera de los ARNs de doble cadena (ARNdc) seleccionados del grupo que consiste en ARN meroduplex (ARNmd), ARNdc mellado (ARNdcm), ARNdc con huecos (ARNdch), ácido nucleico de interferencia corto (ANic), ARNip, microARN (ARNmi), ARN de horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido de interferencia corto, oligonucleótido sustituido de interferencia corto, oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARNdc modificado químicamente y ARN silenciador de genes post-transcripcional (ARNgspt). La sustancia diana puede utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más. Por ejemplo, se pueden utilizar en combinación dos o más tipos de ARNip.
30

- 35 En una realización en términos de sustitución y modificación (que incluye modificación química), un ARN de cadena doble puede comprender un colgante de uno a cuatro nucleótidos en uno o ambos extremos 3' del ARN de cadena doble tal como un colgante que comprende un desoxirribonucleótido o dos desoxirribonucleótidos (p. ej., timidina, adenina). Un ARN de cadena doble puede tener un extremo romo en uno o ambos extremos del ARN de cadena doble. En una realización, el extremo 5' de la primera o segunda cadena está fosforilado. En cualquiera de las realizaciones de ARN de cadena doble, los colgantes de nucleótidos en el extremo 3' pueden comprender ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que están modificados químicamente en un ácido nucleico azúcar, base o
40 cadena principal. En cualquiera de las realizaciones de ARN de cadena doble, el nucleótido cuelga en el extremo 3' y puede comprender uno o más ribonucleótidos de base universal. En cualquiera de las realizaciones del ARN de cadena doble, los colgantes de nucleótidos en el extremo 3' pueden comprender uno o más nucleótidos acíclicos. En cualquiera de las realizaciones de ARN de cadena doble, el ARNdc 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, 2002) o un 5',3'-difosfato.
45

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

- 55 En realizaciones adicionales, un ARN de cadena doble puede comprender, además, al menos un enlace internucleosídico modificado tal como independientemente un fosforotioato, fosforotioato quirral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, fosfonato de metilo, fosfonato de alquilo, fosfonato de 3'-alquileo, fosfonato de 5'-alquileo, fosfonato quirral, fosfonoacetato, tiofosfonoacetato, fosfinato, fosforamidato, 3'-aminofosforamidato,

aminoalquilfosforamidato; tionofosforamidato, tionalquilfosfonato, tionalquilfosfotriéster, selenofosfato, enlace boranofosfato o una combinación de los mismos.

5 Un ARN de cadena doble puede ser sustituido o modificado (incluida la modificación química) utilizando 5-metilcitosina; 5-hidroximetil-citosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; 6-metilo, 2-propilo u otros derivados alquílicos de adenina y guanina; adeninas y guaninas 8-sustituidas (p. ej., 8-aza, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo); 7-metilo, 7-deaza y 3-deaza-adeninas y guaninas; 2-tiouracilo; 2-tiotimina; 2-tiocitosina; 5-metilo, 5-propinilo, 5-halo (p. ej., 5-bromo o 5-fluoro), 5-trifluorometilo u otros uracilos y citosinas 5-sustituidos; y análogos de nucleótidos, tales como 6-azouracilo.

10 ARNs tales como ARNs de cadena doble (ARNdc) pueden modificarse químicamente. Ejemplos de tales modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a enlaces internucleótidos de fosforotioato, 2'-desoxirribonucleótidos, 2'-O-metil-ribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluororribonucleótidos, nucleótidos "acíclicos", 5'-C-metilnucleótidos, y la incorporación terminal de glicerilo y/o residuo desoxiabásico invertido. Estas modificaciones químicas pueden preservar la actividad de ARNi en las células.

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

20 Ejemplos específicos del tipo de lípido que forma una bicapa de lípidos en el liposoma de la presente invención incluyen fosfatidilcolinas (p. ej., dioleoilfosfatidilcolina, dilauoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina), fosfatidilglicerol (p. ej., dioleoilfosfatidilglicerol, dilauoilfosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol y diestearoilfosfatidilglicerol), fosfatidiletanolamina (p. ej., dioleoilfosfatidiletanolamina, dilauoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, diestearoilfosfatidiletanolamina), fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfático, cardiolipina y fosfolípidos similares o aditivos hidrogenados de los mismos; y esfingomielina, gangliósido y glicolípidos similares. Estos se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más. Los fosfolípidos pueden ser lípidos sintéticos, lípidos semisintéticos o lípidos naturales derivados de yema de huevo, soja o de otros animales o plantas (p. ej., lecitina de yema de huevo y lecitina de soja). Estos lípidos se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más.

30 Para lograr la estabilización física o química de la bicapa lipídica y para ajustar la fluidez de la membrana, la bicapa lipídica puede comprender uno o más miembros seleccionados de, por ejemplo, colesterol, ácido succínico, lanosterol, dihidrolanosterol, desmosterol, dihidrocolesterol y esteroides derivados de animales similares; estigmasterol, sitosterol, campesterol, brasicasterol, y esteroides derivados de plantas similares (fitoesteroides); zimosterol, ergosterol y esteroides derivados de microorganismos similares; glicerol, sacarosa y sacáridos similares; trioleína, trioctanoína y ésteres de ácidos grasos similares a glicerol. La cantidad de la misma no está particularmente limitada, pero es preferiblemente de 5 a 40% (relación molar), y más preferiblemente de 10 a 30% (relación molar), en base a la cantidad total de los lípidos que constituyen la bicapa.

40 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; proteína extrínseca de membrana, proteína intrínseca de membrana y proteínas de membrana similares. La cantidad del mismo puede ajustarse adecuadamente.

45 La nanopartícula de la presente invención comprende, en su superficie, un péptido que contiene de 10 a 60 aminoácidos. Cuando la superficie de la nanopartícula se modifica utilizando el péptido de la presente invención, es preferible que se modifique aproximadamente de 1 a 10% en moles de los lípidos totales que constituyen la nanopartícula. La superficie del liposoma de un liposoma unilamelar es la superficie externa de la bicapa lipídica, y la superficie del liposoma de un liposoma multilamelar es la superficie externa de la bicapa lipídica más externa. La nanopartícula de la presente invención puede comprender el péptido mencionado anteriormente en una porción distinta a la superficie (p. ej., la superficie interna de la bicapa lipídica).

50 La nanopartícula de la presente invención comprende preferiblemente un lípido auxiliar (lípido helper). 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.

Se describe a continuación un ejemplo de producción de liposomas utilizando un método de hidratación.

55 Los lípidos, que son componentes constituyentes de una bicapa lipídica, y el péptido mencionado anteriormente modificado con un grupo hidrofóbico o un compuesto hidrofóbico, se disuelven en un disolvente orgánico, seguido de

la separación del disolvente orgánico por evaporación, obteniendo con ello una membrana lipídica. Ejemplos del disolvente orgánico utilizado en esta memoria 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 se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más. Posteriormente, la membrana lipídica se hidrata y se agita o se aplica ultrasonidos, proporcionando con ello nanopartículas que tienen el péptido antes mencionado en su superficie.

Pueden prepararse micelas utilizando sólo el péptido de la presente invención que contiene un grupo hidrofóbico tal como un grupo estearoilo (preferiblemente acilo). En este caso, el péptido también sirve como un componente formador de partículas. Las micelas también pueden prepararse utilizando el péptido de la presente invención en combinación con otros componentes tales como fosfolípidos o tensioactivos que pueden formar micelas.

Como el fosfolípido pueden utilizarse los fosfolípidos y lípidos auxiliares enumerados anteriormente que forman liposomas. Como el tensioactivo (aniónico, no iónico y catiónico), se puede utilizar lo siguiente.

Ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen sulfonatos tales como alcanosulfonatos, sulfonatos de parafina, sulfonatos de alquilbenceno, sulfonatos de α -olefina, sulfosuccinatos y ésteres de sulfosuccinato (p. ej., laureth sulfosuccinato de dioctilsodio y disódico), isetionatos, isetionatos de acilo (p. ej., 2-lauroiloxietano-sulfonato sódico) y sulfoalquilamidas de ácidos grasos, particularmente N-acilmetiltaururos; sulfatos tales como alquil-sulfatos, alquil-sulfatos etoxilados, monoglicéridos sulfatados, alcanolamidas sulfatadas y grasas y aceites sulfatados; carboxilatos tales como carboxilatos de alquilo con una longitud de cadena de carbonos de 12 o más átomos de carbono, sarcosinatos de acilo, sarcosinatos (p. ej., lauril-sarcosinato de sodio), sales de carboxilato de sodio etoxiladas, ácidos carboxílicos y sales (p. ej., oleato de potasio y laurato de potasio), éter ácido carboxílico; ácidos carboxílicos etoxilados y sales tales como carboximetil-alquil-etoxilato de sodio; ésteres de fosfato y sales (p. ej., lecitina); glutamatos de acilo (p. ej., n-lauroil glutamato disódico) y mezclas de los mismos.

Ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen polioxietilenos tales como alcoholes grasos etoxilados, alcoholes etoxilados (p. ej., monohexadecil-éter de octaoxietilenglicol, C16E8 y C12E8), ácidos grasos etoxilados, aminas grasas etoxiladas, amidas grasas etoxiladas, alcanolamidas etoxiladas y alquilfenoles etoxilados; triésteres de ácido fosfórico (p. ej., dioleil-fosfato de sodio); alquilamido-dietilaminas; alquilamido-propilbetainas (p. ej., cocoamido-propilbetaína); derivados de óxido de amina tales como óxidos de alquildimetilamina, óxidos de alquildihidroxiethylamina, óxido de alquilamidodimetilamina y óxido de alquilamidodihidroxiethylamina; derivados polihidroxiados tales como ésteres y éteres de alcoholes polihidroxiados (p. ej., monooleato de sacarosa, glucósido de cetostearilo, ésteres de β -octil-glucofuranósido, alquil-glucósido que tiene una longitud de cadena de carbonos de 10 a 16 átomos de carbono), mono-, di- y poli-glicerol-éteres y ésteres de poliglicerol (p. ej., monolaurato y monoglicérido de tetraglicerol y monooleato de triglicerol (tal como TS-T122 producido por Grinsted), monooleato de diglicerol (tal como TST-T101 producido por Grinsted)) y glicéridos etoxilados; monoglicéridos tales como monooleína y monolinoleína; y ácidos grasos de diglicéridos tal como monoisoestearato de diglicerol.

Ejemplos de tensioactivos catiónicos incluyen haluros de amonio cuaternario alifáticos-aromáticos; derivados de alquilamido de amonio cuaternario; lactato de alquilamidopropildimetilamonio; lactato de alquilamidopropildihidroxiethylamonio; lactato de alquilamidopropilmorfolinio; y similares.

La nanopartícula de la presente invención en forma de liposoma puede producirse como sigue.

Los lípidos, que son un componente constituyente de una bicapa lipídica, se disuelven en un disolvente orgánico, seguido de la separación del disolvente orgánico por evaporación, obteniendo con ello una membrana lipídica. Esta membrana lipídica se hidrata y se agita o se somete a ultrasonidos para producir nanopartículas. Posteriormente, el péptido mencionado anteriormente modificado con un grupo hidrofóbico o un compuesto hidrofóbico se añade al líquido externo de las nanopartículas. El péptido puede introducirse con ello sobre la superficie de cada una de las nanopartículas.

En la preparación de nanopartículas, la relación de lípido catiónico (disolución de EtOH) / lípido auxiliar (disolución de EtOH) / Chol (disolución de EtOH) se puede cambiar adecuadamente. Cuando se utiliza PEG para la modificación, la proporción de PEG se ajusta adecuadamente. Por ejemplo, se puede añadir PEG en una cantidad de 0,1 a 15% en moles, basado en la cantidad total de lípidos.

La nanopartícula de la presente invención puede encapsular una sustancia diana que se ha de administrar a las células.

Cuando la sustancia diana es soluble en agua, se añade a un disolvente acuoso que se utiliza cuando una membrana lipídica se hidrata durante la producción de las nanopartículas. La sustancia diana se puede encapsular con ello en la fase acuosa de la nanopartícula. Cuando es liposoluble, la sustancia diana se añade al disolvente orgánico utilizado durante la producción de la nanopartícula; la sustancia diana se puede encapsular con ello en la

bicapa lipídica de la nanopartícula. El término "encapsular", tal como se utiliza en esta memoria, indica los dos casos en los que se incluye una sustancia diana dentro de una partícula hueca tal como una nanopartícula, y donde una sustancia diana es portada sobre la superficie como un vector tal como una bicapa lipídica. Especies de organismos a las que se administra una sustancia diana no están limitadas, siempre que se trate de un animal vertebrado. Son preferibles los mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen seres humanos, monos, vacas, ovejas, cabras, caballo, cerdos, conejos, perros, gatos, ratas, ratones, cobayas y similares.

La nanopartícula de la presente invención se puede utilizar en un estado de dispersión. Como disolvente de dispersión se puede utilizar una disolución tampón tal como una solución salina fisiológica, una disolución tampón fosfato, una disolución tampón citrato o una disolución tampón ácido acético. A la dispersión, se pueden añadir aditivos, tales como un sacárido, un alcohol polihídrico, un polímero soluble en agua, un tensioactivo no iónico, un agente antioxidante, un regulador de pH y un acelerador de la hidratación.

La nanopartícula de la presente invención también puede utilizarse en un estado de dispersión secada (p. ej., liofilizada o secada por pulverización). Las nanopartículas secas pueden añadirse a una disolución tampón tal como una solución salina fisiológica, una disolución tampón fosfato, una disolución tampón citrato o una disolución tampón ácido acético, para preparar una dispersión.

Las nanopartículas se pueden utilizar tanto in vitro como in vivo. Cuando las nanopartículas se utilizan in vivo, la ruta de administración puede ser, por ejemplo, inyección intravenosa, goteo intravenoso o similar. La dosificación y la frecuencia de administración pueden ajustarse adecuadamente de acuerdo con el tipo y la cantidad de la sustancia diana encapsulada en cada una de las nanopartículas de la presente invención.

La nanopartícula de la presente invención no causa pérdida de peso corporal ni hepatopatía y, por lo tanto, puede administrarse de manera segura.

Ejemplos

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

25 Ejemplo de Producción 1

Síntesis del péptido estearoilado (compuesto 1)

Compuesto 1: $C_{17}H_{35}-C(O)-GGGGHGAHEHAGHEHAAGEHHAHE-NH_2$

Utilizando una resina de amida de Rink (0,67 mmol/g) como material de partida, con una escala de 0,1 mM o 0,03 mM, el péptido de SEQ ID NO: 1 (extremo C: $CONH_2$) se sintetizó mediante síntesis en fase sólida de Fmoc utilizando aminoácidos, un agente de condensación (HBTU/HOBt) y un acelerador de la reacción (DIEA) (4 equivalentes cada uno en relación con la resina). Se añadieron a la resina un ácido esteárico (P.M. 284,48), un agente de condensación (HBTU/HOBt) y un acelerador de la reacción (DIEA) (4 equivalentes cada uno en relación con la resina) para provocar la activación, y el producto resultante se añadió luego a la resina en un estado en el que la extensión de aminoácidos se había completado, dejando solamente el extremo N libre, y se hizo reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. (HBTU: P.M. 379,2; HOBt: anhidro, P.M. 135,1, DIEA: P.M. 129,2). Una vez completada la reacción, se añadió a la resina una disolución de cóctel de TFA (ácido trifluoroacético) (TFA: 125 mL; H_2O : 0,25 mL; fenol: 0,375 g; etanoditiol: 0,125 mL; y tioanisol: 0,25 mL) y se hizo reaccionar enfriando con hielo durante 15 minutos, y a temperatura ambiente durante 2 horas, para obtener péptido bruto. La purificación se realizó por HPLC, seguido de liofilización. La pureza se midió por HPLC y MALDI-TOF-MS. El análisis se realizó bajo las siguientes condiciones de HPLC, y el producto diana se obtuvo como un único pico (tiempo de retención 15,1 min).

Tampón A: TFA al 0,1%/H₂O; Tampón B: TFA al 0,1%/acetronitrilo; Columna: Columna SunFire C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm; Caudal: 1 mL/min; Longitud de onda: 220 nm.

Se utilizó un sistema Voyager de Applied Biosystems para MALDI-TOF-MS. Peso molecular calculado: 2651,8; encontrado: 2651,73. La Fig. 1 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS.

45 Escala de síntesis: una escala de 0.1 mM (peso molecular: 2651,8); Cantidad de resina utilizada: 159,8 mg; Valor teórico del péptido obtenido utilizando esta resina: 283,9 mg; Cantidad bruta realmente obtenida: 183.1 mg (rendimiento: 64.5%).

Ejemplo de Producción 2

Síntesis del péptido reducido en 4AA (compuesto 2)

50 Compuesto 2: $C_{17}H_{35}-C(O)-GGGGHGAHEHAGHEHAAGEH-NH_2$

La síntesis se realizó como en el Ejemplo de Producción 1 para obtener un péptido diana. El péptido diana contenía un grupo estearoilado (amida de ácido esteárico) en el extremo N, y $CONH_2$ en el extremo C. El péptido tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Peso molecular calculado del péptido estearoilado diana: 2177,3; encontrado: 2177,9. La Fig. 2 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS.

Escala de síntesis: una escala de 0,03 mM (peso molecular: 2177,3); Cantidad de resina utilizada: 61,2 mg; Valor teórico del péptido obtenido utilizando esta resina: 89,3 mg; Cantidad bruta realmente obtenida: 28,3 mg (31,7% de rendimiento).

Ejemplo de Producción 3

- 5 Síntesis del péptido reducido en 8AA (Compuesto 3)
Compuesto 3: $C_{17}H_{35}-C(O)-GGGGHGAHEHAGHEHA-NH_2$

La síntesis se realizó como en el Ejemplo de Producción 1 para obtener un péptido diana. El péptido diana contenía un grupo estearoilo (amida de ácido esteárico) en el extremo N, y $CONH_2$ en el extremo C. El péptido tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Peso molecular calculado del péptido estearoilado diana: 1782,9; encontrado: 1782,4. La Fig. 3 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS.

- 10 Escala de síntesis: una escala de 0,03 mM (peso molecular: 1782,9); Cantidad de resina utilizada: 67,0 mg; Valor teórico del péptido obtenido utilizando esta resina: 80,0 mg; Cantidad bruta realmente obtenida: 51,4 mg (rendimiento: 64,3%).

Ejemplo de Producción 4

- 15 Síntesis del péptido desordenado (compuesto comparativo)
Compuesto 4: $C_{17}H_{35}-C(O)-GGGGHGEAHHAEGHHAEEHAGEAH-NH_2$

La síntesis se realizó como en el Ejemplo de Producción 1 para obtener un péptido diana. El péptido diana contenía un grupo estearoilo (amida de ácido esteárico) en el extremo N, y $CONH_2$ en el extremo C. El péptido tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Peso molecular calculado del péptido estearoilado diana: 2651,8; encontrado: 2651,0. La Fig. 4 muestra los resultados de HPLC y MALDI-TOF-MS.

- 20 Escala de síntesis: una escala de 0,03 mM (peso molecular: 2651,8); Cantidad de resina utilizada: 45,3 mg; Valor teórico del péptido obtenido utilizando esta resina: 80,5 mg; Cantidad bruta realmente obtenida: 31,0 mg (rendimiento: 38,5%)

- 25 Ejemplo 1: Resultados de medición del diámetro de partícula y el potencial de superficie (potencial zeta) en diferentes condiciones de pH (que presentan una capacidad de respuesta al pH)

- 30 (1) Liposomas se prepararon de la siguiente manera. Específicamente, una solución de etanol lipídico preparada a partir de una mezcla de fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC) y dioleoil-tetraammonio-propano (DOTAP) en una proporción de 8:1 (relación en moles) se dispensó en tubos de ensayo, y se mezcló una cantidad igual de cloroformo, seguido de evaporación a sequedad bajo una corriente de nitrógeno para obtener membranas lipídicas delgadas. A ello se añadió una disolución tampón que tenía un pH de 7,4, y la mezcla se hidrató suficientemente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez completada la hidratación, los tubos de ensayo se sometieron a ultrasonidos utilizando un dispositivo ultrasónico del tipo tanque de agua para preparar liposomas (concentración de lípidos: 10 mM). A la suspensión liposomal obtenida se añadió el péptido (compuesto 1) obtenido en el Ejemplo de Producción 1 en una cantidad de 5% en moles del contenido lipídico total, y la mezcla se incubó. La interacción electrostática provocó la unión del péptido a la superficie de la membrana lipídica, y el grupo estearoilo del péptido se movió (se adhirió) al resto hidrofóbico de los lípidos de la membrana. El liposoma 1, cuya superficie se modificó con el péptido, se preparó de ese modo.

- 40 (2) El diámetro de partícula (tamaño) y el potencial de superficie (potencial ζ) del liposoma 1 diluido y suspendido en disoluciones tampón que tienen diferente pH se midieron con un equipo Zetasizer Nano producido por Malvern Instruments Ltd. La Tabla 1 muestra los resultados.

Tabla 1

pH	7,4	6,5	6,0	5,5
Tamaño (nm)	173 ± 7,59	265 ± 43,38	198 ± 14,5	158 ± 5,4
potencial ζ (mV)	-15,3 ± 1,32	7,13 ± 0,75	10,73 ± 1,89	11,2 ± 1,24

- 45 Cuando el pH era 7,4, el diámetro de partícula era ligeramente inferior a 200 nm. Incluso cuando se disminuyó el valor de pH, no se observó gran cambio en el diámetro de la partícula. El potencial de superficie era de aproximadamente -15 mV cuando el pH era 7,4; sin embargo, el potencial de superficie se incrementó a 7 mV cuando el pH era 6,5. Esto indica que la carga eléctrica de la superficie cambia de negativa a positiva debido a una ligera variación en el pH.

Ejemplo 2: Resultados de medición de la absorción celular en diferentes condiciones de pH (que presentan una capacidad de respuesta al pH)

Los liposomas se prepararon como en el método de preparación del Ejemplo 1, excepto que los lípidos marcados con colorante fluorescente (dioleoilfosfatidiletanolamina marcada con rodamina) se añadieron de antemano a la disolución lipídica en una cantidad de 1% en moles del contenido lipídico. Los liposomas preparados relevantes se añadieron a células de melanoma de ratón cultivadas (B16-F1) en medios de cultivo con pH diferente (5,5, 6,0, 6,5 y 7,4), y se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, los sobrenadantes del cultivo se separaron de allí, y las células se recolectaron mediante tripsinización. La cantidad del colorante fluorescente en las células (la cantidad de la absorción celular de liposomas) se midió mediante un citómetro de flujo (citómetro de flujo de calibre FACS). La Fig. 5 muestra los resultados.

Cuando el pH era de 7,4, la cantidad de absorción celular de los liposomas relevantes era casi la misma que la de las células no tratadas (no se añadieron liposomas). Por el contrario, cuando el pH era de 5,5 o 6,5, las células absorbieron un gran número de liposomas relevantes. Específicamente, la cantidad de absorción celular de los liposomas relevantes se incrementó notablemente cambiando ligeramente el valor de pH (de 7,4 a 6,5).

Las células aquí se observaron utilizando un microscopio de barrido láser confocal (Zeiss LSM 510 META). La Fig. 6 muestra los resultados. Cuando el pH era de 7,4, casi no se observó fluorescencia (roja) de los liposomas relevantes en las células. En contraposición, cuando el pH era 6,5 o 5,5, se observó una gran cantidad de fluorescencia de los liposomas relevantes en el citoplasma (el azul es el núcleo teñido con Hoechst 33342). Esto también indica que la cantidad de absorción celular de los liposomas relevantes se incrementó significativamente cambiando ligeramente el pH (de 7,4 a 6,5).

Ejemplo 3: Resultados de la observación de la dinámica intracelular en el sistema celular cultivado (que presenta una capacidad de respuesta al pH en el endosoma)

Como en el Ejemplo 2, los liposomas relevantes marcados con fluorescente (rojo) se añadieron a células de melanoma de ratón cultivadas (B16-F1) en medios de cultivo con diferentes pH (5,5, 6,0, 6,5 y 7,4) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, el núcleo se tiñó con Hoechst 33342 (azul), mientras que el endosoma y el lisosoma se tiñeron con LysoTracker green (verde). La observación se realizó luego utilizando un microscopio de barrido láser confocal (Zeiss LSM 510 META). La Fig. 7 muestra los resultados.

Los resultados eran similares a los del Ejemplo 2; específicamente, cuando el pH era 7,4, casi no se observaron manchas rojas dentro de las células, lo que indica que los liposomas relevantes no fueron captados por las células. Por el contrario, cuando el pH era de 6,5 o 5,5 se observó un gran número de manchas rojas dentro de las células, lo que indica que las células absorbieron muchos liposomas relevantes. Las manchas rojas no se solaparon con manchas verdes; casi todas las manchas eran solo rojas. Esto significa que los liposomas relevantes no permanecieron en el endosoma o lisosoma y escaparon al citoplasma. Los endosomas y los lisosomas tienen un entorno de bajo pH en el interior. Considerando esto, se sugiere la posibilidad de que los liposomas relevantes se hayan alterado para, por ejemplo, fusionarse con membranas endosomales o lisosomales para escapar con ello de los endosomas o los lisosomas. Esto confirma que los liposomas relevantes tienen la capacidad de escapar de los endosomas y lisosomas en respuesta a cambios del pH en endosomas y lisosomas.

Ejemplo 4: Dinámica en el tumor de un ratón portador de cáncer (que presenta una capacidad de respuesta al pH en el tumor)

0,2 mL de los liposomas relevantes que contienen un colorante fluorescente (CellTracker CM-Dil (rojo)) a una concentración del 0,5% del contenido de lípidos (concentración de lípidos: 10 mM) o, como control, 0,2 mL de liposomas modificados con polietilenglicol (PEG) que contienen, de manera similar a los anteriores, CellTracker CM-Dil a una concentración de 0,5% del contenido de lípidos (composición lipídica: EPC:colesterol:diestearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG2000 = 1,85:1:0,15; concentración de lípidos: 10 mM) se inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola en un ratón sin pelo portador de cáncer con un tumor que creció a un tamaño de 100 mm³, formado por trasplante subcutáneo de células B16-F1. Después de ello, el tumor se extirpó y se sometió a criosección. Las criosecciones se trataron con paraformaldehído al 4% para fijar el tejido, seguido de tratamiento utilizando el anticuerpo anti-CD31 (anticuerpo contra la proteína marcadora de células endoteliales) como anticuerpo primario. Posteriormente, se realizó un tratamiento adicional utilizando un anticuerpo marcado con un colorante fluorescente (Alexa488 (verde)) como un anticuerpo secundario para inmunotefir el tejido fijado. Además, el mismo tejido fijo se embebió en Vectashield que contiene un colorante nuclear (DAPI). El tejido embebido y fijado, así obtenido, se observó con un microscopio de barrido láser confocal. La Tabla 8 muestra los resultados.

Ambos liposomas (rojos) se observaron por igual en el tejido tumoral. Esto sugiere que los liposomas relevantes tenían sustancialmente las mismas propiedades prolongadas de circulación de sangre que el PEG, aunque los liposomas relevantes no estaban recubiertos con PEG. Además, muchos de los liposomas de PEG (rojo) se observaron junto con verde (amarillo); esto sugiere que los liposomas de PEG estaban ubicados dentro de los vasos sanguíneos y alrededor de los vasos sanguíneos. De este modo, se supone que es probable que los liposomas de PEG se filtren desde los tejidos tumorales. En contraposición, con respecto a los liposomas relevantes, el rojo se

observó solo lejos del verde, lo que sugiere que los liposomas relevantes estaban localizados lejos de los vasos sanguíneos, es decir, profundamente en el tejido tumoral. Esto indica que es probable que los liposomas relevantes permanezcan en tumores (tengan un excelente efecto de fijación de objetivo).

5 Ejemplo 5: Espectros de CD de un péptido solo o una nanopartícula modificada con péptido bajo diferentes condiciones de pH (presentando capacidad de respuesta al pH y la necesidad de un sustrato de estructura de membrana)

10 El péptido obtenido en el Ejemplo de Producción 1 solo y el liposoma 1 obtenido como en el Ejemplo 1 (teniendo cada uno una concentración de péptido de 20 μ M) se suspendieron en PBS (-) con pH diferente y los espectros de CD (dicroísmo circular) se registraron en un espectropolarímetro J-720WI (producido por JASCO Corporation). Luego, se utilizó el software de análisis (véase JWSSE-480, Molecular Membrane Biology, julio, agosto de 2007; 24 (4): 282-293) para predecir la composición de la estructura secundaria en los espectros. La Fig. 9 muestra los resultados.

15 En la Fig. 9, parte inferior, la "hélice α " representa una estructura de hélice α ; la "espiral" representa una estructura en espiral aleatoria (que no forma una estructura secundaria transparente); y "vuelta" representa una estructura de flexión.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el uso del péptido solo, los espectros de CD obtenidos, cuando los valores de pH eran 7,4 y 6,5, eran casi los mismos, y el espectro cambió mucho cuando el pH era de 6,0. Esto confirma que no se produce un cambio estructural a menos que el pH se reduzca a 6,0 cuando el péptido se utiliza solo.

20 A la vista de los espectros de CD del liposoma 1, el espectro del liposoma 1 cuando el pH era 7,4 era diferente del obtenido con el uso del péptido solo. Por lo tanto, se sugiere que, debido a que el péptido se localiza en la membrana lipídica, el estado de la estructura secundaria era diferente del que tenía cuando el péptido se utilizaba solo. Además, el cambio en el pH de 7,4 a 6,5 dio como resultado un gran cambio en el espectro de CD, cuyo resultado era casi el mismo que los resultados obtenidos cuando los valores de pH eran 6,0 y 5,5. Esto aclara el hecho de que el péptido localizado en el liposoma 1 sufre un gran cambio estructural debido a un pequeño cambio de pH. Con ello se confirma que una estructura de partícula o membrana tal como un liposoma o una micela es esencial para asegurar la sensibilidad del péptido a un pequeño cambio de pH.

30 Ejemplo 6: Resultados de la evaluación de la capacidad de respuesta al pH (diámetro de partícula, potencial zeta, absorción celular, etc.) con respecto a un péptido que tiene una secuencia barajada y con respecto a un péptido de diferente longitud

(1) Como en el método de preparación del Ejemplo 1, los péptidos estearoilados de los Ejemplos de Producción 2 a 4 se añadieron a las respectivas suspensiones liposómicas que contenían EPC y DOTAP en una relación de 8:1 (relación molar), y las mezclas se incubaron para preparar con ello liposomas 2 a 4 modificados con péptidos, estando modificada la superficie de cada uno con los péptidos respectivos.

35 (2) El diámetro de partícula (tamaño) y el potencial de superficie (potencial ζ) de cada uno de los liposomas modificados con péptidos diluidos y suspendidos en soluciones tampón con pH diferente se midieron con un equipo Zetasizer Nano producido por Malvern Instruments Ltd.

La Tabla 2 muestra los resultados del liposoma 4 modificado con péptidos obtenido utilizando el péptido del Ejemplo de Producción 4.

40 Tabla 2

pH	7,4	6,5	6,0	5,5
Tamaño (nm)	1471 \pm 717,6	723,3 \pm 522,8	683,5 \pm 46,8	945,6 \pm 549,8
potencial ζ (mV)	8,2 \pm 2,1	11,3 \pm 3,0	12,3 \pm 1,5	11,1 \pm 3,6

El liposoma 4 que no tenía repeticiones de la unidad que comenzaba con His y terminaba con un aminoácido de carácter ácido tenía un potencial de superficie positivo a todos los pHs. Por lo tanto, el liposoma 4 era completamente diferente de los liposomas de la presente invención en términos de sus propiedades.

45 La absorción celular del liposoma 4 fue evaluada por FACS. Cuando el pH era de 7,4, las células absorbieron una gran cantidad de liposoma 4; incluso cuando el pH se redujo a 6,5, casi la misma cantidad fue absorbida por las células (Fig. 10). Estos resultados se ajustan a los resultados obtenidos en relación con el potencial de superficie mostrado anteriormente, lo que indica que incluso con los mismos aminoácidos constituyentes, el liposoma 4 que no

tiene repeticiones de la unidad que comienza con His y que termina con un aminoácido de carácter ácido no responde a pequeños cambios de pH.

- 5 (3) Como en el método del Ejemplo 1, los liposomas 2a, 2b y 2c se prepararon utilizando el péptido del Ejemplo de Producción 2, que tiene 4 residuos más cortos que el péptido obtenido en el Ejemplo de Producción 1, en cantidades respectivas de 5, 6 y 7% en moles del contenido de lípidos para la modificación, y se midió el potencial de superficie. Como resultado, todos los liposomas mostraron una tendencia similar a la del liposoma 1 (Tabla 3).

Tabla 3

Liposoma modificado con péptidos (acortado en 4 residuos) (modificación del péptido: 5% en moles de contenido lipídico)

pH	7,4	6,5	6,0	5,5
Tamaño (nm)	172,9 ± 717,6	152,4 ± 23,1	185,1 ± 41,3	438,6 ± 538,0
potencial ζ (mV)	- 14,1 ± 2,3	-2,3 ± 4,4	0 ± 1,5	6,6 ± 0,8

Liposoma modificado con péptidos (acortado en 4 residuos) (modificación del péptido: 6% en moles de contenido lipídico)

pH	7,4	6,5
Tamaño (nm)	170,9	195,6
potencial ζ (mV)	- 12,43	-3,3

- 15 Liposoma modificado con péptidos (acortado en 4 residuos) (modificación del péptido: 7% en moles de contenido lipídico)

pH	7,4	6,5
Tamaño (nm)	194,4	212,5
potencial ζ (mV)	- 12,0	-2,8

- 20 Además, la absorción celular fue evaluada por FACS. Como resultado, cuando el pH era 7,4, las cantidades de absorción celular de todos estos liposomas eran casi las mismas que en un caso en el que las células no tratadas estaban implicadas, es decir, casi no se absorbían liposomas por parte de las células; sin embargo, las cantidades de absorción celular aumentaron cuando el pH era 6,5.

- 25 Esto confirma que incluso cuando los liposomas se modificaron con péptidos acortados en 4 residuos, los mismos responderían a pequeños cambios de pH, lo que aumentaría significativamente su afinidad por las células.

(4) Además, como en el método del Ejemplo 1, los liposomas 3a, 3b y 3c se prepararon utilizando el péptido del Ejemplo de Producción 3, que es 8 residuos más corto que el del Ejemplo de Producción 1, en cantidades respectivas de 5, 7,5 y 10% en moles del contenido de lípidos para la modificación, y se midió el potencial de superficie de cada uno de los liposomas (Tabla 4).

30 Tabla 4

Liposoma modificado con péptidos (acortado en 8 residuos) (modificación del péptido: 5% en moles de contenido lipídico)

pH	7,4	6,5	6,0	5,5
Tamaño (nm)	1572	561,9	225,4	175
potencial ζ (mV)	0,5	7,8	9,0	9,8

- 35 Liposoma modificado con péptidos (acortado en 8 residuos) (modificación del péptido: 7,5% en moles de contenido lipídico)

pH	7,4	6,5	6,0	5,5
Tamaño (nm)	574,3	392,9	325,4	424,4
potencial ζ (mV)	-4,6	3,78	7,8	10,5

Liposoma modificado con péptidos (acortado en 8 residuos) (modificación del péptido: 10% en moles de contenido lipídico)

pH	7,4	6,5	6,0	5,5
Tamaño (nm)	526,5	386,9	498,2	252,9
potencial ζ (mV)	-4,8	7,1	6,7	11,1

- 5 Como resultado, todos estos liposomas mostraron una gran diferencia en el potencial de superficie entre los valores de pH de 7,4 y 6,5. En particular, el liposoma 3c, en el que se modificó el 10% en moles del contenido de lípidos, tenía un gran potencial de superficie.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Nanopartícula que contienen un péptido sensible al Ph

<130> P12-042

5 <140> 12777710.0
<141> 24-04-2012

<150> JP 2011-097694
<151> 25-04-2011

<160> 4

10 <170> PatenIn versión 3.4

<210> 1
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 1

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

Ala Gly Glu His His Ala His Glu
20

20 <210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 2

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

Ala Gly Glu His
20

30 <210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 3

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

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 4

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

Glu Ala His His Gly Glu Ala His
20

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto peptídico representado por la Fórmula (II) siguiente:



- 5 en donde His es histidina; Glu/Asp es un ácido glutámico o ácido aspártico; AA₁, AA₂ y AA₃ son iguales o diferentes y cada uno representa Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln o Asn; n representa un número entero de 2 a 8; l y m son iguales o diferentes y cada uno representa 0 o 1; R¹ es un grupo hidrocarbonado C₁₂₋₂₄ o un grupo acilo C₁₂₋₂₄; R² es OH o un grupo protector C-terminal; y Z¹ o Z² representa un enlazador que consiste en 1 a 8 aminoácidos seleccionados de Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln, y Asn, conteniendo el compuesto peptídico 10 a 60 aminoácidos en total.
- 10 2. El compuesto peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido en el compuesto peptídico representado por la Fórmula (II) tiene una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID N^os: 1 a 3.
3. El compuesto peptídico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde R¹ es un grupo un grupo acilo C₁₂₋₂₄.
- 15 4. Una nanopartícula que comprende un péptido y un componente formador de partículas, formando el componente formador de partículas un liposoma o una micela, y teniendo el péptido una secuencia con 2 a 8 unidades, en donde cada una de las unidades comienza con His (histidina) y termina con un aminoácido de carácter ácido, y en donde cada una de las unidades es idéntica o diferente, en donde cada una de las unidades tiene de 2 a 5 aminoácidos entre la His y el aminoácido de carácter ácido.
- 20 5. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 4, en donde cada una de las unidades tiene 3 aminoácidos entre la His y el aminoácido de carácter ácido.
6. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde los aminoácidos entre la His y el aminoácido de carácter ácido son cualquier aminoácido seleccionado de Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln y Asn.
- 25 7. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los aminoácidos entre la His y el aminoácido de carácter ácido son cualquier aminoácido seleccionado de Gly, Ala, His, Cys y Ser.
8. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el péptido comprende 2 a 8 unidades representadas por la Fórmula (I) siguiente:
- $$\text{His}-(AA_1)(AA_2)(AA_3)-\text{Glu/Asp} \text{ (I)},$$
- 30 en donde His es histidina; Glu/Asp es ácido glutámico o ácido aspártico; y AA₁, AA₂ y AA₃ son iguales o diferentes y cada uno representa Gly, Ala, His, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, Ser, Thr, Gln o Asn, y en donde la secuencia de aminoácidos de cada una de las unidades es igual o diferente.
9. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el péptido tiene una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID Nos: 1 a 3.
- 35 10. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde el péptido tiene, en un extremo, un grupo hidrofóbico para ser retenido por el liposoma o la micela.
11. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el grupo hidrofóbico es un grupo hidrocarbonado C₁₂₋₂₄ o un grupo acilo C₁₂₋₂₄.
12. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde el componente formador de partículas contiene fosfolípido.
- 40 13. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en donde el componente formador de partículas forma un liposoma.
14. Un agente de administración de sustancias que comprende la nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13.

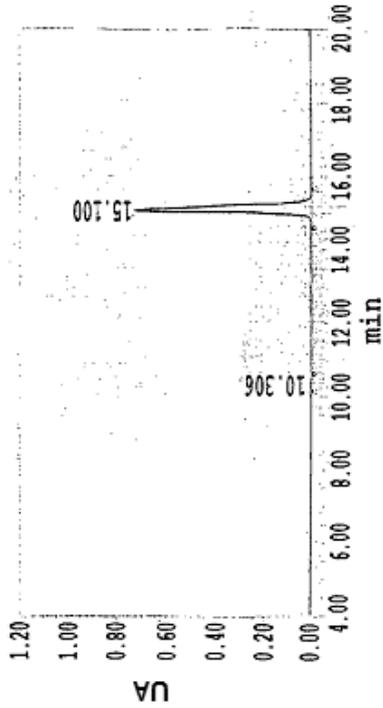
Fig. 1

Sistema Voyager de Applied Biosystems 6368

Datos analíticos por HPLC

Información de la muestra

Nombre Muestra: 6080-Pure Solución A: H2O en TFA al 0.1%
 Fecha análisis: 26/12/2010 21:35:30 Solución B: ACN en TFA al 0.1%
 Cantidad inyección: 5.00µl Condiciones analíticas: min. % A % B
 Caudal: 1.0ml/min 0 90 10
 Longitud onda: 220nm 20 40 60



Nombre componente	Tiempo retención (min)	Área (µV s)	%Área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1	10.306	32975	0.41	5059		
2	15.100	7976944	99.59	710467		

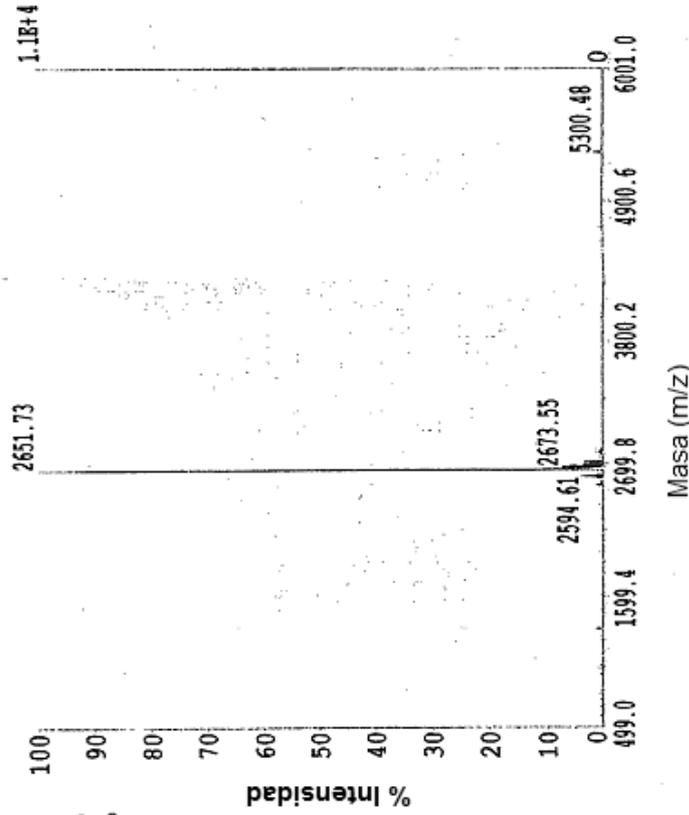


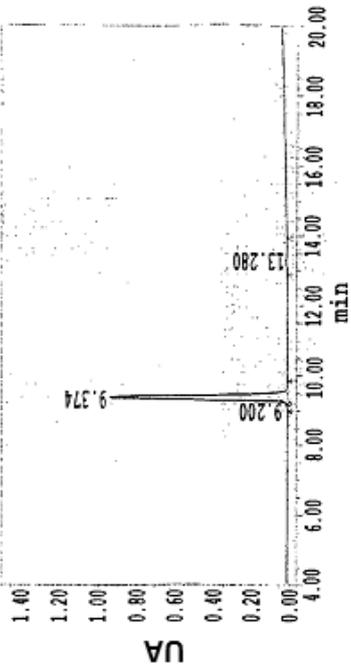
Fig. 2

Sistema Voyager de Applied Biosystems 6368

Datos analíticos por HPLC

Información de la muestra

Nombre muestra: 6158-Pure Solución A: H2O en TFA al 0.1%
 Fecha análisis: 13/01/2011 19:02:01 Solución B: ACN en TFA al 0.1%
 Cantidad inyección: 10.00 µl Condiciones analíticas: min. %A %B
 Caudal: 1.0ml/min 0 80 20
 Longitud onda: 220nm 20 10 90



Nombre componente	Tiempo retención (min)	Área (µV s)	%Área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1	9.200	42341	0.56	6980		
2	9.374	7459078	98.38	931044		
3	13.280	80820	1.07	4550		

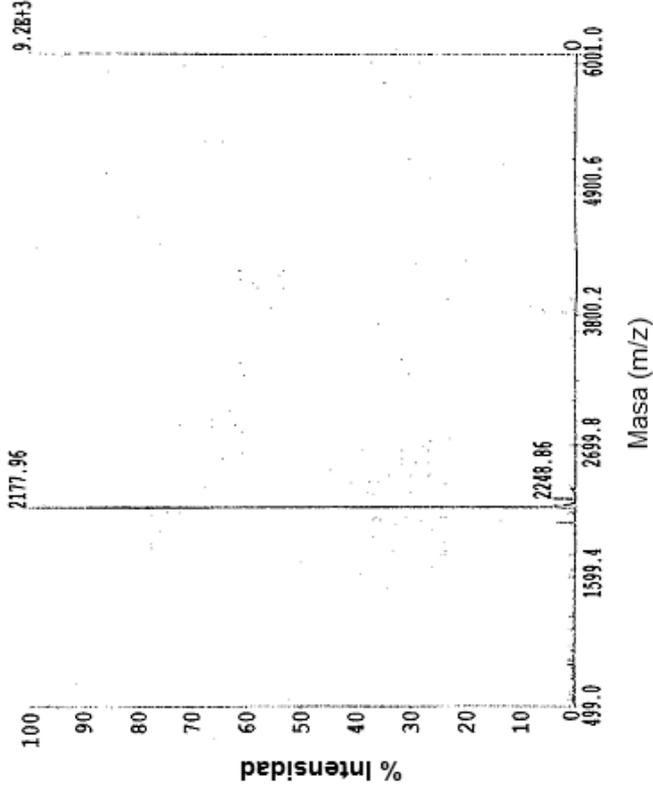


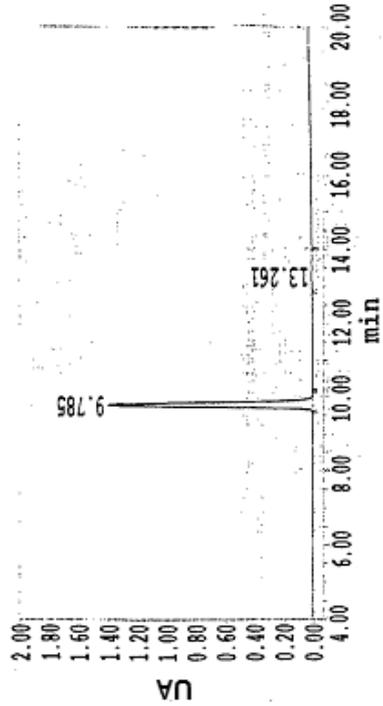
Fig. 3

Sistema Voyager de Applied Biosystems 6368

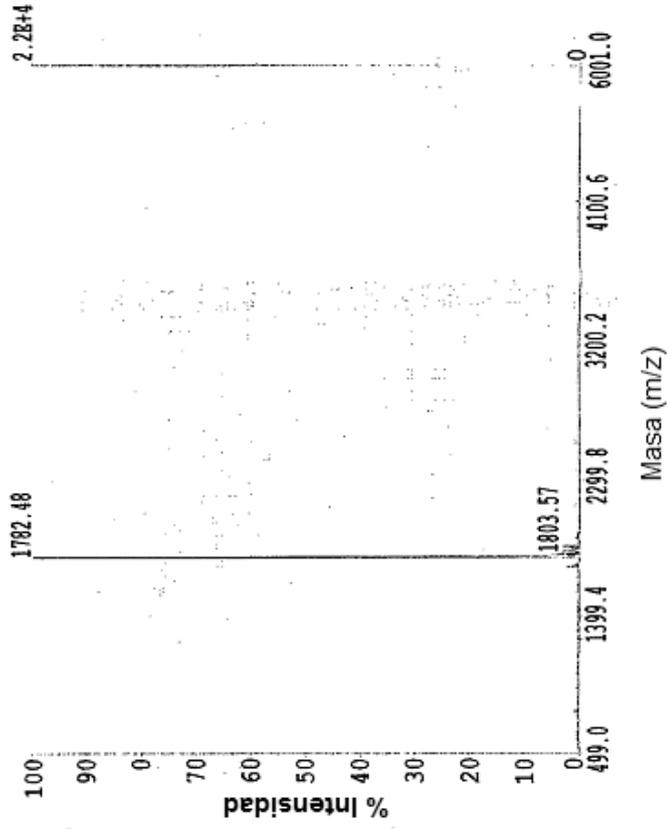
Datos analíticos por HPLC

Información de la muestra

Nombre muestra: 6159-Pure Solución A: H2O en TFA al 0.1%
 Fecha análisis: 13/01/201 17:38:27 Solución B: ACN en TFA al 0.1%
 Cantidad inyección: 10.00µl Condiciones analíticas: min. %A %B
 Caudal: 1.0ml/min 20 10 90
 Longitud onda: 220nm



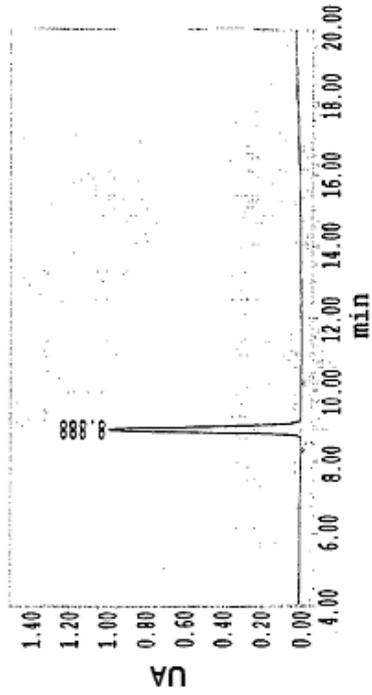
Nombre componente	Tiempo retención (min)	Área (µV s)	%Área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1	9.785	11015783	99.28	1388877		
2	13.261	79710	0.72	4521		



Datos analíticos por HPLC

Información de la muestra

Nombre muestra: 6157-Pure Solución A: H2O en TFA al 0.1%
 Fecha análisis: 19/01/2011 20:31:00 Solución B: ACN en TFA al 0.1%
 Cantidad inyección: 10.00µl Condiciones analíticas: min. %A %B
 Caudal: 1.0ml/min 0 80 20
 Longitud onda: 220nm 20 10 90



Nombre componente	Tiempo retención (min)	Área (µV s)	%Área	Altura (µV)	Concentración	Unidad
1	8.886	9539069	100.00	990621		

Sistema Voyager de Applied Biosystems 6368

Fig. 4

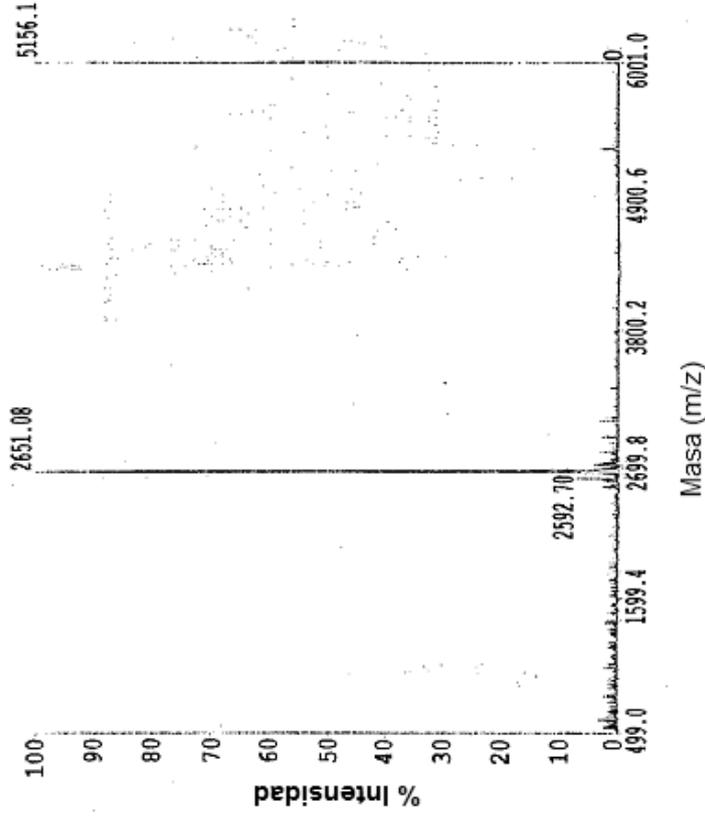


Fig. 5

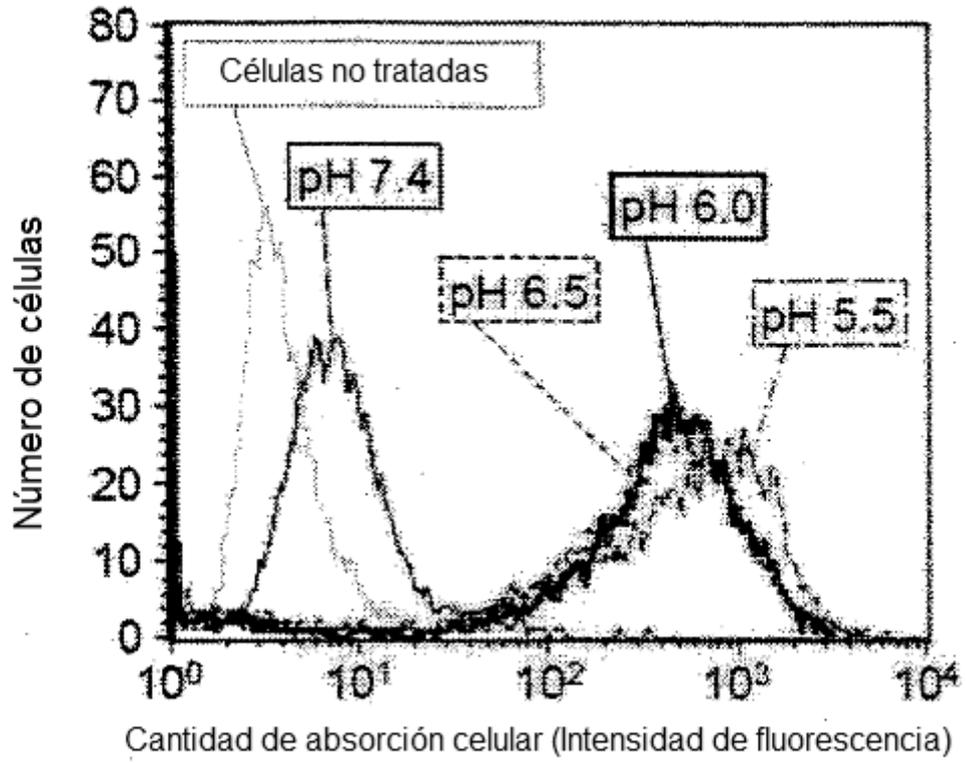


Fig. 6

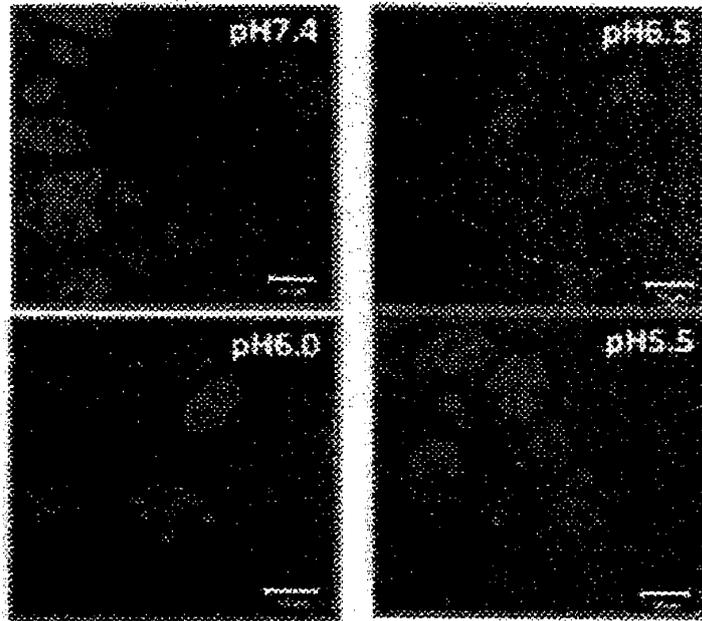


Fig. 7

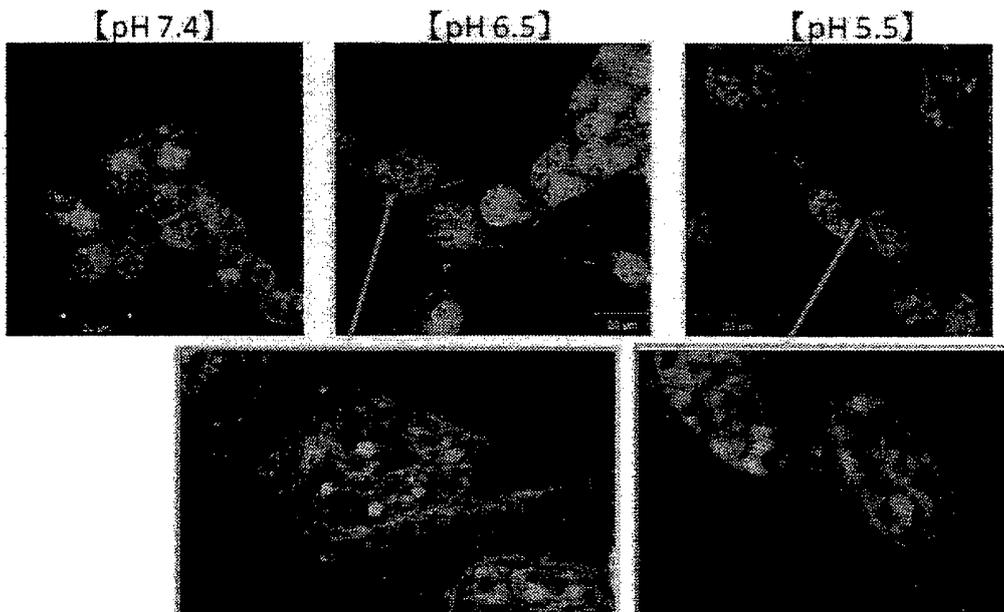


Fig. 8

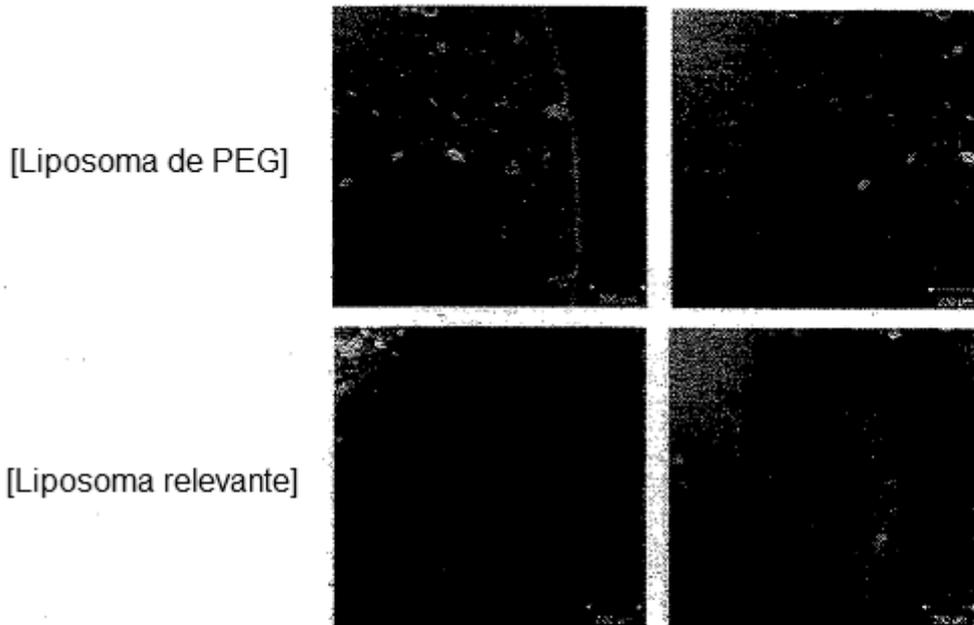


Fig. 9

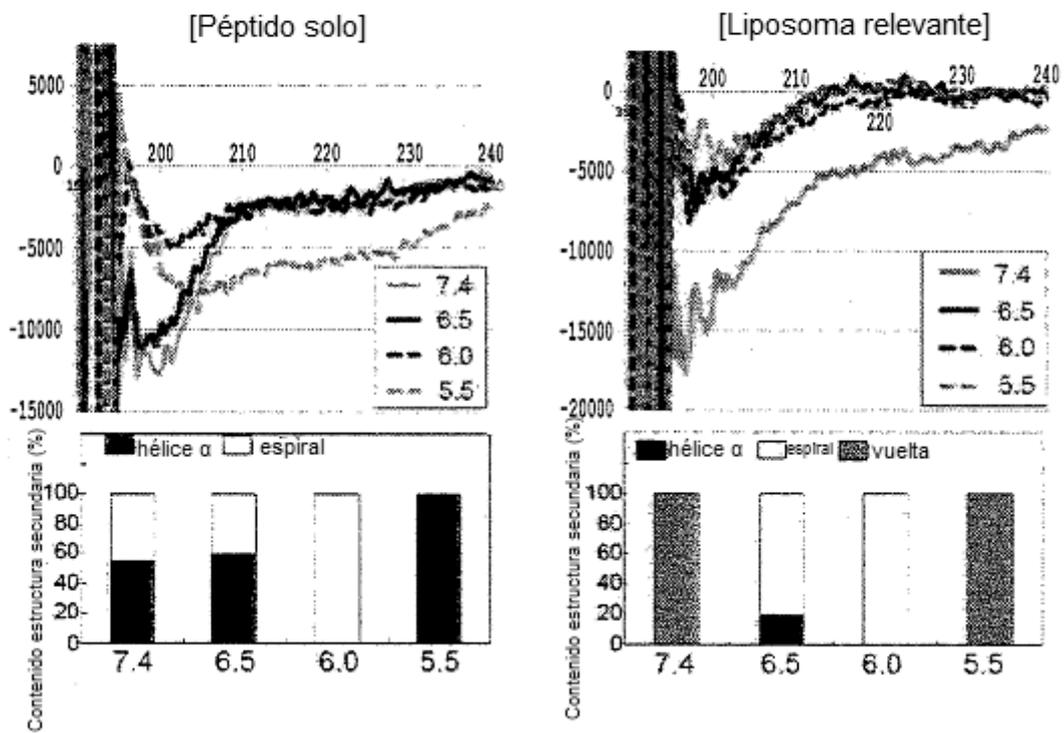


Fig. 10

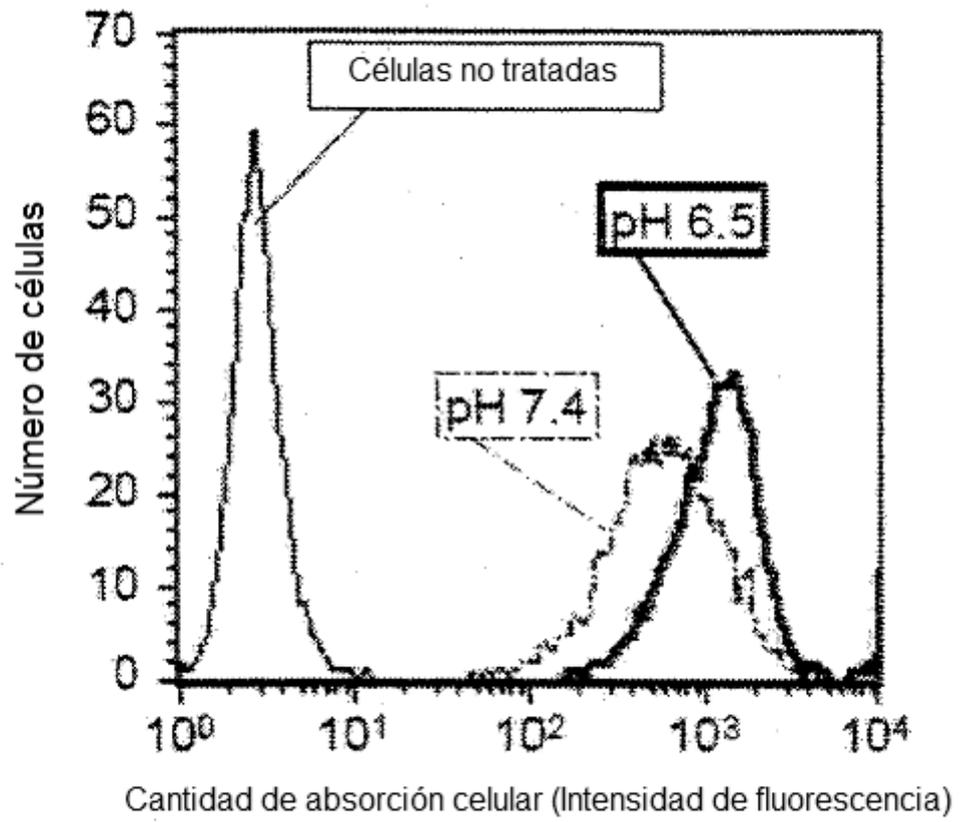


Fig. 11

