



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 351 484**

② Número de solicitud: 200901645

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 47/34** (2006.01)  
**A61K 9/51** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 9/107** (2006.01)

⑫ PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **24.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2011**

Fecha de la concesión: **29.09.2011**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **11.10.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**11.10.2011**

⑰ Titular/es:  
**Universidade de Santiago de Compostela**  
**Edificio CACTUS - Campus Sur**  
**15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Fernández-Megía, Eduardo;**  
**Sousa-Herves, Ana y**  
**Riguera Vega, Ricardo**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Micelas PIC dendríticas con proteínas bioactivas.**

㉑ Resumen:

Micelas PIC dendríticas con proteínas bioactivas. Se refiere a una micela polimérica de complejo poliónico (Polyion Complex, PIC) formada por interacción entre una proteína bioactiva y un copolímero de bloque dendrítico de carga opuesta. La tradicional baja estabilidad de micelas PIC con proteínas bioactivas frente a la fuerza iónica es compensada en la presente invención por la estabilidad que aporta el bloque dendrítico. El proceso global de preparación de estas micelas se ve facilitado por la sencillez de la síntesis de copolímeros de bloque dendríticos.



ES 2 351 484 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Micelas PIC dendríticas con proteínas bioactivas.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a una micela polimérica de complejo poliónico (Polyion Complex, PIC) dendrítica que incorpora una proteína bioactiva como uno de los bloques poliónicos que constituyen la micela. De forma más concreta, la presente invención se refiere a una micela PIC formada por interacción electrostática entre un copolímero de bloque dendrítico y una proteína bioactiva de carga opuesta. La micela puede ser estable en condiciones fisiológicas y tiene aplicaciones en nanomedicina, ingeniería médica y biológica, procesos de transporte de proteínas y fármacos, biotecnología, terapia y diagnóstico.

**Antecedentes de la invención**

15 El uso de proteínas bioactivas como agentes terapéuticos ha despertado un enorme interés en las últimas décadas debido a su elevada y selectiva actividad terapéutica. Así, por ejemplo, ciertas enfermedades relacionadas con la deficiencia de algunas enzimas lisosomales sólo pueden ser tratadas por la administración de enzimas exógenas [*Enzymes as Drugs* **1981**, p. 167, J. Wiley]. Entre el amplio número de proteínas terapéuticas, la insulina, una hormona peptídica, es una de las más ampliamente utilizadas, pero son importantes también las enzimas antitumorales (que actúan destruyendo determinadas secuencias de aminoácidos necesarias para el crecimiento de tumores), las enzimas digestivas (para el tratamiento de distintas insuficiencias del tracto digestivo) o las enzimas antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias.

25 Sin embargo, el uso de proteínas como agentes terapéuticos presenta como inconveniente un transporte lento e inefectivo a través de las barreras biológicas, además de un corto tiempo de vida media *in vivo* provocado por la degradación enzimática y la metabolización. La incorporación de proteínas bioactivas en sistemas de transporte (nanopartículas, liposomas, etc) presenta numerosas ventajas frente a las rutas de administración convencionales. Así, de esta forma, se ha conseguido aumentar la solubilidad y estabilidad de estos agentes terapéuticos frente a la degradación enzimática, mejorar la farmacocinética y, en algunos casos, controlar la liberación de la proteína terapéutica. Sin embargo, hasta el momento, la eficacia de estos sistemas no ha sido demostrada *in vivo* debido a diversos factores, como por ejemplo, en el caso de liposomas, su falta de estabilidad en medios biológicos [*J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2008**, 46, 1].

35 A la hora de diseñar un sistema adecuado para el transporte de proteínas bioactivas, uno de los problemas que se presentan es la pérdida de actividad. Así, debido a la tendencia de proteínas a la desnaturalización, las condiciones de preparación, purificación y almacenamiento están considerablemente limitadas. Además, el sistema de transporte debe ser biocompatible y proteger a la proteína frente a la opsonización por parte del sistema reticuloendotelial (SRE).

40 En este contexto, las micelas PIC (Polyion Complex) se presentan como un prometedor vehículo de transporte para proteínas bioactivas, ya que permiten la incorporación de las mismas mediante uniones no covalentes y en condiciones fisiológicas, preservando así su actividad. Además, estas micelas poseen una corona formada por un polímero hidrofílico y biocompatible (generalmente Polietilenglicol, PEG) que, una vez en el torrente sanguíneo, evita su reconocimiento y opsonización por parte del sistema inmunológico, asegurando prolongados tiempos de circulación [*Pharm. Res.* **2001**, 18, 1411].

45 Las micelas PIC [*Macromolecules* **1995**, 28, 5294. *Bioconjugate Chem.* **1995**, 6, 639] son un tipo de micelas poliméricas formadas por interacción electrostática entre polímeros o macromoléculas de carga opuesta, en las que una de las especies es un copolímero de bloque que incorpora un bloque hidrofílico y biocompatible. Son nanoestructuras con una muy baja polidispersión y que presentan un tamaño similar al de virus y lipoproteínas (10-200 nm), lo que facilita enormemente su entrada en las células. Otra ventaja que presentan las micelas PIC es su tendencia a acumularse pasivamente en tumores sólidos gracias al efecto EPR (Enhanced Permeability and Retention) [*Cancer Res.* **1986**, 46, 6387], lo que unido a sus prolongados tiempos de circulación en el torrente sanguíneo, hace que se acumulen selectivamente en los tejidos tumorales.

55 El primer ejemplo de micela PIC formada por interacción electrostática entre un polímero poliónico y una proteína fue descrito por Kataoka y colaboradores [*Macromolecules* **1998**, 31, 288]. El propio Kataoka resaltó, no sólo la preservación de la actividad enzimática de ciertas proteínas en el interior de una micela PIC, sino un aumento de la misma como resultado de las especiales propiedades del núcleo de la micela [*J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15306]. En este sentido, se ha propuesto que las micelas PIC que contienen proteínas pueden ser consideradas como nano-reactores con aplicaciones en los campos de la ingeniería médica y biológica.

65 Sin embargo, las micelas PIC formadas a partir de proteínas presentan como desventaja una muy baja estabilidad frente a la fuerza iónica, por lo que su aplicación en sistemas biológicos se ha visto considerablemente limitada. La estabilidad de micelas PIC frente a concentraciones salinas está directamente relacionada con la densidad de cargas de sus componentes. Así, se han descrito micelas PIC estables en medio fisiológico cuando los bloques constituyentes de las micelas presentan una gran densidad de carga, como es el caso de los poliaminoácidos. Sin embargo, la sustitución de un poliaminoácido por una proteína bioactiva provoca la disociación inmediata de las micelas PIC

resultantes en condiciones fisiológicas. Este hecho ha sido explicado en base a la baja densidad de carga de las proteínas. Así, mientras un poliaminoácido comercial como Poli-L-lisina presenta una carga positiva por cada ~200 Da, en una proteína como lisozima hay sólo una carga neta positiva cada ~2000 Da [*Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, DOI: 10.1002/anie.200900064].

5 Recientemente se ha puesto de manifiesto un gran aumento en la estabilidad de micelas PIC mediante el uso de dendrímeros [*Macromolecules* **2003**, 36, 1304] y copolímeros de bloque dendríticos [*Chem. Comm.* **2008**, 27, 3136], hecho que se ha atribuido principalmente a la mayor rigidez asociada a este tipo de estructuras. Las micelas PIC  
10 construidas a partir de copolímeros de bloque dendríticos presentan como ventaja adicional la facilidad con la que estos copolímeros se sintetizan y por lo tanto un consecuente abaratamiento e idoneidad desde el punto de vista industrial [*Chem. Comm.* **2008**, 27,3136].

De acuerdo con el estado de la técnica anterior conocido y establecido, hasta el momento no se han descrito micelas PIC formadas a partir de copolímeros de bloque dendríticos y proteínas bioactivas.

15 En la presente invención se demuestra que las micelas PIC que contienen copolímeros de bloque dendríticos son un sistema de transporte óptimo para proteínas bioactivas que resuelven los problemas actuales en el estado de la técnica.

## 20 Descripción de la invención

### Definiciones

Dendrímtero: Polímero altamente ramificado en el que las unidades de repetición se organizan en generaciones a partir de un punto focal. Su tamaño nanométrico y multivalencia hace que sean macromoléculas idóneas para participar  
25 en procesos de interacción receptor-ligando.

Copolímero de bloque: Un copolímero es un polímero compuesto por dos o más especies monoméricas. Los copolímeros formados por dos bloques de diferentes monómeros polimerizados se denominan copolímeros de bloque.

30 Proteínas bioactivas: Macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos que regulan o desempeñan algún proceso biológico. Las proteínas bioactivas se caracterizan por organizarse en cuatro niveles estructurales denominados estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura primaria es una descripción de los enlaces covalentes que unen los distintos aminoácidos de una cadena proteica. La estructura secundaria se refiere a disposiciones particularmente estables de los aminoácidos que dan lugar a patrones estructurales repetitivos. La estructura terciaria describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de la proteína. Por último, cuando una  
35 proteína posee dos o más subunidades polipeptídicas, su disposición en el espacio se denomina estructura cuaternaria. La bioactividad de una proteína depende de estos cuatro niveles de organización. Así, si se destruye la estructura tridimensional de una proteína (desnaturalización) se destruye también la función proteica.

40 Las proteínas bioactivas se caracterizan además por poseer una baja densidad de carga ya que sólo 5 de los 20 aminoácidos proteicos presentan grupos ionizables.

Punto isoelectrico (pI): El punto isoelectrico es el pH al que una sustancia anfótera presenta carga neta nula. Este concepto es particularmente importante en el caso de proteínas bioactivas ya que en el punto isoelectrico su solubilidad  
45 es prácticamente nula. Conociendo el punto isoelectrico se puede variar la carga neta de una proteína modificando el pH. Así, una proteína con un punto isoelectrico elevado como lisozima (pI~11), presentará carga neta positiva en disolución acuosa a valores de pH inferiores a 11, mientras que a pH 11 tendrá carga neta cero.

Micelas PIC: Son un tipo de micelas poliméricas que se caracterizan porque su formación se basa principalmente  
50 en interacciones electrostáticas entre polímeros o macromoléculas de carga opuesta. Tienen la particularidad de que la relación entre cargas es estequiométrica, por lo que su carga neta es nula. Fueron descritas por primera vez por Kataoka (1995), quien las denominó "Polyion Complex Micelles" (PIC Micelles).

Efecto EPR (Enhanced Permeability and Retention): Efecto por el cual las macromoléculas (por ejemplo micelas poliméricas) tienden a acumularse pasivamente en los tejidos tumorales. Este hecho ha sido aprovechado en el contexto  
55 de la terapia anticáncer con la intención de acumular selectivamente la toxicidad de fármacos en los tejidos cancerosos, minimizando su efecto en los sanos.

Actualmente se sabe que este efecto se debe principalmente a dos factores, (i) la hiperpermeabilidad de la vasculatura tumoral, que permite el trasvase de macromoléculas al tumor, (ii) un pobre drenaje linfático, que proporciona una elevada retención de macromoléculas en el tumor.

Con objeto de resolver los problemas existentes en el estado anterior de la técnica, la presente invención proporciona las siguientes mejoras.

65 La presente invención proporciona un tipo de micela PIC formada por interacción electrostática entre un copolímero de bloque dendrítico cargado y una proteína bioactiva.

## ES 2 351 484 B2

Una ventaja fundamental que ofrece la presente invención es solventar el problema de la inestabilidad de micelas PIC con proteínas bioactivas en condiciones salinas fisiológicas, mediante la incorporación de copolímeros de bloque dendríticos cargados. De este modo, la baja estabilidad frente a la fuerza iónica originada por la baja densidad de carga de las proteínas bioactivas es compensada por la mayor estabilidad aportada por el bloque dendrítico. La presente invención constituye el primer ejemplo de micela PIC dendrítica con proteínas bioactivas estable en condiciones fisiológicas. Este aumento de estabilidad se ve reflejado en la posibilidad de liofilizar estas micelas, facilitando enormemente el proceso de conservación y almacenamiento.

Otra ventaja fundamental que ofrece la presente invención es que, a diferencia de otros sistemas de transporte de proteínas, la propia proteína bioactiva es una de las partes constituyentes de la micela. De este modo, no es necesaria la preparación de un sistema en el que posteriormente se encapsule la proteína.

Otra ventaja fundamental de la presente invención es que la formación de las micelas PIC con proteínas bioactivas se realiza en medio acuoso, sin necesidad de formar enlaces covalentes, y bajo condiciones muy suaves, por lo que la actividad de la proteína no se ve afectada.

Por último, es de destacar que el proceso global de preparación de las micelas PIC con proteínas bioactivas de la presente invención es extremadamente sencillo, debido a la facilidad de síntesis de los copolímeros de bloque dendríticos, lo que representa un abaratamiento e idoneidad desde el punto de vista industrial.

La presente invención se refiere a una micela polimérica formada por interacción electrostática entre:

a) un copolímero de bloque dendrítico representado por la fórmula general [1];

$$P D q (c) [1]$$

donde P es un polímero, D es una estructura dendrítica, q representa el número de átomos cargados en la periferia de la estructura dendrítica que oscila entre 1 y 5000, c representa carga positiva o negativa, y

b) una proteína bioactiva A que presenta una carga neta  $c'$  opuesta a c.

La presente invención se refiere también a una micela polimérica caracterizada porque el polímero P definido en la reivindicación 1 se selecciona preferentemente entre polímeros lineales, copolímeros de bloque, copolímeros, terpolímeros, copolímeros de injerto, terpolímeros de injerto y copolímeros anfifílicos.

La presente invención hace también mención a una micela polimérica caracterizada porque el polímero P definido en la reivindicación 1 se selecciona preferentemente entre polímeros de origen natural o polímeros producidos por síntesis química o procesos biotecnológicos.

En una realización particular, el polímero P definido en la reivindicación 1 se selecciona preferentemente entre N-(2-Hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), Poli(estireno-co-ácido maleico/anhídrido) (SMA), Poli(divinil éter anhídrido maleico) (DIVEMA), Poli(N-vinil pirrolidona) (PVP), Poli(N-acrilil)morfolina (PACM), Polietilenglicol (PEG), Poli(óxido de propileno) (POP) y sus derivados.

En otra realización particular, el polímero P definido en la reivindicación 1 es Polietilenglicol (PEG).

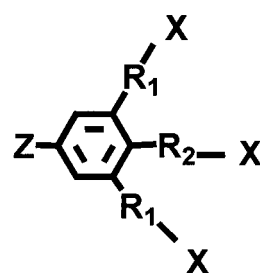
La presente invención hace también mención a una micela polimérica caracterizada porque la proteína bioactiva A definida en la reivindicación 1 se selecciona preferentemente entre anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, heteroproteínas, enzimas y hormonas.

En una realización particular, la proteína bioactiva A definida en la reivindicación 1 se selecciona preferentemente entre mioglobina, lisozima e insulina.

La presente invención se refiere también a una micela polimérica caracterizada porque la estructura dendrítica D definida en la reivindicación 1 es un dendrímero, dendrón o polímero dendrítico construidos a partir de una única o varias unidades de repetición.

## ES 2 351 484 B2

En una realización particular, la estructura dendrítica D definida en la reivindicación 1 es preferiblemente un dendrón construido a partir de la unidad de repetición representada por la fórmula general [2]



[2]

donde Z representa un enlace covalente entre la unidad de repetición y el polímero P o la unidad de repetición de la generación anterior,

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cadenas lineales o ramificadas que pueden ser idénticas o diferentes y que se caracterizan por contener grupos alquilo, alcoholes, tioles, azidas, nitrilos, aminas, imidas, iminas, cianatos, isocianatos, isotiocianatos, éteres, tioéteres, cetonas, aldehídos, ésteres, ácidos carboxílicos o grupos aromáticos;

X representa la unidad de repetición de la siguiente generación o alternativamente un grupo aniónico o catiónico.

En otra realización particular, la estructura dendrítica D definida en la reivindicación 1 es preferiblemente un dendrón construido a partir de la unidad de repetición representada por la fórmula general [2] donde

Z es preferentemente un enlace amida;

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son idénticos y se seleccionan entre cadenas de polietilenglicol u oligoetilenglicol, preferentemente son trietilenglicol;

cuando X es un grupo aniónico se selecciona preferentemente entre ácidos carboxílicos y sus derivados, sulfatos y sus derivados, sulfonatos y sus derivados, fosfatos y sus derivados, fosfonatos y sus derivados, ácidos arilfosfónicos y sus derivados, fenoles y sus derivados;

cuando X es un grupo de naturaleza catiónica se selecciona preferentemente entre aminas, poliaminas, oligoaminas, preferentemente son espermidinas, esperminas, anilinas, benzilaminas, imidazoles, morfolininas, sales de amonio, aminas primarias, secundarias, terciarias o grupos guanidinio.

Un aspecto concreto de la invención se refiere a una micela polimérica formada por interacción electrostática entre un copolímero de bloque PEG-dendrímico con grupos benzoato en su periferia y la proteína bioactiva lisozima, tal y como se esquematiza en la Figura 1: Formación de una micela PIC con lisozima.

Otro aspecto concreto de la invención se refiere a una micela polimérica formada por interacción electrostática entre un copolímero de bloque PEG-dendrímico con grupos benzoato en su periferia y la proteína bioactiva mioglobina.

En otra realización particular, la micela polimérica definida en la reivindicación 1 se forma por interacción electrostática entre un copolímero de bloque PEG-dendrímico con grupos anilina cargados positivamente en su periferia y la proteína bioactiva insulina.

La presente invención hace también referencia a la encapsulación de un fármaco, agente de diagnóstico, molécula o macromolécula de cualquier naturaleza en el interior de la micela polimérica definida en las reivindicaciones de 1 a 13.

Se contempla también en la presente invención el uso de una micela, definida en las reivindicaciones de 1 a 14, como vehículo para la administración terapéutica de una proteína bioactiva.

Asimismo, la presente invención contempla el uso de una micela, definida en las reivindicaciones de 1 a 14, como vehículo para la administración de un fármaco o agente de diagnóstico, molécula o macromolécula de cualquier naturaleza.

Finalmente, la presente invención hace también referencia a una composición farmacéutica que comprenda una micela polimérica definida en las reivindicaciones de 1 a 14 y un principio activo.

5 Tal y como se ha descrito en detalle, la presente invención proporciona un tipo de micela polimérica formada a partir de proteínas bioactivas, que puede ser estable en condiciones fisiológicas, y se prepara mediante un método rápido, sencillo y económico. El tipo de micela polimérica descrito puede ser empleado en nanomedicina, ingeniería médica y biológica, procesos de transporte de proteínas y fármacos, biotecnología, terapia y diagnóstico.

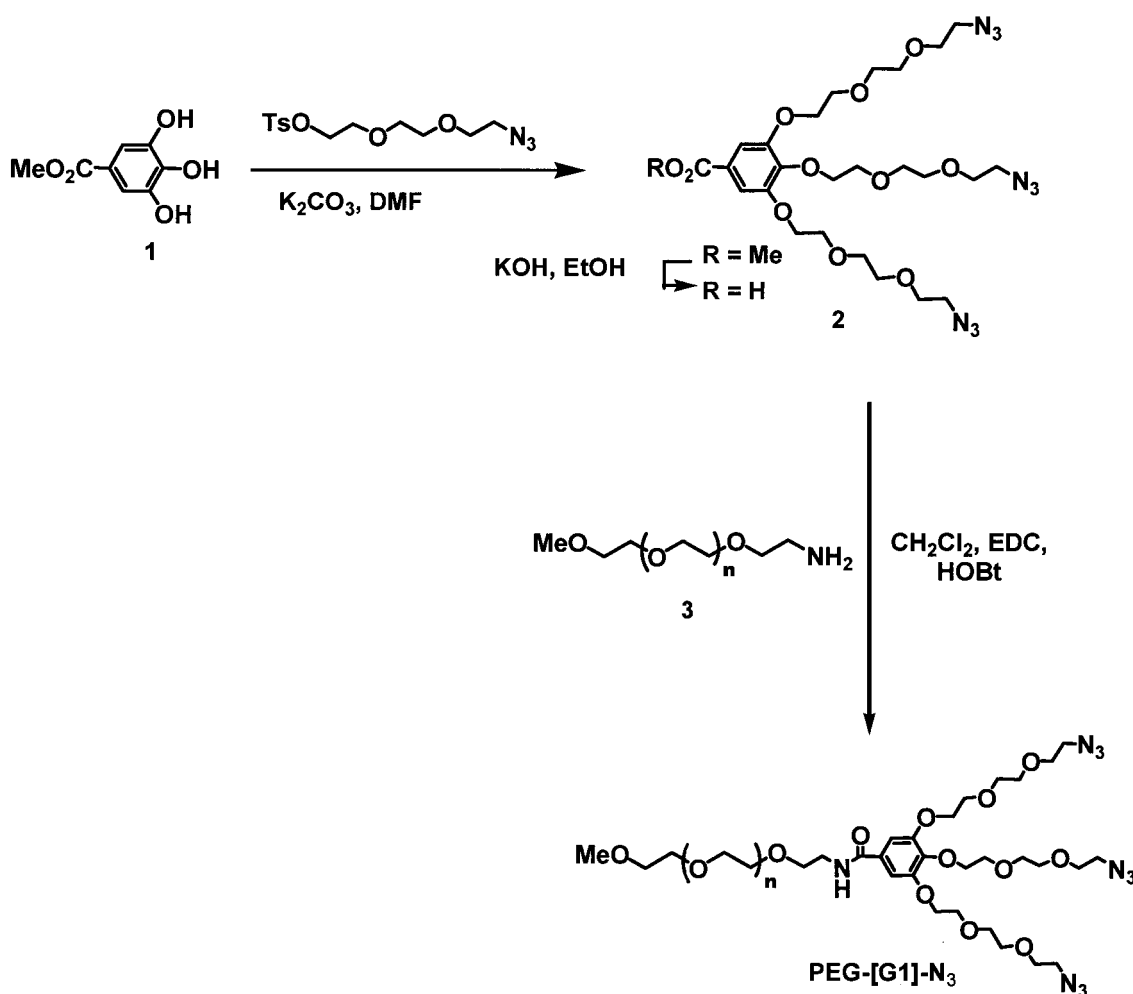
10 La preparación de las micelas con proteínas bioactivas de esta invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no deben ser considerados en modo alguno como una limitación del alcance de la misma:

Ejemplo 1

15 *Síntesis de los copolímeros de bloque*

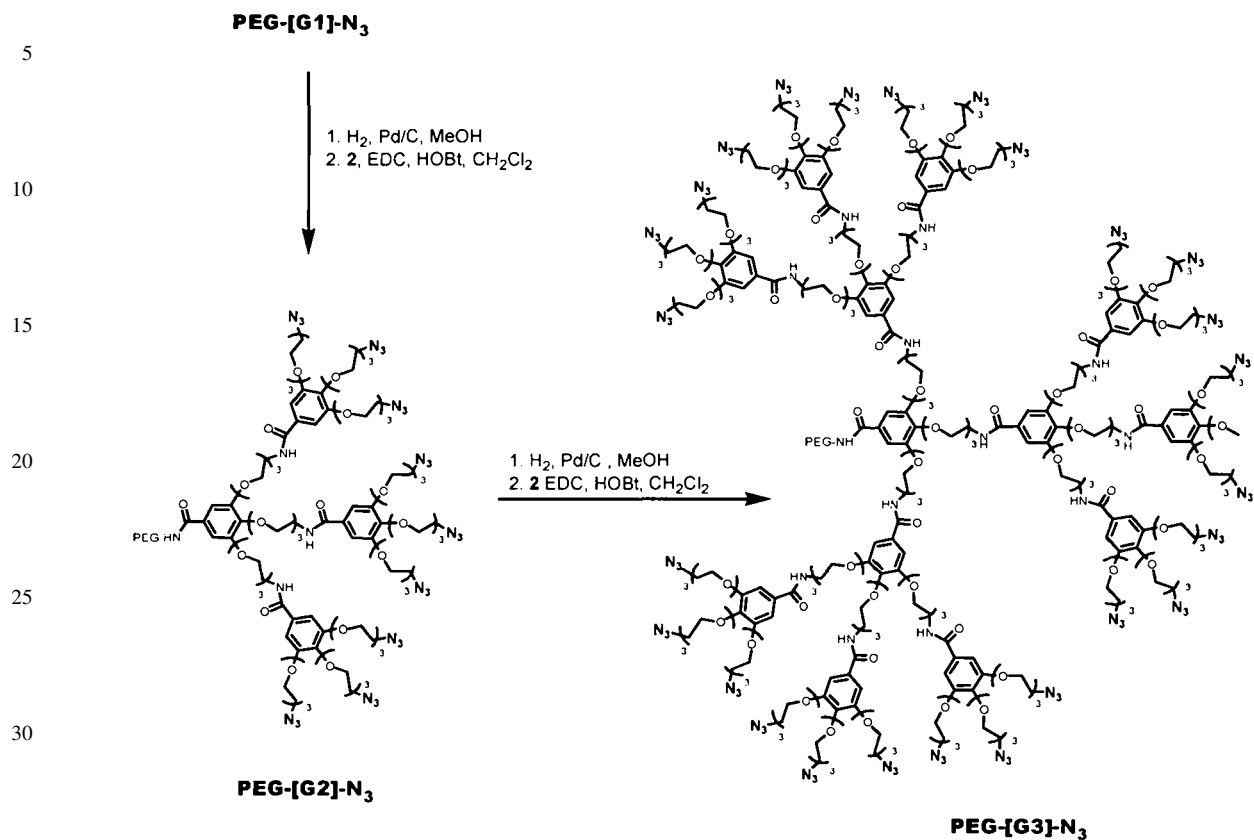
Se preparó la unidad dendrítica 2 partiendo de galato de metilo 1 según se indica en el Esquema 1. El copolímero de bloque de generación uno PEG-[G1]-N<sub>3</sub> se obtuvo por acoplamiento de la unidad dendrítica 2 con un PEG-NH<sub>2</sub> (3).

Esquema 1



65 Los copolímeros de bloque de generaciones superiores se obtienen por reducción de los grupos azida terminales de la generación anterior mediante hidrogenación catalítica y acoplamiento de las aminas resultantes con la unidad dendrítica 2 tal y como se muestra en el Esquema 2.

Esquema 2



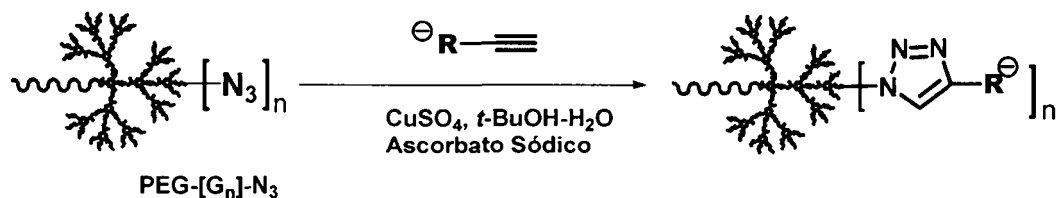
Ejemplo 2

Procedimiento general para la funcionalización aniónica de los copolímeros de bloque PEG-dendrímico, (PEG-[Gn]-N<sub>3</sub>)

La funcionalización de los copolímeros de bloque con grupos amónicos se llevó a cabo mediante una reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada por Cu (I). Para ello, es necesario que los ligandos amónicos que se desea introducir estén funcionalizados con grupos alquinos terminales.

Se disolvieron el copolímero de bloque PEG-dendrímico PEG-[Gn]-N<sub>3</sub> y el ligando aniónico en una mezcla *t*-BuOH-H<sub>2</sub>O (1:1). Posteriormente, se añadieron cantidades catalíticas de CuSO<sub>4</sub> y ascorbato sódico (Esquema 3).

Esquema 3



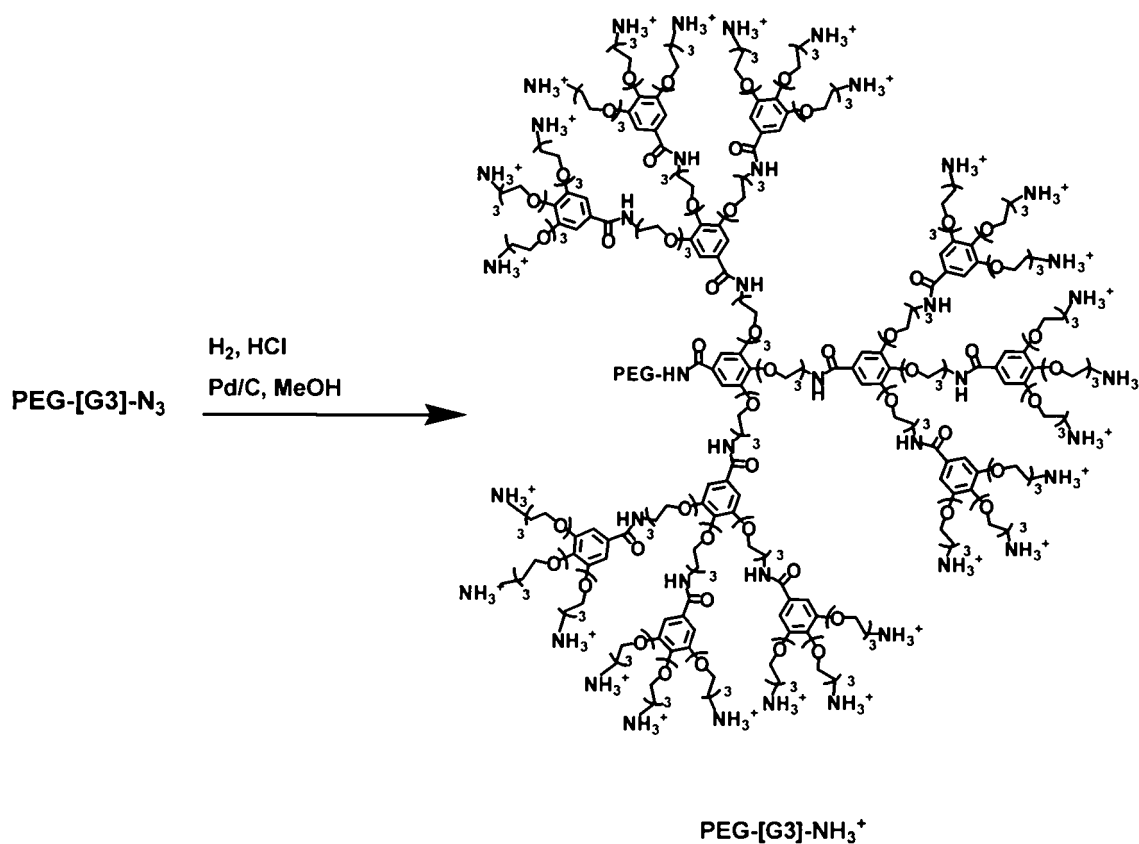
## Ejemplo 3

*Procedimiento general para la funcionalización catiónica de los copolímeros de bloque PEG-dendrímico, (PEG-[Gn]-N<sub>3</sub>)*

Para introducir grupos catiónicos en la periferia del copolímero de bloque pueden seguirse dos estrategias:

1. La reducción de las azidas terminales, por ejemplo mediante hidrogenación catalítica en medio ácido, conduce a sales de amonio de las correspondientes aminas primarias en la periferia del dendrímico. En el Esquema 4 se muestra la obtención de PEG-[G3]-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.
2. Una reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada por Cu (I), tal y como se ha descrito en el Esquema 3, pero utilizando ligandos catiónicos funcionalizados con alquinos terminales.

Esquema 4



## Ejemplo 4

*Preparación de micelas PIC a partir de un copolímero de bloque funcionalizado con grupos benzoato terminales y la proteína bioactiva lisozima (pI > 7)*

El copolímero de bloque PEG-[G3]-Benzoato, obtenido a partir de PEG-NH<sub>2</sub> (*M<sub>n</sub>* 5219) y siguiendo el procedimiento descrito en los ejemplos 1 y 2, se disolvió en un tampón fosfato (PBS) de pH 7.4. Separadamente se disolvió la proteína lisozima (producto comercial) en el mismo tampón PBS pH 7.4. Las dos disoluciones se filtraron y se mezclaron, en una relación estequiométrica de cargas, considerando para este fin sólo las cargas positivas de la proteína al pH de trabajo, para dar lugar a micelas PIC en una disolución final de pH 7.4. Tras 24 h bajo agitación magnética, la disolución resultante se filtró y se analizó por DLS (Dynamic Light Scattering). Las medidas de DLS confirmaron la existencia de micelas poliméricas con una muy baja polidispersión (0.1) y un tamaño de 120 nm, como se muestra en la Figura 2: Formación de una micela PIC con Lisozima e histograma de DLS. Este tamaño fue corroborado por Atomic Force Microscopy (AFM).

Para comprobar la estabilidad de las micelas PIC con lisozima en condiciones fisiológicas, se añadió NaCl a la disolución original de micelas hasta alcanzar una concentración salina de 150 mM y se calentó a 37°C. Posteriormente, la disolución de micelas se analizó mediante DLS, no observándose ningún cambio en el tamaño ni ningún otro signo de desestabilización.

## Ejemplo 5

*Preparación de micelas PIC a partir de un copolímero de bloque funcionalizado con grupos benzoato terminales y la proteína bioactiva mioglobina (pI ~ 7)*

5 El copolímero de bloque PEG-[G3]-Benzoato, obtenido a partir de PEG-NH<sub>2</sub> (M<sub>n</sub> 5219) y siguiendo el procedimiento descrito en los ejemplos 1 y 2, se disolvió en un tampón fosfato (PBS) de pH 9. Separadamente, se disolvió la mioglobina (producto comercial) en PBS pH 3. Las dos disoluciones se filtraron y se mezclaron, en una relación estequiométrica de cargas, considerando para este fin sólo las cargas positivas de la proteína al pH de trabajo, para  
10 dar lugar a micelas tipo PIC a un pH final 7.4. Tras 24 h bajo agitación magnética, la disolución resultante se filtró y se analizó por DLS, como se muestra en la Figura 3: Formación de una micela PIC con Mioglobina e histograma de DLS. Las medidas de DLS confirmaron la existencia de micelas poliméricas con una baja polidispersión (0.15) y un tamaño de unos 50 nm. Estos datos fueron corroborados por AFM.

## 15 Ejemplo 6

*Preparación de micelas PIC a partir de un copolímero de bloque funcionalizado con grupos anilina cargados positivamente y la proteína bioactiva insulina (pI < 7)*

20 El copolímero de bloque PEG-[G3]-Anilina-HCl, obtenido a partir de PEG-NH<sub>2</sub> (M<sub>n</sub> 5219) y siguiendo el procedimiento descrito en los ejemplos 1 y 3, se disolvió en un tampón fosfato (PBS) de pH 3. Separadamente, se disolvió la insulina (producto comercial) en PBS pH 12. Las dos disoluciones se filtraron y se mezclaron, en una relación estequiométrica de cargas, considerando para este fin sólo las cargas negativas de la proteína al pH de trabajo, para dar  
25 lugar a micelas tipo PIC a un pH final 7.4. Tras 24 h bajo agitación magnética, la disolución resultante se filtró y se analizó por DLS, como se muestra en la Figura 4: Formación de una micela PIC con Insulina e histograma de DLS. Las medidas de DLS confirmaron la existencia de micelas poliméricas con una baja polidispersión (0.15) y un tamaño de 45 nm. Estos datos fueron corroborados por AFM.

30 Para comprobar la estabilidad de las micelas PIC con insulina en condiciones fisiológicas, se añadió NaCl a la disolución original de micelas hasta alcanzar una concentración salina de 150 mM y se calentó a 37°C. Posteriormente, la disolución de micelas se analizó mediante DLS, no observándose ningún cambio en el tamaño ni ningún otro signo de desestabilización.

35

40

45

50

55

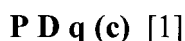
60

65

REIVINDICACIONES

1. Una micela polimérica formada por interacción electrostática entre:

a) un copolímero de bloque dendrítico representado por la fórmula general [1];



donde P es un polímero, D es una estructura dendrítica, q representa el número de átomos cargados en la periferia de la estructura dendrítica que oscila entre 1 y 5000, c representa carga positiva o negativa, y

b) una proteína bioactiva A que presenta una carga neta c' opuesta a c.

2. Una micela polimérica, según la reivindicación 1, donde el polímero P se selecciona preferentemente entre polímeros lineales, copolímeros de bloque, copolímeros, terpolímeros, copolímeros de injerto, terpolímeros de injerto y copolímeros anfifílicos.

3. Una micela polimérica, según la reivindicación 1 y 2, donde el polímero P se selecciona preferentemente entre polímeros de origen natural o polímeros producidos por síntesis química o procesos biotecnológicos.

4. Una micela polimérica, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, donde el polímero P se selecciona preferentemente entre N-(2-Hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), Poli(estireno-co-ácido maleico/anhídrido) (SMA), Poli(divinil éter anhídrido maleico) (DIYEMA), Poli(N-vinil pirrolidona) (PVP), Poli(N-acrilóil)morfolina (PACM), Polietilenglicol (PEG), Poli(óxido de propileno) (POP) y sus derivados.

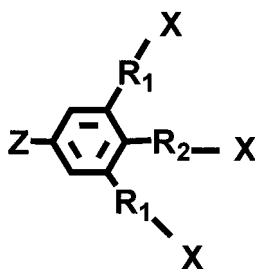
5. Una micela polimérica, según las reivindicaciones anteriores, donde el polímero P es preferentemente Polietilenglicol (PEG).

6. Una micela polimérica, según la reivindicación 1, donde la proteína bioactiva A se selecciona preferentemente entre anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, heteroproteínas, enzimas y hormonas.

7. Una micela polimérica, según las reivindicaciones 1 y 6, donde la proteína bioactiva A se selecciona preferentemente entre mioglobina, lisozima e insulina.

8. Una micela polimérica, según la reivindicación 1, donde la estructura dendrítica D es un dendrímero, dendrón o polímero dendrítico construidos a partir de la misma o diferentes unidades de repetición.

9. Una micela polimérica, según las reivindicaciones 1 y 8, donde D es preferiblemente un dendrón construido a partir de la unidad de repetición representada por la fórmula general [2]



[2]

donde Z representa un enlace covalente entre la unidad de repetición y el polímero P o la unidad de repetición de la generación anterior,

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cadenas lineales o ramificadas que pueden ser idénticas o diferentes y que se **caracterizan** por contener grupos alquilo, alcoholes, tioles, azidas, nitrilos, aminas, imidas, iminas, cianatos, isocianatos, isotiocianatos, éteres, tioéteres, cetonas, aldehídos, ásteres, ácidos carboxílicos o grupos aromáticos,

X representa la unidad de repetición de la siguiente generación o alternativamente un grupo aniónico o catiónico.

## ES 2 351 484 B2

10. Una micela polimérica, según la reivindicación 9, donde

Z es preferentemente un enlace amida;

5 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son idénticos y se seleccionan entre cadenas de polietilenglicol u oligoetilenglicol, preferentemente son trietilenglicol;

10 cuando X es un grupo aniónico se selecciona preferentemente entre ácidos carboxílicos y : sus derivados, sulfatos y sus derivados, sulfonatos y sus derivados, fosfatos y sus derivados, fosfonatos y sus derivados, ácidos arilfosfónicos y sus derivados, fenoles y sus derivados;

15 cuando X es un grupo de naturaleza catiónica se selecciona preferentemente entre aminas, poliaminas, oligoaminas, preferentemente son espermidinas, esperminas, anilinas, benzilaminas, imidazoles, morfolinas, sales de amonio, aminas primarias, secundarias, terciarias o grupos guanidinio.

11. Una micela polimérica, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque P es PEG, D contiene grupos benzoato en su periferia y A es lisozima.

20 12. Una micela polimérica, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque P es PEG, D contiene grupos benzoato en su periferia y A es mioglobina.

25 13. Una micela polimérica, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque P es PEG, D contiene grupos anilina cargados positivamente en su periferia y A es insulina.

14. Una micela polimérica, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque un fármaco, agente de diagnóstico, molécula o macromolécula de cualquier naturaleza está encapsulada en su interior.

30 15. Uso de una micela, según las reivindicaciones de 1 a 14, como vehículo para la administración terapéutica de una proteína bioactiva.

16. Uso de una micela, según las reivindicaciones de 1 a 14, como vehículo para la administración de un fármaco o agente de diagnóstico, molécula o macromolécula de cualquier naturaleza.

35 17. Composición farmacéutica que comprende una micela según las reivindicaciones de 1 a 14 y un principio activo.

40

45

50

55

60

65



Figura 1

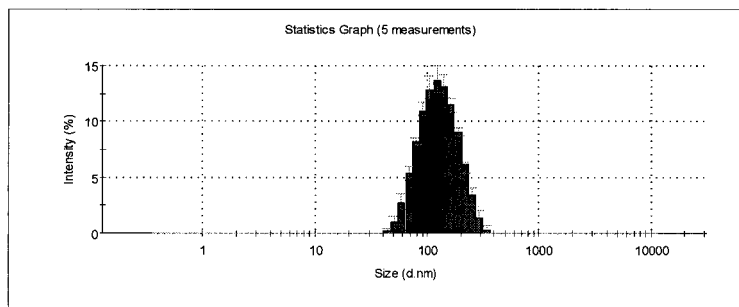
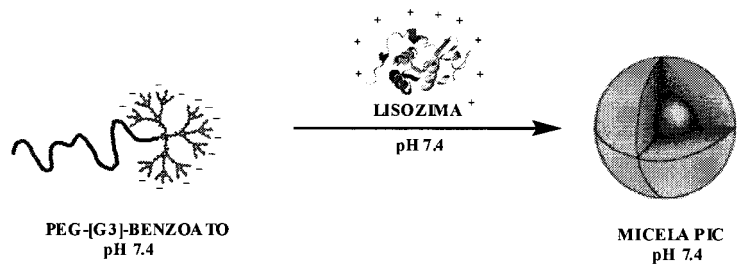


Figura 2

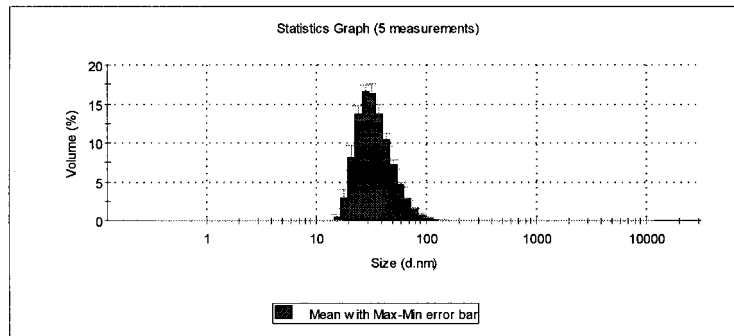
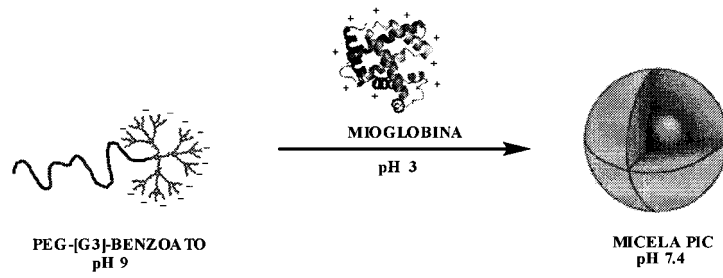


Figura 3

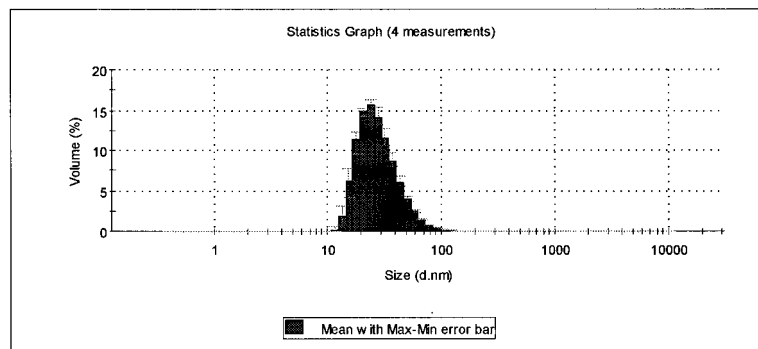
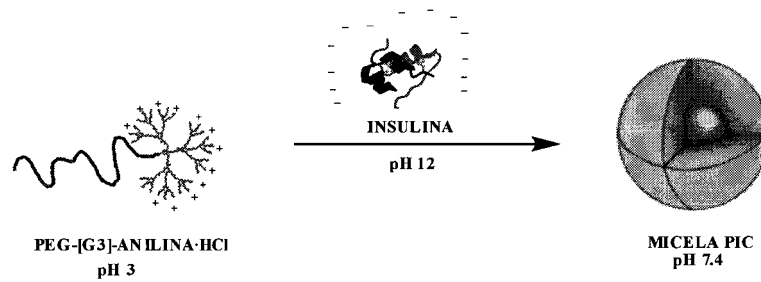


Figura 4



②① N.º solicitud:200901645

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.07.2009

②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	A. SOUSA-HERVES et al., "Synthesis and supramolecular assembly of clicked anionic dendritic polymers into polyion complex micelles", Chem. Commun., 2008, vol. 27, páginas 3136-3138	1-17
A	A. HARADA et al., "Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core: Preparation of narrowly-distributed micelles from lysozyme and poly(ethylene glycol)- poly(aspartic acid) block copolymer in aqueous medium", Macromolecules, 1998, vol. 31, nº 2, páginas 288-294	1-17
A	K. ITAKA et al., "Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol-poly(L-lysine)block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency", Biomaterials, 2003, vol. 24, páginas 4495-4506	1-17
A	W-D. J. et al., "Polyion complex micelles for photodynamic therapy: Incorporation of dendritic photosensitizer excitable at long wavelength relevant to improved tissue-penetrating property", J. Control. Release, 2006, vol. 113, páginas 73-79	1-17
A	M. LIU et al., "Water-soluble dendritic unimolecular micelles: Their potential as drug delivery agents", J. Control. Release, 2000, vol. 65, páginas 121-131	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
29.11.2010

Examinador  
E. Davila Muro

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K47/34**(2006.01)

**A61K9/51**(2006.01)

**A61K9/127**(2006.01)

**A61K9/107**(2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.11.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Chem. Commun., 2008, vol. 27, páginas 3136-3138	
D02	Macromolecules, 1998, vol. 31, nº 2, páginas 288-294	
D03	Biomaterials, 2003, vol. 24, páginas 4495-4506	
D04	J. Control. Release, 2006, vol. 113, páginas 73-79	
D05	J. Control. Release, 2000, vol.65, páginas 121-131	

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a una micela polimérica de complejo poliiónico (PIC) formada por interacción electrostática entre un copolímero en bloque dendrítico y una proteína bioactiva de carga opuesta. La invención también se refiere al uso de dicha micela como vehículo para la administración de la proteína bioactiva, de un fármaco o de un agente de diagnóstico.

El documento D01 divulga la preparación de micelas poliméricas esféricas de tipo PIC formadas por acoplamiento supramolecular entre copolímeros en bloque PEG y dendrímeros  $G_n$  con polímeros de carga opuesta, en concreto poli-L-lisina (PLL). En el documento se menciona la posibilidad de utilizar estas micelas como sistemas de administración de fármacos, proteínas, ácidos nucleicos y agentes de diagnóstico, pero sin dar ejemplos concretos (ver página 3138).

El documento D02 divulga la preparación de unas micelas de tipo PIC formadas a partir de copolímeros en bloque PEG-P(Asp) (polietilenglicol-polí-ácido aspártico) que encapsulan una proteína, en concreto lisozima, a través de interacción electrostática en medio acuoso. En este caso no se incluye una estructura dendrítica en la parte polimérica de las micelas (ver página 289).

El documento D03 divulga unas micelas de tipo PIC formadas a partir de copolímeros en bloque PEG-PLL (polietilenglicol-poli-L-lisina) que encapsulan un plásmido DNA para su aplicación en terapia génica. Tampoco en este caso se incluye una estructura dendrítica en la parte polimérica de las micelas (ver página 4496).

El documento D04 divulga unas micelas poliméricas de tipo PIC que incluyen una sustancia fotosensibilizante y que se emplean para terapia fotodinámica. Están formadas por interacción electrostática entre copolímeros en bloque PEG-PLL (polietilenglicol-poli-L-lisina) y un dendrímero aniónico ftalocianina (DPcZn) (ver páginas 74-75).

El documento D05 divulga unas micelas dendríticas unimoleculares formadas por acoplamiento de polietilenglicol mesilato y dendrímeros derivados de 4,4-bis(4'-hidroxifenil)pentanol. Se utilizan para solubilización de pireno en solución acuosa y para encapsular fármacos como indometacina (ver páginas 122, 124, 126-127). No se indica la inclusión de proteínas bioactivas en el sistema micelar.

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que recojan micelas que estén constituidas por un copolímero en bloque formado por un polímero y una estructura dendrítica, y que dicho copolímero esté asociado a una proteína bioactiva mediante interacción electrostática. Tampoco existen indicios que lleven al experto en la materia a concebir micelas poliméricas con estas características en concreto.

En consecuencia, la invención recogida en las reivindicaciones 1-17 de la solicitud es nueva, se considera que implica actividad inventiva y que tiene aplicación industrial (arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).