



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 400**

51 Int. Cl.:  
**B01J 13/00** (2006.01)  
**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01974445 .7**  
86 Fecha de presentación : **05.10.2001**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1322411**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

54 Título: **Suspensión coloidal de partículas submicrónicas de vectorización de principios activos y su modo de preparación.**

30 Prioridad: **06.10.2000 FR 00 12837**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

73 Titular/es: **FLAMEL TECHNOLOGIES**  
**Parc Club du Moulin a Vent**  
**33, avenue du Docteur Georges Levy**  
**69693 Venissieux Cédex, FR**

72 Inventor/es: **Bryson, Nathan y**  
**Soula, Gérard**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 280 400 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).

# ES 2 280 400 T3

## DESCRIPCIÓN

Suspensión coloidal de partículas submicrónicas de vectorización de principios activos y su modo de preparación.

### 5 Dominio técnico

El dominio de la presente invención es el de las partículas de vectorización (PV), útiles para la administración de principios activos (PA). Estos últimos son de preferencia medicamentos o nutrientes para la administración a un organismo animal o humano por vía oral o nasal, vaginal, ocular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral, parenteral, etc... Pero puede tratarse también de productos cosméticos o de productos fitosanitarios, tales como herbicidas, pesticidas, insecticidas, fungicidas, etc. En cuanto a la naturaleza química, los PA a los que se refiere la invención son más particularmente, pero no limitativamente, por ejemplo, proteínas, gluco-  
10 proteínas, péptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, oligonucleótidos, polinucleidos y moléculas orgánicas.

15 La presente invención se refiere, más precisamente, a suspensiones coloidales de partículas de vectorización, ventajosamente de tipo submicrónico, a base de poliaminoácidos (PAA).

La presente invención se refiere tanto a partículas desnudas en sí mismas, como a los sistemas de vectores de PA, constituidos por las partículas cargadas por el (o los) PA considerado(s).

20 La presente invención tiene igualmente relación con sólidos pulverulentos que comprenden estas PV.

La invención se refiere igualmente a procedimientos de preparación de dichas suspensiones coloidales de partículas, con o sin PA.

### 25 Técnica anterior

La encapsulación o la adsorción de PA en las PV tiene especialmente por objetivo modificar su duración de acción y/o encaminarlos hacia el lugar de tratamiento y/o aumentar la biodisponibilidad de dichos PA. Ya se han propuesto  
30 numerosas técnicas de encapsulación. Tales técnicas se dirigen, por una parte, a permitir el transporte del PA hasta su sitio de acción terapéutica, al tiempo que se protege contra las agresiones del organismo (hidrólisis, digestión enzimática, etc.) y, por otra parte, a controlar la liberación del PA sobre su sitio de acción, con el fin de mantener la cantidad disponible para el organismo al nivel deseado. Los PA afectados por estos cambios de transporte y de permanencia en el organismo son, por ejemplo, proteínas, pero pueden ser igualmente productos distintos, moléculas orgánicas de origen sintético o natural. La revisión de M. J. HUMPHREY (Delivery system for peptide Drugs, editada por S. DAVIS y L. ILLUM, Plenum Press, N.Y. 1986), menciona la problemática referente a la mejora de la biodisponibilidad de los PA y el interés de los sistemas de vectorización y de liberación controlada.

40 Las PV según la invención son del tipo de aquellas sobre las que se absorbe el PA.

Entre todos los materiales que pueden considerarse para formar las PV, los polímeros se utilizan cada vez más, debido a sus propiedades intrínsecas. Tratándose del pliego de condiciones que desea obtenerse para las PV, es particularmente exigente y comprende, especialmente, las especificaciones siguientes.

45 1 La primera especificación buscada para las PV sería que el polímero que constituye las PV sea biocompatible, pueda eliminarse (mediante excreción) y/o biodegradable y, aún mejor, que pueda metabolizarse para dar productos no tóxicos para el organismo. Además, convendría que la biodegradación en el organismo sea de una duración lo suficientemente corta.

50 2 Las PV tendrían la ventaja de poder formar, sin ayuda de disolvente orgánico y/o de tensioactivo, una suspensión acuosa estable.

3 Sería igualmente deseable que las PV tengan una talla lo suficientemente pequeña como para poder someterse, en suspensión en un líquido, a una filtración esterilizante por un filtro en el que el diámetro de los poros es inferior o  
55 igual a 0,2  $\mu\text{m}$ .

4 Es deseable que las PV y los sistemas PV-PA puedan obtenerse mediante un procedimiento no desnaturalizante para el PA.

60 5 Las PV deberían, ventajosamente, permitir controlar la velocidad de liberación del PA.

6 Otra especificación importante sería que los sistemas PV-PA puedan constituir medicamentos inyectables excelentes. Esta aptitud mejorada de la administración por inyección (por ejemplo intravenosa o intramuscular), "inyectabilidad" se caracteriza por:

65 (i) un volumen inyectado reducido (para una dosis terapéutica dada)

(ii) una viscosidad débil.

## ES 2 280 400 T3

Estas dos propiedades se satisfacen cuando la dosis terapéutica de PA está asociada a una cantidad mínima de PV. En otras palabras, las PV deben tener una fuerte tasa de carga en PA.

7 El coste propio a las PV en una preparación inyectable debe reducirse y de nuevo conviene que las PV tengan una fuerte tasa de carga en PA. En definitiva, la talla pequeña y fuerte tasa de carga son especificaciones principales buscadas para las PV.

8 Es igualmente ventajoso que el polímero, constitutivo de las PV, no induzca respuesta inmunitaria.

10 Las proposiciones técnicas anteriores, descritas a continuación, han intentado satisfacer el conjunto de estas especificaciones. A título de ilustración, se citarán las proposiciones anteriores (a) a (h):

(a) la patente US-A-5 286 495 se refiere a un procedimiento de encapsulación mediante vaporización de proteínas en fase acuosa, con ayuda de materiales que tienen cargas opuestas, es decir: alginato (cargado negativamente) y polilisina (cargada positivamente). Este procedimiento de fabricación permite producir partículas de talla superior a 35  $\mu\text{m}$ .

(b) Por otro lado, las técnicas de emulsión se utilizan comúnmente para preparar micropartículas cargadas de PA. Por ejemplo, las solicitudes de patentes WO 91/06286, WO 91/06287 y WO 89/08449 divulgan tales técnicas de emulsión en las que se recurre a disolventes orgánicos para solubilizar polímeros, por ejemplo de tipo poliláctico. Pero se encuentra que los disolventes pueden ser desnaturizantes, especialmente para los PA peptídicos o polipeptídicos.

(c) Igualmente, se conocen PV biocompatibles denominadas proteínoides, descritas desde 1970 por X. FOX y K. DOSE en "Molecular Evolution and the origin of Life", Ed. Marcel DEKKER Inc (1977). De este modo, la solicitud de patente WO 88/01213 propone un sistema a base de una mezcla de polipéptidos sintéticos, cuya solubilidad depende del pH. Para obtener las micropartículas matriciales según esta invención, solubilizan la mezcla de polipéptidos, y luego con un cambio de pH, provocan la precipitación de partículas proteínoides. Cuando la precipitación se realiza en presencia de un PA, éste está encapsulado en la partícula.

(d) Se mencionará igualmente, para recordar, la patente US 4 351 337 que se refiere a un dominio diferente del de la vectorización de PA propio a la invención. Esta patente divulga implantes másicos fijados y localizados en ubicaciones muy precisas del organismo. Estos implantes son tubos o cápsulas huecas de talla microscópica (160  $\mu\text{m}$  y de longitud igual a 2.000  $\mu\text{m}$ ), constituidos por copolímeros de copoli(aminoácidos) (por ejemplo poli(ácido glutámico - leucina) o poli(glutamato de bencilo - leucina)) obtenidos mediante copolimerización de monómeros de N-carboxianhídridos de aminoácidos (NCA). La inclusión de un PA se realiza mediante una técnica de evaporación de disolvente de una mezcla de polímero y de PA. La patente US 4 450 150 pertenece a la misma familia que la patente US 4 351 337 estudiada anteriormente en el presente documento y tiene esencialmente el mismo objeto. Los PAA constitutivos son poli(ácido glutámico - glutamato de etilo).

(e) La solicitud EP 0 734 720 tiene por objeto partículas de poliaminoácidos útiles para la vectorización de PA. Estas partículas tienen una talla comprendida entre 10 y 500 nm, de preferencia entre 30 y 400 nm. Las partículas según el documento EP 0 734 720 se forman espontáneamente mediante la puesta en contacto de PAA con una disolución acuosa. Los PAA comprenden monómeros de aminoácidos neutros e hidrófobos AANO (Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe) y monómeros ionizables e hidrófilos AAI (Glu, Asp). Estos PAA se preparan mediante copolimerización de NCA de precursores de AAI (por ejemplo Glu-OMe) y de NCA de AAO (por ejemplo Leu) en disolución en una mezcla de dioxano/tolueno. El copoli(Glu-OMe)(Leu) obtenido en disolución se recupera mediante precipitación en agua, filtración y secado. Este copolímero se somete entonces a una hidrólisis ácida incorporándolo en ácido trifluoroacético (TFA), en el que se disuelve. Un copolímero de (Glu-O-Na)(Leu) se recupera tras neutralización, diálisis, filtración y liofilización.

El coPAA se dispersa en una disolución acuosa de NaCl y se forma espontáneamente una suspensión de nanopartículas. Desde que se ponen en contacto estas PV en suspensión acuosa con un PA, éste último se asocia espontáneamente con las PV. Estos últimos presentan un núcleo hidrófobo formado por aminoácidos hidrófobos y unas colas exteriores hidrófilas a base de aminoácidos hidrófilos.

Debe observarse que las partículas de vectorización según el documento EP 0 734 720 comprenden aminoácidos ionizables (Glu) portadores de una carga eléctrica estabilizante negativa, que permite evitar la floculación y la agregación de las partículas de PV.

(f) El documento FR-A-2 746 035 se refiere a micropartículas de gel compuestas, fisicoquímicamente estables, integradas y susceptibles de utilizarse como vectores de principios activos. Estas micropartículas están constituidas por aceite (I), fase acuosa (II) y al menos un copoliaminoácido (III) lineal, no reticulado, sintético y que comprende al menos dos tipos diferentes de comonómeros de aminoácidos AAI hidrófilos y AAO hidrófobos. Los AAI pueden ser: Glu, Asp, Or, Arg, Lys, Asn, His y sus asociaciones. Los comonómeros AAO pueden ser: Leu, Tyr, Phe, Val, Cys, Ile y sus asociaciones. El documento FR-A-2 746 035 describe especialmente en la página 27, líneas 8 a 18, una suspensión coloidal acuosa de poliaminoácidos, por ejemplo polileucina/coglutamato de sodio.

## ES 2 280 400 T3

Pero el documento FR-A-2 746 035 no divulga el uso de los copolímeros solos como un sistema farmacéutico de nanopartículas de vectorización de PA.

5 Los AAI del documento FR-A-2 746 035 no son aminoácidos hidrófilos neutros seleccionados del grupo que comprende:

- ✓ los ácidos aminados neutros neutrales siguientes: serina, treonina, hidroxiprolina, glutamina;
- ✓ los ácidos aminados neutros, raros o sintéticos, siguientes: S-óxido de metionina, O-glucosidil-serina;
- ✓ los derivados de los ácidos aminados neutros: N-hidroxietil-glutamina, N-hidroxipropil-asparagina.

Todas estas proposiciones técnicas anteriores descritas anteriormente:

- 15 ○ o bien satisfacen incompletamente las especificaciones del pliego de condiciones indicado anteriormente, y, en particular, una aptitud para la esterilización mediante filtración, una alta velocidad de degradación, una adaptabilidad a las restricciones de la administración de medicamentos mediante inyección, un bajo coste y una fuerte tasa de carga en PA;
- 20 ○ o bien podrían sustituirse por nuevas soluciones técnicas susceptibles de proporcionar nuevas ventajas (referencia anterior: documento EP 0 734 720).

### Breve descripción de la invención

25 En esta situación, un objetivo esencial es el de poder proporcionar PV novedosas que formen espontáneamente, y sin ayuda de tensioactivos o de disolventes orgánicos, suspensiones acuosas estables de PV.

30 Otro objetivo esencial de la presente invención es proporcionar PV novedosas en suspensión acuosa coloidal estable o en forma pulverulenta y a base de poli(aminoácidos) (PAA), debiendo satisfacer estas PV novedosas lo mejor posible las especificaciones 1 a 8 del pliego de condiciones mencionado anteriormente.

Otro objetivo esencial de la invención es perfeccionar las partículas divulgadas en la solicitud PCT WO 96/29991.

35 Otro objetivo esencial de la invención es proporcionar una suspensión novedosa de PV en la que se controlan perfectamente las características, especialmente en cuanto a la tasa de carga en PA y en cuanto al control de la cinética de liberación del PA.

40 Otro objetivo esencial de la invención es proporcionar suspensiones medicamentosas inyectables. Las especificaciones requeridas para tales suspensiones son un bajo volumen de inyección y una baja viscosidad. Es importante que la masa de partículas coloidales por dosis de inyección sea lo más baja posible y ello sin limitar la cantidad del principio activo PA transportado por estas partículas, con el fin de no afectar a la eficacia terapéutica.

45 Otro objetivo esencial de la invención es proporcionar una suspensión coloidal acuosa o un sólido pulverulento que comprende partículas de vectorización de principios activos que satisfacen las especificaciones mencionadas anteriormente en el presente documento y que constituye una forma galénica apropiada y conveniente para una administración, por ejemplo oral, a un ser humano o a un animal.

Otro objetivo esencial de la invención es proporcionar una suspensión coloidal que comprende partículas de vectorización de principios activos filtrables sobre filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  con fines de esterilización.

50 Otro objetivo esencial de la invención es proponer un procedimiento de preparación de partículas (secas o en suspensión en un líquido) de PAA útiles, especialmente como vectores de principios activos, debiendo dicho procedimiento ser más fácil de poner en práctica, no desnaturalizante para los principios activos y debiendo además permitir siempre un control fino de la granulometría media de las partículas obtenidas.

55 Otro objetivo esencial de la invención es el uso de las partículas mencionadas anteriormente en suspensión acuosa o en forma sólida para la preparación:

- 60 ● de medicamentos (por ejemplo vacunas), en particular para la administración especialmente oral, nasal, vaginal, ocular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o parenteral, pudiendo ser los principios activos de estos medicamentos especialmente proteínas, glucoproteínas, péptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, oligonucleótidos y polinucleótidos;
- 65 ● y/o de nutrientes;
- y/o de productos cosméticos o fitosanitarios;
- y/o de moléculas orgánicas medicamentosas.

## ES 2 280 400 T3

Otro objetivo esencial de la presente invención es proporcionar suspensiones de PV submicrónicas a base de PAA y susceptibles de servir como vector de un PA, en particular medicamentosas para la administración de dicho PA a un organismo humano o animal, o incluso de un PA nutricional, fitosanitario o cosmético.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un medicamento, del tipo de sistema a liberación prolongada de principios activos, que sea sencillo y económico de producir y que sea además biocompatible y apto para garantizar un nivel muy alto de biodisponibilidad del PA.

10 Otro objetivo esencial de la invención es proporcionar un sistema de vectorización de vacuna, que sea intrínsecamente no inmunogénico y en combinación con uno o varios antígenos.

15 Los objetivos referentes a los productos (entre otros) se logran por la presente invención que se refiere, en primer lugar, a una suspensión coloidal estable de partículas estructuradas submicrónicas susceptibles de utilizarse especialmente para la vectorización de principio(s) activo(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretos):

20 ○ a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;

25 ○ aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto a al menos un PA y liberar el mismo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;

○ y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);

caracterizado porque

30 ✓ porque los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI son aminoácidos neutros hidrófilos AANI a excepción de la asparagina;

35 ✓ porque los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANI;

✓ y porque los ácidos aminados recurrentes de cada tipo AANI y AANO son idénticos o diferentes entre sí.

### 35 Descripción detallada de la invención

Uno de los fundamentos inventivos de estas partículas de vectorización PV novedosas, en suspensión acuosa coloidal estable o en estado de sólido pulverulento, se refiere a la selección original de un grupo de polímeros y de una metodología original que permiten obtener partículas de talla submicrónica, que forman una suspensión coloidal acuosa estable en ausencia de tensioactivos o de disolventes.

45 Otro fundamento inventivo de estas partículas de vectorización PV novedosas, en suspensión acuosa coloidal estable o en estado de sólido pulverulento, se refiere a la selección original de dos aminoácidos neutros a título de monómeros recurrentes hidrófilos AANI e hidrófobos AANO.

Ahora bien, al contrario de lo que podría temer el experto en la materia, el hecho de no tener aminoácidos hidrófilos ionizables AAI y por tanto tampoco cargas negativas, tal como en las partículas según el documento WO 96/29991, no afectó a la estabilidad. De hecho, al contrario de lo esperado, la suspensión coloidal según la presente invención no flocula. Las partículas a base de poli(AANI/AANO) no se autoagregan.

50 Además, no era en absoluto evidente en un principio que estas partículas de poli(AANI/AANO) pudieran asociarse espontáneamente con principios activos PA y volver a soltar estos PA sobre los sitios de acción terapéutica.

55 La estructura de los polímeros PAA y la naturaleza de los ácidos aminados neutros se seleccionan de tal manera que:

• las cadenas de polímeros se estructuran espontáneamente en forma de partículas (PV) de talla pequeña;

60 • las partículas forman una suspensión coloidal estable en agua y en medio fisiológico;

• las PV se asocian con proteínas u otros PA en medio acuoso, mediante un mecanismo espontáneo y no desnaturante para la proteína;

65 • las PV liberan los PA en medio fisiológico y, más precisamente, *in vivo*; la cinética de liberación es función de la naturaleza del polímero PAA precursor de las PV.

Así, influyendo sobre la estructura particular del PAA, pueden controlarse los fenómenos de asociación y de liberación del PA en el plano cinético y cuantitativo.

## ES 2 280 400 T3

Es mérito del solicitante haber seleccionado, a título de material constitutivo de las PV, una composición particular de poliaminoácidos neutros que son anfífilos y que, por tanto, presentan propiedades de las PV en PAA, es decir:

- 5           • posibilidad de formar espontáneamente suspensiones coloidales de PV compatibles con el pH de los medios fisiológicos encontrados en las aplicaciones terapéuticas pretendidas;
- asociación espontánea de los PA con PV en ausencia de otro agente distinto al agua que sirve como disolvente y que, en el caso de las proteínas, no es desnaturizante;
- 10          • posibilidad de liberar el PA del complejo de asociación PA-PV, en condiciones fisiológicas, con perfiles farmacocinético y farmacodinámico que dejan prever usos interesantes en el dominio terapéutico (vectorización de PA);
- 15          • filtrabilidad con un umbral de corte inferior o igual a  $0,2 \mu\text{m}$  con fines de esterilización;
- biodegradabilidad mejorada;
- 20          • aptitud para la inyección optimizada.

Estos PAA pueden ser del tipo ordenado, secuencial alternado (bloques) o del tipo desordenado, secuencial aleatorio (estadísticos).

Así, según una primera forma de realización de las PV según la invención, los PAA constitutivos son del tipo “bloque” y se caracterizan por una razón molar  $\text{AANO}/(\text{AANI}+\text{AANO})$  tal que:

- $\text{AANO}/(\text{AANI}+\text{AANO}) \geq 6\%$ ,
- $10\% \leq \text{AANO}/(\text{AANO} + \text{AANI}) \leq 70\%$ ,
- 30          • de preferencia,  $20\% \text{ AANO}/(\text{AANI} + \text{AANO}) \leq 60\%$ ,
- y aún más de preferencia,  $35\% \leq \text{AANO}/(\text{AANI} + \text{AANO}) \leq 50\%$ .

35          Ventajosamente, la longitud absoluta de cada bloque de AANO, expresada en número de AANO, es tal que:

- $\text{AANO} \geq 5$ ,
- de preferencia,  $\text{AANO} \geq 10$ ,
- 40          • y, aún más de preferencia,  $\text{AANO} \geq 20$ .

Según una segunda forma de realización de las PV según la invención, los PAA constitutivos son del tipo “estadístico”, es decir preparados mediante copolimerización simultánea de monómeros de AANI y AANO, y la razón molar  $\text{AANO}/(\text{AANO} + \text{AANI})$  es tal que:

- $\text{AANO}/(\text{AANO} + \text{AANI}) \geq 10\%$ ,
- y, de preferencia,  $\text{AANO}/(\text{AANO} + \text{AANI}) \geq 20\%$ ,
- 50          • y, aún más de preferencia,  $30\% \leq \text{AANO}/(\text{AANI} + \text{AANO}) \leq 70\%$ .

Ventajosamente, la masa molar  $M_w$  de estos PAA estadísticos es tal que:

- 55          •  $M_w \geq 2.000 \text{ g/mol}$ ,
- de preferencia,  $M_w \geq 5.500 \text{ g/mol}$ ,
- 60          • y aún más de preferencia,  $5.500 \text{ g/mol} \leq M_w \leq 200.000 \text{ g/mol}$ .

Según una característica preferida de la invención, los PAA en bloque o estadísticos constitutivos de partículas tienen grados de polimerización GP comprendidos entre 30 y 600, de preferencia entre 50 y 200 y, aún más de preferencia, entre 60 y 150.

65          Ventajosamente, los PAA constitutivos de las partículas PV son PAA de “dibloque”.

## ES 2 280 400 T3

De preferencia, el (los) AANI hidrófilo(s) se selecciona(n) del grupo que comprende:

- 5 ✓ los ácidos aminados neutros naturales, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: serina, treonina, hidroxiprolina, glutamina;
- ✓ los ácidos aminados neutros, raros o sintéticos siguientes, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: S-óxido de metionina, O-glucosidil-serina;
- 10 ✓ los derivados de los ácidos aminados neutros, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: N-hidroxietilglutamina, N-hidroxipropilasparagina, N-hidroxietil-asparagina, N-hidroxipropilglutamina.

Ventajosamente, el (los) AANO hidrófobo(s) se selecciona(n) del grupo que comprende:

- 15 ◆ los ácidos aminados neutros naturales, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe;
- ◆ los ácidos aminados neutros, raros o sintéticos, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: norleucina, norvalina;
- 20 ◆ los derivados de los ácidos aminados polares, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: glutamato de metilo, glutamato de etilo, aspartato de bencilo, N-acetil-lisina.

Según una característica ventajosa, las partículas de vectorización (PV) de la suspensión tienen una talla media comprendida entre 0,01 y 0,5  $\mu\text{m}$ , de preferencia entre 0,01 y 0,2  $\mu\text{m}$ .

25 La suspensión tiene igualmente como característica preferida el ser acuosa y estable.

La presente invención se refiere no solamente a suspensiones de partículas desnudas, tal como se definieron anteriormente en el presente documento, sino igualmente a partículas que comprenden al menos un principio activo PA. De preferencia, la suspensión según la invención es acuosa y estable. Estas partículas, cargadas o no con PA, están ventajosamente en forma dispersada en un líquido (suspensión), de preferencia acuoso, pero pueden igualmente estar en estado sólido pulverulento, obtenido a partir de la suspensión de PV tal como se definió anteriormente en el presente documento.

35 A partir de ello se deduce que la invención se refiere, además de a una suspensión coloidal (de preferencia acuosa) de PV, a un sólido pulverulento que comprende PV y obtenido a partir de la suspensión según la invención.

Otro objeto esencial de la invención se refiere a la preparación:

- 40 ◆ de las partículas seleccionadas tal como se describieron anteriormente
- ◆ y de otras partículas seleccionadas que están estructuradas, son submicrónicas y susceptibles de utilizarse, especialmente para la vectorización de principio(s) activo(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretas):
  - 45 ○ a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;
  - 50 ○ aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto, a al menos un PA y liberar el mismo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;
  - y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);

55 en la que:

- ✓ los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI están al menos en parte constituidos por asparagina;
- 60 ✓ y los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANO idénticos o diferentes entre sí;

pudiendo estas partículas estar tanto en forma de suspensión coloidal como en forma de sólido pulverulento obtenido a partir de una suspensión coloidal estable de partículas.

65 El procedimiento de preparación considerado consiste esencialmente en sintetizar PAA precursores y transformarlos en partículas estructuradas.

## ES 2 280 400 T3

Más precisamente, se trata en primer lugar de un procedimiento de preparación de partículas estructuradas submicrónicas susceptibles de utilizarse, especialmente para la vectorización de principio(s) activo(s), siendo estas partículas disposiciones supramoleculares discretas:

- 5           ○ a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;
- 10           ○ aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto a al menos un PA y liberarlo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;
- y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s).

Este procedimiento se caracteriza porque:

15           1) se realiza una copolimerización de monómeros formados por anhídridos de N-carboxiaminoácidos (NCA) de al menos dos tipos diferentes:

- 20           ◆ por una parte, monómeros NCA de partida que comprenden NCA-Glu-OR y/o NCA-Asp-OR, y/o NCA-AANI,
- ◆ y por otra parte, NCA-AANO, en presencia:
  - 25           - de al menos un disolvente polar no aromático, de preferencia seleccionado del grupo que comprende: N-metilpirrolidona (NMP), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMAc), pirrolidona; prefiriéndose más particularmente NMP;
  - 30           - y eventualmente de al menos un co-disolvente seleccionado entre los disolventes apróticos (de preferencia dioxano-1,4) y/o los disolventes próticos (de preferencia pirrolidona) y/o agua y/o alcoholes, prefiriéndose particularmente metanol;

30           2) en el caso en el que los monómeros NCA de partida son NCA-Glu-OR y/o NCA-Asp-OR (R= alquilo), se pone en práctica una aminólisis que consiste en poner en contacto el copolímero obtenido en la etapa 1 con una fase acuosa que comprende al menos una amina y que permite la transformación de Glu-OR en Gln y de Asp-OR en Asn;

35           3) eventualmente se dializa el medio de reacción para purificar la suspensión acuosa de partículas estructuradas;

4) eventualmente se concentra esta suspensión de la etapa 3;

5) se elimina el medio líquido para recoger el sólido pulverulento que comprende las partículas.

40           La primera etapa del procedimiento se inspira en técnicas conocidas de polimerización de anhídridos de N-carboxiaminoácidos (NCA), descritas, por ejemplo, en el artículo "Biopolymers, 15, 1869 (1976)" y en la obra de H. R. KRICHELDORF "*α*-Aminoacid-N-carboxy Anhydride and Related Heterocycles" Springer Verlag (1987).

45           La puesta en práctica de disolventes de copolimerización apróticos no aromáticos polares, seleccionados juiciosamente, evitando cualquier precipitación y el hecho de recurrir a una hidrólisis ácida en presencia de agua y de disolvente orgánico polar no aromático, permite obtener partículas estructuradas, discretas y submicrónicas con una fuerte capacidad de carga de PA, y que forman una suspensión coloidal, estable en medio acuoso. Estas partículas no son para nada comparables a un precipitado aglomerado macroscópico de la clase del evocado anteriormente en el presente documento con respecto a la proposición anterior (d).

50           Según una variante, a la salida de la etapa 1, se precipita (de preferencia en agua) el copolímero poli(AA-NO)(AANI) obtenido y se recoge este precipitado. Esta variante corresponde a un modo discontinuo de preparación de partículas, en el que se aísla el copolímero poli(AANO)(AANI) en forma de precipitado que forma un producto intermedio estable. Este precipitado, por ejemplo, puede filtrarse, lavarse y secarse.

55           De manera aún más preferida, los NCA-pAAI son NCA de ácido glutámico o aspártico O-alquilado, por ejemplo NCA-Glu-O-Me, NCA-Glu-O-Et o NCA-Glu-O-Bz (Me = metilo - Et = etilo - Bz = bencilo).

60           De manera conocida, la copolimerización se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 20 y 120°C, a presión atmosférica y en presencia de un iniciador aminado, por ejemplo: NH<sub>3</sub>.

65           Otros parámetros experimentales, tales como la concentración de NCA y/o polímero en el disolvente polar no aromático (de preferencia el NMP), y/o la concentración o la naturaleza del codisolvente prótico, durante la síntesis, se ajustarán según los efectos deseados y conocidos por el experto en la técnica.

La hidrólisis ácida (etapa 2) se realiza con ayuda de agua y de al menos un ácido mineral, tal como el ácido fosfórico o clorhídrico (prefiriéndose éste último) y/o un ácido orgánico, tal como el ácido trifluoroacético (TFA), el ácido acético, el ácido dicloroacético, o los ácidos organosulfónicos.

## ES 2 280 400 T3

Las proporciones de agua/ácido (expresadas en partes en peso) en una fase acuosa ácida de hidrólisis son, ventajosamente:

- de 60/1 a 2/1,
- de preferencia de 40/1 a 2/1,
- y, aún más de preferencia, de 20/1 a 2/1.

5

Las proporciones de fase acuosa ácida de hidrólisis/NMP (expresadas en partes en peso) son, ventajosamente:

- de 5/100 a 200/100
- de preferencia, de 10/100 a 100/100
- y, aún más de preferencia, de 20/100 a 80/100.

15

Otros parámetros, tales como la concentración en polímero, la temperatura de la mezcla de reacción, el modo de adición de la fase acuosa ácida de hidrólisis, el empleo de presión reducida, la duración de la reacción, etc..., se ajustan según los efectos deseados y bien conocidos por el experto en la técnica.

20

La neutralización (etapa 3) se realiza, en la práctica, por ejemplo, con ayuda de sosa.

A continuación se elimina la sal formada a la salida de la neutralización, así como el disolvente, mediante cualquier tratamiento de separación física apropiado, por ejemplo mediante diafiltración (diálisis) (etapa 4), filtración, modificación de pH, cromatografía...

25

Esto conduce a una suspensión acuosa de partículas estructuradas que puede concentrarse, por ejemplo, mediante destilación o cualquier otro medio físico conveniente: ultrafiltración, centrifugación. Para separar, en la etapa 6, las partículas de su medio líquido de suspensión, se elimina, eventualmente, la fase acuosa, por ejemplo mediante secado (por ejemplo en la estufa), mediante liofilización o cualquier otro medio físico conveniente: ultrafiltración, centrifugación. Se recupera, a la salida de esta etapa 6, un sólido pulverulento, de color blanco.

30

Según una variante, la etapa de concentración puede realizarse mediante un tratamiento químico, tal como una disminución del pH, que transforma en ácido la parte hidrófila de los monómeros glutamatos, lo que les vuelve insolubles en agua. Estos PAA ácidos intermedios pueden filtrarse, lavarse y secarse. Dichos productos intermedios ácidos pueden neutralizarse con una base química en una etapa posterior con el fin de obtener una suspensión de partículas.

35

Debe observarse que la puesta en práctica de las etapas 1, 2, 3, 4 y eventualmente 5 del procedimiento anterior corresponden a una preparación de una suspensión coloidal de partículas submicrónicas y con fuerte tasa de carga con los PA.

40

Durante esta preparación de suspensión coloidal, los PAA anfífilos poli(AANO)(AANI) de la etapa 2 se colocan en un medio acuoso en el que al menos una parte de los AANI es soluble y al menos una parte de los AANO es insoluble. Los PAA existen en forma de nanopartículas en este medio acuoso.

45

Una alternativa para preparar la suspensión de PV según la invención consiste en poner en contacto el sólido pulverulento, tal como se describió anteriormente en el presente documento y como producto y mediante su procedimiento de obtención, con un medio acuoso, no disolvente de los AANO.

50

Para realizar la asociación de uno o varios PA con las partículas, es posible poner en práctica varios procedimientos según la invención. A continuación en el presente documento se enumeran ejemplos no limitativos de estos procedimientos.

Según un primer procedimiento, se realiza la asociación de PA con las partículas mediante la puesta en contacto de una fase líquida (acuosa o no) que contiene el PA con la suspensión coloidal de partículas que comprenden o no Asp a título de AANI.

55

Según un segundo procedimiento, se realiza la asociación del PA con las partículas mediante la puesta en contacto de un PA en el sólido con la suspensión coloidal de partículas que comprenden o no Asp a título de AANI. El PA sólido puede estar, por ejemplo, en forma de liofilizado, precipitado, polvo u otro.

60

Según un tercer procedimiento, se pone en contacto el sólido pulverulento (PAA que comprende o no Asp a título de AANI), tal como se describió anteriormente como producto y mediante sus características de obtención, con una fase líquida (acuosa o no) que contiene el PA.

65

Según un cuarto procedimiento, se pone en contacto el sólido pulverulento, tal como se describió anteriormente como producto y mediante sus características de obtención (PAA que comprende o no Asp a título de AANI), con

## ES 2 280 400 T3

el PA en forma sólida. Se dispersa a continuación esta mezcla de sólidos, en una fase líquida, de preferencia una disolución acuosa.

En todos estos procedimientos, el PA utilizado puede estar en forma pura o preformulada.

Teniendo en cuenta la talla nanométrica de las partículas, la suspensión puede filtrarse sobre filtros de esterilización, lo que permite obtener, fácilmente y con un coste mínimo, líquidos medicamentosos inyectables estériles. El hecho de poder, gracias a la invención, controlar la talla de las partículas y lograr valores de Dh de entre 25 y 100 nm, es una ventaja importante.

La presente invención se refiere igualmente a productos intermedios novedosos del procedimiento descrito anteriormente en el presente documento, caracterizados porque están constituidos por copolímeros PAA (que comprenden o no Asp a título de AANI) precursores de partículas.

### 15 Aplicación industrial

Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a una suspensión y/o un sólido pulverulento (PAA que comprende o no Asp a título de AANI), tales como los definidos anteriormente en el presente documento y/o tales como los obtenidos mediante el procedimiento presentado anteriormente, comprendiendo esta suspensión y este sólido al menos un principio activo, seleccionado de preferencia entre:

- las vacunas;

- las proteínas y/o los péptidos, entre los que los más preferibles son: hemoglobinas, citocromos, albúminas, interferones, antígenos, anticuerpos, eritropoyetina, insulina, hormonas del crecimiento, factores VIII y IX, interleucinas o sus mezclas, factores estimulantes de la hematopoyesis;

- los polisacáridos, seleccionándose más particularmente la heparina;

- los ácidos nucleicos y, de preferencia, los oligonucleótidos de ARN y/o de ADN;

- moléculas no peptido-proteicas que pertenecen a diversas clases de quimioterapia anticancerosa y, en particular, antraciclina y taxoides;

- y sus mezclas.

La invención se refiere igualmente a una suspensión y/o sólido pulverulento (PAA que comprende o no Asp a título de AANI) cargado(s) con PA nutricional, fitosanitario o cosmético.

Finalmente, la invención se refiere a una especialidad farmacéutica, nutricional, fitosanitaria o cosmética, caracterizada porque comprende una suspensión y/o sólido pulverulento cargado(s) con PA y tal como se definieron anteriormente en el presente documento.

Según otro de sus objetos, la invención se refiere igualmente al uso de estas PV (en suspensión o en forma sólida: PAA que comprende o no Asp a título de AANI) cargados con PA, para la fabricación de medicamentos del tipo sistemas de liberación controlada de PA.

En particular, la invención se refiere al uso de una suspensión coloidal estable de partículas estructuradas submicrónicas cargadas con principio(s) activo(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretas):

- a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;

- aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto, a al menos un PA y liberar el mismo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;

- y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);

en la que:

- ✓ los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI están al menos en parte constituidos por asparagina;

- ✓ y los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANO idénticos o diferentes entre sí;

## ES 2 280 400 T3

para la preparación de una suspensión acuosa o de un sólido pulverulento, cargado con al menos un PA y tal como se define en las reivindicaciones precedentes.

En el caso de medicamentos, puede tratarse, por ejemplo de los administrables, de preferencia por vía oral, nasal, vaginal, ocular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intracerebral o parenteral.

Las aplicaciones cosméticas que pueden considerarse son, por ejemplo, las composiciones que comprenden un PA asociado a PV según la invención y aplicables por vía transdérmica.

Los productos fitosanitarios previstos pueden ser, por ejemplo, herbicidas, pesticidas, insecticidas, fungicidas, etc...

Los ejemplos que siguen permitirán comprender mejor la invención en sus diferentes aspectos producto/procedimiento/aplicación. Estos ejemplos ilustran la preparación de partículas de poliaminoácidos cargados o no con principios activos, al igual que presentan las características de estructura y las propiedades de estas partículas.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### Preparación del polímero - poli(leucina)-bloque-(glutamato de metilo)

Las técnicas utilizadas para la polimerización de los NCA para dar polímeros de estructuras en bloques o estadísticas se conocen por el experto en la técnica y se detallan en la obra de H. R. KRICHELDORF " $\alpha$ -Aminoácidos-N-CarboxyAnhydrides and Related Heterocycles", Springer Verlag (1987). La síntesis siguiente precisa la síntesis de uno de los mismos.

*Síntesis de poli(Leu)<sub>40</sub>-poli(GluOMe)<sub>80</sub>*: se solubilizan 10 g de NCA-GluOMe en una mezcla de 150 ml de NMP a 60°C. Se añaden de una vez 5 ml de una disolución de 0,91 g de bencilamina en 50 ml de NMP al monómero. Tras 1 h, se añaden 14,1 g de NCA-Leu disuelto previamente en 20 ml de NMP. La polimerización continúa durante otras 3-4 h.

Una muestra del medio de reacción permite conocer las caracterizaciones siguientes: rendimiento del 90%. Composición por 1H-RMN: (TFA-d) un 66% molar de GluOMe. Viscosidad reducida (un 0,5% de TFA a 25°C) 0,4 dl/g. Masa molar mediante GPC: 20.000 g/mol.

#### Ejemplo 2

##### Aminolisis del poli(leucina)-bloque-(glutamato de metilo) con hidroxietilamina

A la disolución de polímero en NMP preparada según el ejemplo 1, se añaden en una vez 10 g de hidroxietilamina. Se lleva y mantiene el medio a 80°C durante 2 días. A continuación se añaden 150 ml de agua a la disolución del polímero. A continuación se purifica mediante una etapa de diálisis que garantiza la eliminación del exceso de amina y el NMP. Finalmente se aíslan las partículas mediante liofilización.

Rendimiento cuantitativo. 1H-RMN (TFA-d): un 8% de metoxilos residuales (3,5 ppm); un 92% de hidroxietilglutamina. Composición 1H-RMN (TFA-d): un 34% de Leu. Talla de las partículas (difusión de la luz en modo QLS): 100 nm.

#### Ejemplo 3

##### Puesta en evidencia de las nanopartículas mediante difusión de la luz (DDL) y microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se suspenden 10 mg de partículas del polímero 1 en 10 ml de agua o una disolución acuosa de sal. A continuación se introduce esta disolución en un granulómetro Coulter (o difractor láser). Los resultados del análisis de granulometría de los diferentes productos sometidos a prueba se presentan en la tabla 1 siguiente.

TABLA 1

Mediciones de la talla de las PV

Ejemplo	Polímero	Talla (nm)
2	POLI[(LEU) <sub>0,66</sub> -BLOQUE-(GLN-N-HIDROXIETIL) <sub>0,37</sub> ] <sub>X</sub>	100

## ES 2 280 400 T3

### Ejemplo 4

#### *Prueba de asociación de las nanopartículas con una proteína (la insulina)*

5 A partir de una disolución tampón fosfato isotónica de pH 7,4, se prepara una disolución de insulina humana valorada a 1,4 mg/ml correspondiente a 40 UI/ml. En 1 ml de esta disolución de insulina, se dispersan 10 mg de la PV preparada en el ejemplo 1. Tras 15 horas de incubación a temperatura ambiente, se separan la insulina asociada a las PV y la insulina libre mediante centrifugación (60.000 g, 1 hora) y ultrafiltración (umbral de filtración de 300.000 D). Se dosifica la insulina libre recuperada en el filtrado mediante HPLC o mediante ELISA y se deduce mediante  
10 diferencia la cantidad de insulina asociada. La cantidad de insulina asociada a la PV es superior a 0,77 mg, lo que representa más del 55% del total de la insulina empleada.

15 La tabla siguiente reúne los resultados de las mediciones de tasa de asociación realizadas sobre diferentes PV. La tasa de asociación expresa el porcentaje de insulina asociada con respecto a la insulina empleada en una preparación valorada a 1,4 mg/ml de insulina y 10 mg/ml de PV. Este valor se transforma en una tasa de carga que expresa una formulación al 100% de fijación de la proteína, en mg de insulina par 100 mg de PV.

TABLA 2

*Mediciones de la tasa de asociación con insulina para una mezcla de 0,14 mg de INSULINA/mg de PV*

Ejemplo	Polímero	Tasa de asociación n (%)	Tasa de carga en mg/100 mg
2	POLI[(LEU) <sub>0,66</sub> -BLOQUE-(GLN-N-HIDROXIETIL) <sub>0,37</sub> ] <sub>x</sub>	99	13,6

### Ejemplo 5

#### *Farmacocinética y farmacodinámica de las PV cargadas con insulina en un perro sano en ayunas*

Se inyectó la preparación de partículas+insulina del ejemplo 4 en perros, que se volvieron diabéticos mediante pancreatectomía total y en ayunas desde el día anterior por la noche. La administración a las 11 de la mañana por vía subcutánea torácica de la preparación se realizó con la posología de 0,5 UI/kg de insulina por Kg de peso vivo del animal. El volumen administrado está comprendido entre 0,18 y 0,24 ml. En los momentos -4, -2, 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48 horas, se extrae 1 ml de sangre mediante punción yugular a vacío sobre tubo de heparinato de sodio. Se utilizan 30  $\mu$ l de sangre total extemporaneamente para la medición de la glucemia, A continuación se centrifuga el tubo, se decanta y se almacena el plasma a -20°C para la dosificación de la insulina. Los resultados presentados en la figura 1 a continuación en el presente documento muestran que vuelve a soltarse la insulina hasta 12 horas (línea continua) y un efecto hipoglucemiante importante que se prolonga hasta las 20 horas (línea discontinua) tras la inyección.

TABLA 3

*Mediciones del tiempo de acción de la insulina (efecto hipoglucemiante) en presencia de PV según la invención*

Ejemplo	Polímero	Tiempo de regreso hasta el nivel basal (h)
	INSULINA SOLUBLE (SIN PV)	1
2	POLI[(LEU) <sub>0,66</sub> -BLOQUE-(GLN-N-HIDROXIETIL) <sub>0,37</sub> ] <sub>x</sub>	20 H

Este ejemplo demuestra la no desnaturalización de la insulina en presencia de PV según la invención.

## ES 2 280 400 T3

Además, el ejemplo 2 permite poner en evidencia el aumento de la duración de acción de la insulina con respecto a la insulina no formulada y, por tanto, la utilidad de las PV como sistema de retraso para la liberación controlada de la insulina. Muestra igualmente cómo es posible controlar la duración de acción mediante elección juiciosa del agrupamiento hidrófobo.

5

### Ejemplo 6

#### *Aminolisis del poli(fenilalanina)-bloque-(glutamato de metilo) con hidroxietilamina*

10 A la disolución de polímero en NMP preparada según el ejemplo 1 partiendo de los monómeros NCAGluOMe y NCA-fenilalanina, se añaden en una vez 10 g de hidroxietilamina. Se lleva y mantiene el medio a 80°C durante 2 días. A continuación se añaden 150 ml de agua a la disolución del polímero. A continuación se purifica mediante una etapa de diálisis que garantiza la eliminación del exceso de amina y NMP. Finalmente se aíslan las partículas mediante liofilización.

15

Rendimiento cuantitativo. 1H-RMN (TFA-d): un 6% de metoxilos residuales (3,5 ppm); un 94% de hidroxietilglutamina. Composición de 1H-RMN (TFA-d): un 34% de Leu. Talla de las partículas (difusión de la luz en modo QLS): 100 nm.

### 20 Ejemplo 7

#### *Aminolisis del poli(leucina-bloque-glutamato de bencilo) con 3-amino-propilen-1,2-glicol*

25 A la disolución de polímero en NMP preparada según el ejemplo 1, partiendo de los monómeros NCAGluOBzl y NCALeu, se añaden en una vez 10 g de 3-amino-propilen-1,2-glicol. Se lleva el medio a 80°C durante 2 días. Se añaden 150 ml de agua a la disolución del polímero. A continuación se purifica mediante una etapa de diálisis que garantiza la eliminación del exceso de amina y del disolvente. Finalmente se aíslan partículas mediante liofilización. Rendimiento cuantitativo. Talla de las partículas (QLS, según el ejemplo 3): 100 nm.

### 30 Ejemplo 8

#### *Prueba de asociación de las nanopartículas con una proteína (la insulina)*

35 Según el ejemplo 4, se utilizan partículas aisladas del ejemplo 6 e insulina humana para obtener una tasa de carga expresada en mg de insulina por 100 mg de PV.

40

Ejemplo	Polímero	Tasa de asociación	Tasa de carga en mg/100 mg
6	POLI(PxE <sub>0,79</sub> -BLOQUE-GLN-N-DIHIDROXIPROPIL <sub>0,21</sub> ) <sub>x</sub>	99	8,5
45 7	POLI(LEU <sub>0,66</sub> -BLOQUE-(GLN-N-DIHIDROXIPROPIL <sub>0,33</sub> ) <sub>x</sub>	99	13,7

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Suspensión coloidal estable de partículas estructuradas submicrónicas susceptibles de utilizarse, especialmente para la vectorización de principio(s) activo(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretas):

- 10 ○ a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;
- aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto, a al menos un PA y liberar el mismo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;
- 15 ○ y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);

**caracterizada:**

- 20 ✓ porque los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI son aminoácidos neutros hidrófilos AANI a excepción de asparagina;
- ✓ porque los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANO;
- 25 ✓ y porque los ácidos aminados recurrentes de cada tipo AANI y AANO son idénticos o diferentes entre sí.

2. Suspensión según la reivindicación 1, **caracterizada** porque los PAA constitutivos de las partículas son PAA en “bloque”, en los que:

- 30 ○ la razón molar AANO/(AANI + AANO) es  $\geq 6\%$ ,
- y la longitud absoluta del bloque de AANO es  $\geq 5$ , de preferencia  $\geq 10$ , y más de preferencia  $\geq 20$ .

3. Suspensión según la reivindicación 1, **caracterizada** porque los PAA constitutivos de las partículas son PAA “copolímeros estadísticos” y porque:

- 35 ● la razón molar AANI/(AANI + AANO) es  $\geq 10\%$ , y de preferencia  $\geq 20\%$  y más de preferencia de entre el 30 y el 70%,
- la masa molar  $M_w \geq 2.000$  Da.

4. Suspensión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque el (los) AANI hidrófilo(s) se selecciona(n) del grupo que comprende:

- 45 ✓ los ácidos aminados neutros naturales, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: serina, treonina, hidroxiprolina, glutamina;
- ✓ los ácidos aminados neutros, raros o sintéticos, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: S-óxido de metionina, O-glucosidil-serina;
- 50 ✓ los derivados de los ácidos aminados neutros, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: N-hidroxietilglutamina, N-hidroxipropilasparagina, N-hidroxietil-asparagina, N-hidroxipropilglutamina.

5. Suspensión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque el (los) AANO hidrófobo(s) se selecciona(n) del grupo que comprende:

- 55 ◆ los ácidos aminados neutros naturales, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe;
- ◆ los ácidos aminados neutros, raros o sintéticos, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: norleucina, norvalina;
- 60 ◆ los derivados de los ácidos aminados polares, de preferencia los seleccionados del grupo que comprende: glutamato de metilo, glutamato de etilo, aspartato de bencilo, N-acetil-lisina.

6. Suspensión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque las partículas de vectorización (PV) que contiene tienen una talla media comprendida entre 0,01 y 0,5  $\mu\text{m}$ , de preferencia entre 0,01 y 0,2  $\mu\text{m}$ .

## ES 2 280 400 T3

7. Suspensión coloidal de partículas, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque es acuosa y estable.

5 8. Suspensión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque las partículas comprenden al menos un principio activo.

9. Sólido pulverulento **caracterizado** porque se obtiene a partir de la suspensión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10 10. Procedimiento de preparación del sólido pulverulento según la reivindicación 9 o de un sólido pulverulento obtenido a partir de una suspensión coloidal estable de partículas estructuradas submicrónicas susceptibles de utilizarse, especialmente para la vectorización de principio(s) activo(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretas):

- 15
- o a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;
  - o aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto, a al menos un PA y liberar el mismo,
  - o y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);
- 20

en la que:

- 25
- ✓ los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI están al menos en parte constituidos por asparagina,
  - ✓ y los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANO idénticos o diferentes entre sí,
- 30

**caracterizado** porque:

- 1) se realiza una copolimerización de monómeros formados por anhídridos de N-carboxiaminoácidos (NCA) de al menos dos tipos diferentes,
- 35
- ◆ por una parte, monómeros de NCA de partida que comprenden NCA-Glu-OR y/o NCA-Asp-OR, y/o NCA-AANI,
  - ◆ y por otra parte, NCA-AANO, en presencia:
    - de al menos un disolvente polar no aromático, de preferencia seleccionado del grupo que comprende: N-metilpirrolidona (NMP), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMAc), pirrolidona; prefiriéndose más particularmente NMP;
    - y eventualmente al menos un codisolvente seleccionado entre los disolventes apróticos (de preferencia dioxano-1,4) y/o los disolventes próticos (de preferencia pirrolidona) y/o agua y/o alcoholes, prefiriéndose particularmente metanol;
- 40
- 2) en el caso en el que los monómeros de NCA de partida son NCA-Glu-OR y/o NCA-Asp-OR (R = alquilo), se pone en práctica una aminólisis que consiste en poner en contacto el copolímero obtenido en la etapa 1 con una fase acuosa que comprende al menos una amina y que permite la transformación de Glu-OR en Gln y de Asp-OR en Asn;
- 45
- 3) eventualmente se dializa el medio de reacción para purificar la suspensión acuosa de partículas estructuradas;
- 50
- 4) eventualmente se concentra esta suspensión de la etapa 3;
- 55
- 5) se elimina el medio líquido para recoger el sólido pulverulento que comprende las partículas.
- 60

11. Procedimiento de preparación de la suspensión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque se pone en contacto de un medio acuoso, el sólido pulverulento según la reivindicación 9 y/o el sólido pulverulento obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 10.

65 12. Procedimiento de preparación de la suspensión según la reivindicación 8, o de una suspensión coloidal estable de partículas estructuradas submicrónicas cargadas con principio(s) activo(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretas):

## ES 2 280 400 T3

- a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;

5           ○ aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto, a al menos un PA y liberar el mismo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;

- y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);

10 en la que:

✓ los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI están al menos en parte constituidos por asparagina,

15 ✓ y los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANO idénticos o diferentes entre sí,

20 **caracterizado** porque se realiza la asociación del PA a las partículas, mediante puesta en contacto de una fase líquida que contiene el PA con la suspensión coloidal de partículas y/o el sólido pulverulento obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 10.

25 13. Procedimiento de preparación de la suspensión según la reivindicación 8 o de una suspensión coloidal estable de partículas estructuradas submicrónicas cargadas con principio(s) activos(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretas):

- a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;

30           ○ aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto, a al menos un PA y liberar el mismo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;

- y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);

35 en la que:

✓ los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI están al menos en parte constituidos por asparagina,

40 ✓ y los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANO idénticos o diferentes entre sí,

**caracterizado** porque se realiza la asociación del PA a las partículas mediante puesta en contacto de un PA en el estado sólido con la suspensión coloidal de partículas.

45 14. Procedimiento de preparación de la suspensión según la reivindicación 8, o de una suspensión coloidal estable de partículas estructuradas submicrónicas cargadas con principio(s) activo(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretas):

- a base de poliaminoácidos (PAA) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;

50           ○ aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto, a al menos un PA y liberar el mismo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;

55           ○ y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);

en la que:

60 ✓ los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI están al menos en parte constituidos por asparagina,

✓ y los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANO idénticos o diferentes entre sí,

65 **caracterizado** porque se pone en contacto el sólido pulverulento según la reivindicación 9 y/o el sólido pulverulento obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 10, con una fase líquida que contiene el PA.

15. Procedimiento de preparación de la suspensión según la reivindicación 9, **caracterizado** porque se pone en contacto el sólido pulverulento según la reivindicación 9 y/o el sólido pulverulento obtenido mediante el procedimiento

## ES 2 280 400 T3

según la reivindicación 10, con el PA en forma sólida y porque se dispersa esta mezcla de sólidos en una fase líquida, de preferencia una disolución acuosa.

5 16. Productos intermedios del procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizados** porque están constituidos por copolímeros PAA precursores de partículas.

10 17. Suspensión según la reivindicación 9 y/u obtenida mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 y/o sólido pulverulento según la reivindicación 9, y/u obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 10, que comprende al menos un principio activo seleccionado, de preferencia, entre:

- 10 • las vacunas;
- 15 • las proteínas y/o los péptidos, entre los cuales se retienen más de preferencia: hemoglobinas, citocromos, albúminas, interferones, antígenos, anticuerpos, eritropoyetina, insulina, hormonas del crecimiento, factores VIII y IX, interleucinas o sus mezclas, factores estimulantes de la hematopoyesis;
- 20 • los polisacáridos, seleccionándose más particularmente la heparina;
- los ácidos nucleicos y, de preferencia, los oligonucleótidos de ARN y/o de ADN;
- moléculas no peptido-proteicas que pertenecen a diversas clases de quimioterapia anticancerosa y, en particular, antraciclina y taxoides, y sus mezclas.

25 18. Suspensión según la reivindicación 7 y/o suspensión obtenida mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, y/o sólido pulverulento según la reivindicación 9 u obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 10, que comprende al menos un principio activo nutricional, fitosanitario o cosmético.

30 19. Especialidad farmacéutica, nutricional, fitosanitaria o cosmética, **caracterizada** porque comprende una suspensión y/o sólido pulverulento según la reivindicación 17 ó 18.

35 20. Uso de una suspensión coloidal estable de partículas estructuradas submicrónicas cargadas con principio(s) activo(s) PA, siendo estas partículas disposiciones supramoleculares individualizadas (discretas):

- 35 ○ a base de poliaminoácidos (PM) anfífilos, lineales, con cadenas peptídicas y que comprenden al menos dos tipos diferentes de aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI e hidrófobos AAO, siendo los aminoácidos de cada tipo idénticos o diferentes entre sí;
- 40 ○ aptas para asociarse en suspensión coloidal en el estado no disuelto, a al menos un PA y liberar el mismo, especialmente *in vivo*, de manera prolongada y/o retardada;
- y estables en fase acuosa a pH comprendido entre 4 y 13 en ausencia de tensioactivo(s);

en el que:

- 45 ✓ los aminoácidos recurrentes hidrófilos AAI están al menos en parte constituidos por asparagina,
- ✓ y los aminoácidos recurrentes hidrófobos AAO son aminoácidos neutros hidrófobos AANO idénticos o diferentes entre sí;

50 para la preparación de una suspensión acuosa o de un sólido pulverulento, cargado con al menos un PA y según las reivindicaciones precedentes.

55

60

65

