

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de enero de 2011 (27.01.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/009991 A2

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:** Sin clasificar
- (21) **Número de la solicitud internacional:**
PCT/ES2010/070504
- (22) **Fecha de presentación internacional:**
22 de julio de 2010 (22.07.2010)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**
2009 01645 24 de julio de 2009 (24.07.2009) ES
- (71) **Solicitante** (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Centro de Innovación e Transferencia de Tecnoloxía, Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).
- (72) **Inventores; e**
- (75) **Inventores/Solicitantes** (para US solamente): **SOUSA HERVES, Ana** [ES/ES]. **FERNANDEZ MEGIA, Eduardo** [ES/ES]. **RIGUERA VEGA, Ricardo** [ES/ES].
- (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) **Title:** DENDRITIC PIC MICELLES WITH BIOACTIVE PROTEINS

(54) **Título :** MICELAS PIC DENDRÍTICAS CON PROTEÍNAS BIOACTIVAS



Figura 1

(57) **Abstract:** Dendritic PIC micelles with bioactive proteins. The invention relates to a Polyion Complex (PIC) polymeric micelle formed by interaction between a bioactive protein and a dendritic block copolymer of opposite charge. The conventional low stability of PIC micelles with bioactive proteins vis-à-vis ionic strength is offset in the present invention by the stability provided by the dendritic block. The overall process for preparing these micelles is facilitated by the simplicity of the dendritic block copolymer synthesis.

(57) **Resumen:** Micelas PIC dendríticas con proteínas bioactivas. Se refiere a una micela polimérica de complejo poliiónico (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.

WO 2011/009991 A2

MICELAS PIC DENDRÍTICAS CON PROTE

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a una micela polimérica de complejo poliónico (Polyion
5 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
10 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

El uso de proteínas bioactivas como agentes terapéuticos ha despertado un enorme
15 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
20 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.

Sin embargo, el uso de proteínas como agentes terapéuticos presenta como inconveniente
25 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
30 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 |

Chem. **2008**, *46*, 1].

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
5 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).

En este contexto, las micelas PIC (Polyion Complex) se presentan como un prometedor
10 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,
15 asegurando prolongados tiempos de circulación [*Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1411].

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
20 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
25 torrente sanguíneo, hace que se acumulen selectivamente en los tejidos tumorales.

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
30 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.

Sin embargo, las micelas PIC formadas a partir de proteínas 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].

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 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.

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.

30 Descripción de la invención

Definiciones

Dendrímero: 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 la interacción receptor-ligando.

5 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.

10 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 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.

15 20 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.

25 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 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.

30

Micelas PIC: Son un tipo de micelas poliméricas que se caracterizan porque su formación se basa principalmente 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. Fuere

Kataoka (1995), quien las denominó “Polyion Complex Micelles” (PIC Micelles).

5 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 de la terapia anticáncer con la intención de acumular selectivamente la toxicidad de fármacos en los tejidos cancerosos, minimizando su efecto en los sanos.

10 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.

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

La presente invención proporciona un tipo de micela PIC formada por interacción electrostática entre un copolímero de bloque dendrítico cargado y una proteína bioactiva. 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, 20 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 25 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 30 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 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.

5

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]

10 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**.

En una realización particular, el polímero **P** se selecciona entre polímeros lineales, 15 copolímeros de bloque, copolímeros, terpolímeros, copolímeros de injerto, terpolímeros de injerto y copolímeros anfifílicos.

En una realización particular, el polímero **P** se selecciona entre polímeros de origen natural o polímeros producidos por síntesis química o procesos biotecnológicos.

En una realización particular, el polímero **P** se selecciona preferentemente entre N-(2- 20 Hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), Poli(estireno-co-ácido maleico/anhídrido) (SMA), Poli(divinil éter anhídrido maleico) (DIVEMA), Poli(N-vinil pirrolidona) (PVP), Poli(N-acrilóil)morfolina (PACM), Polietilenglicol (PEG), Poli(óxido de propileno) (POP) y sus derivados.

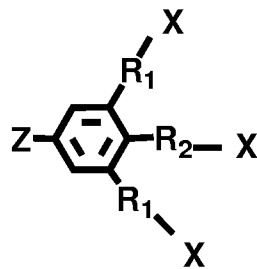
En una realización más particular, el polímero **P** es Polietilenglicol (PEG).

25 En otra realización particular, la proteína bioactiva **A** se selecciona preferentemente entre anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, heteroproteínas, enzimas y hormonas.

En una realización más particular, la proteína bioactiva **A** se selecciona preferentemente entre mioglobina, lisozima e insulina.

En una realización particular, la estructura dendrítica **D** es un dendrímero, dendrón o 30 polímero dendrítico construidos a partir de una única o varias unidades de repetición.

En una realización particular, la estructura dendrítica **D** construido a partir de la unidad de repetición representada por la fórmula general [2]



[2]

5

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

R₁ y **R₂** 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** 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;

R₁ y **R₂** 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, morfolinas, sales de amonio, aminas primarias, secundarias, terciarias o grupos guanidinio.

En una realización más particular, la invención se refiere a una micela polimérica como se ha definido anteriormente, formada por interacción electrostática entre un copolímero

de bloque PEG-dendrúmero con grupos benzoato en su p
lisozima, tal y como se esquematiza en la figura 1.

En una realización más particular, la invención se refiere a una micela polimérica como se ha definido anteriormente, formada por interacción electrostática entre un copolímero de bloque PEG-dendrúmero con grupos benzoato en su periferia y la proteína bioactiva mioglobina.

En una realización más particular, la invención se refiere a una micela polimérica como se ha definido anteriormente, formada por interacción electrostática entre un copolímero de bloque PEG-dendrúmero 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 en el interior de la micela polimérica como se ha definido anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una micela, como se ha definido anteriormente, como vehículo para la administración terapéutica de una proteína bioactiva.

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de una micela, como se ha definido anteriormente, como vehículo para la administración de un fármaco o agente de diagnóstico, molécula o macromolécula.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprenda una micela polimérica como se ha definido anteriormente y un principio activo.

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.

30

Descripción de las figuras

Figura 1. Formación de una micela PIC con lisozima

Figura 2. Formación de una micela PIC con Lisozima e histograma de DLS.

Figura 3. AFM de una micela PIC con lisozima forma bloque dendríticos con grupos benzoato.

Figura 4. Formación de una micela PIC con Mioglobina e histograma de DLS.

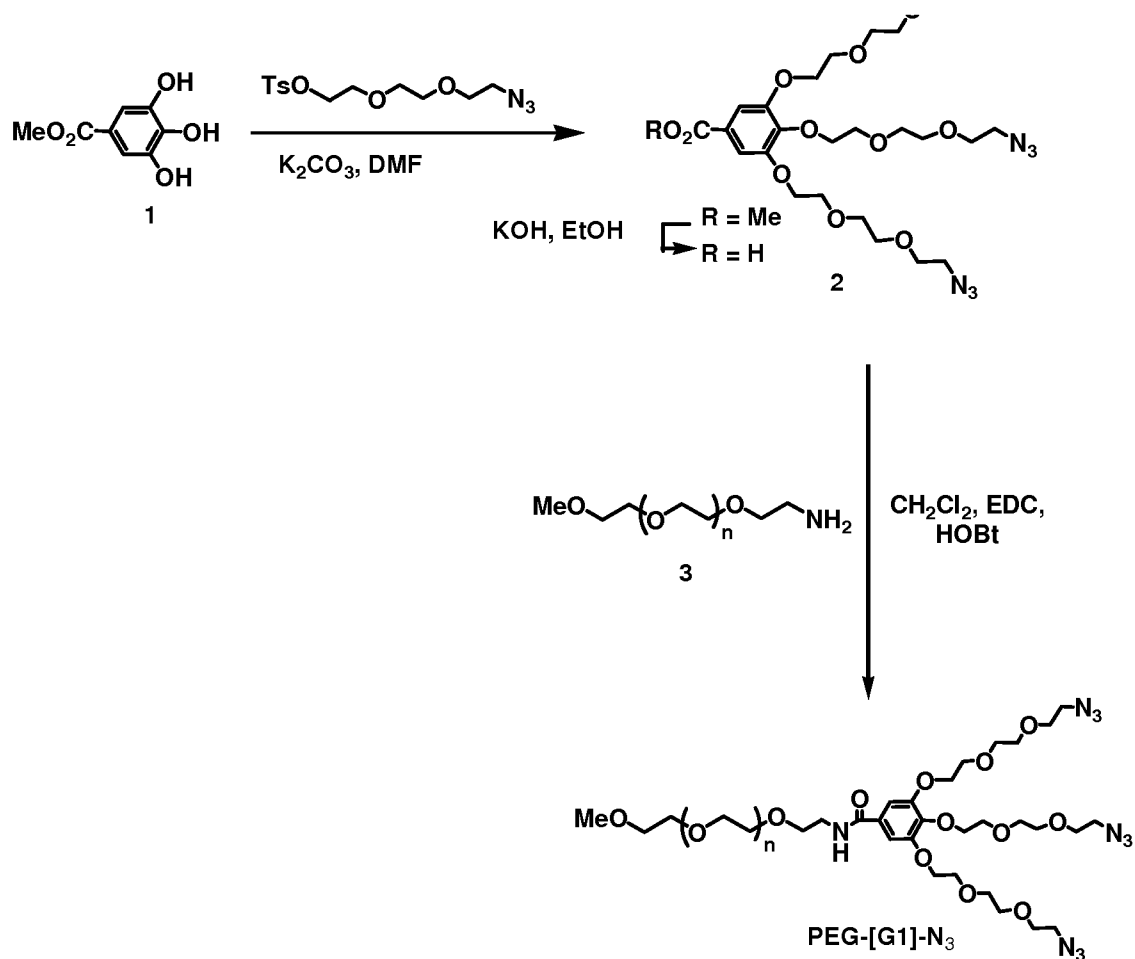
Figura 5. Formación de una micela PIC con Insulina e histograma de DLS.

- 5 Figura 6. AFM de una micela PIC con insulina formada a partir de copolímeros de bloque dendríticos con grupos anilina cargados positivamente.

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:

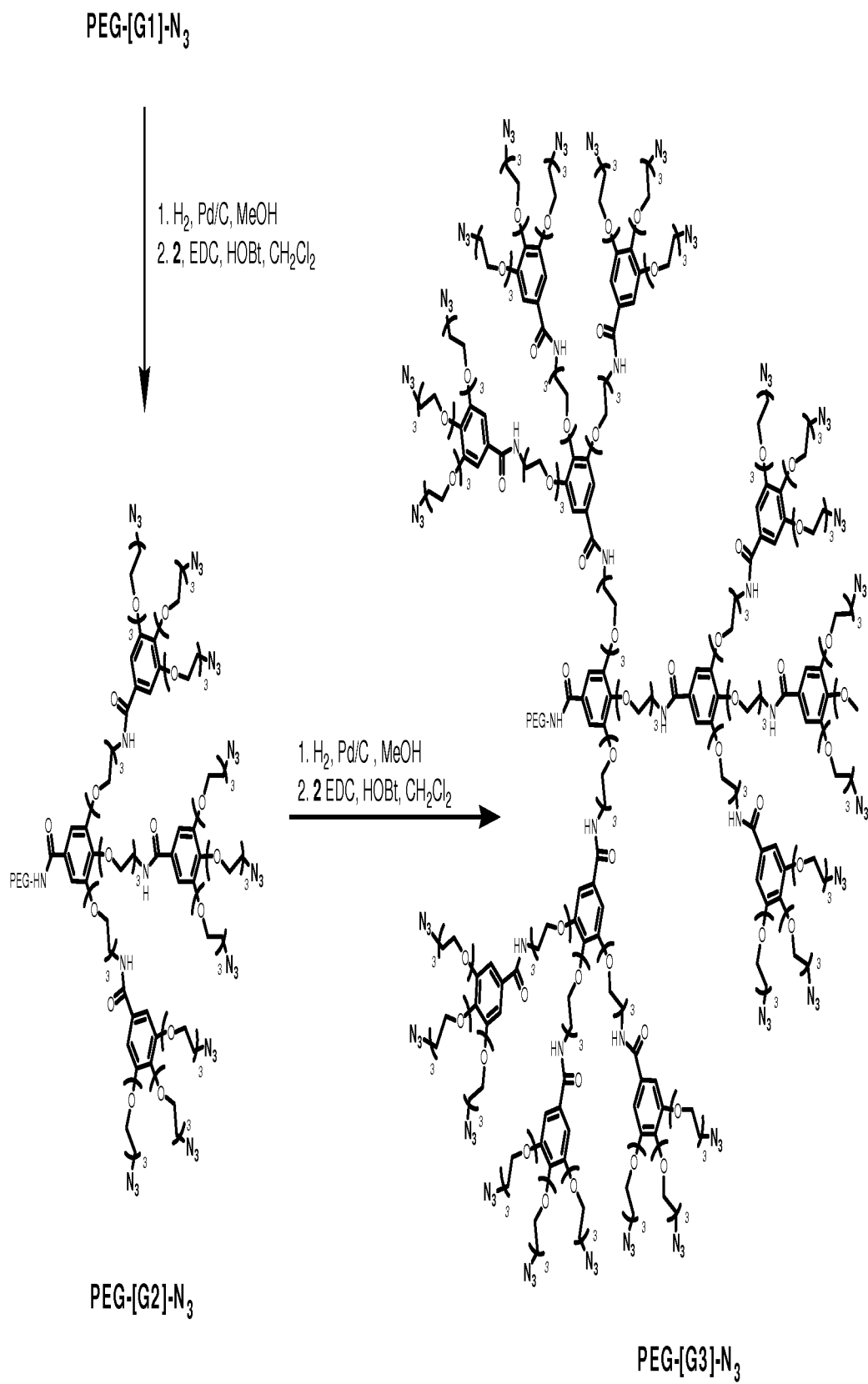
EJEMPLO 1. Síntesis de los copolímeros de bloque.

- 15 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]-N₃** se obtuvo por acoplamiento de la unidad dendrítica **2** con un PEG-NH₂ (**3**).



Esquema 1

- 5 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 de los copolímeros de bloque PEG-dendrímico, (PEG-[Gn]-N₃).

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

Se disolvieron el copolímero de bloque PEG-dendrímico PEG-[Gn]-N₃ y el ligando aniónico en una mezcla *t*-BuOH-H₂O (1:1). Posteriormente, se añadieron cantidades catalíticas de CuSO₄ y ascorbato sódico (**Esquema 3**).

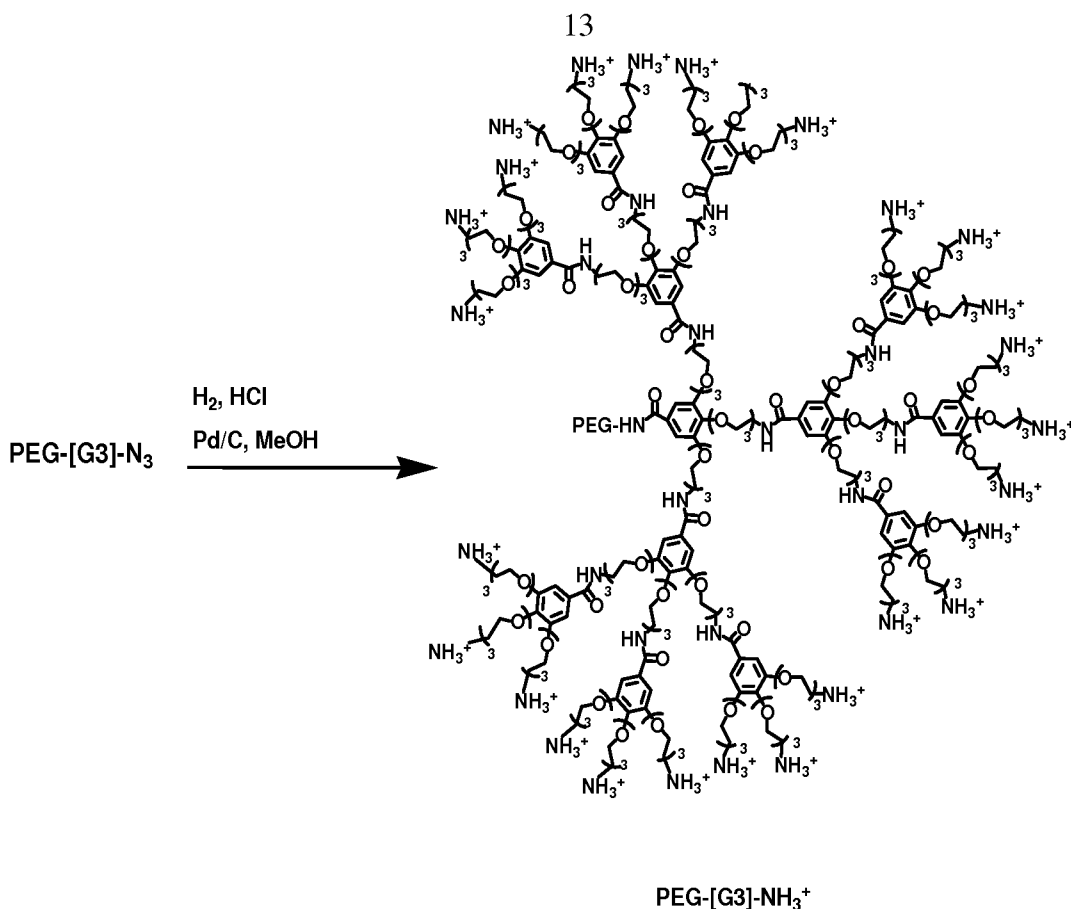


Esquema 3

EJEMPLO 3. Procedimiento general para la funcionalización catiónica de los copolímeros de bloque PEG-dendrímico, (PEG-[Gn]-N₃).

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]-NH₃⁺.
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

- 5 **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-NH₂ (M_n 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 24h bajo agitación magnética, la disolución resultante se
10
15
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. (Figura 2). Este tamaño fue corroborado por Atomic Force Microscopy (AFM).

Para comprobar la estabilidad de las micelas PIC

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
5 ningún otro signo de desestabilización.

Caracterización. Para la visualización mediante AFM de las micelas PIC dendríticas con lisozima, se tomó una alícuota de una disolución de micelas de concentración 1.18 mg/mL en PBS 10 mM, pH 7.4 y se diluyó con agua Milli-Q hasta una concentración de 0.05 mg/mL. 10 µL de esa disolución se depositaron sobre una superficie de silicio que
10 se dejó secar a temperatura ambiente. Se observaron partículas esféricas de aproximadamente 140 nm, en concordancia con las medidas de DLS (Fig. 3).

Estabilidad de las micelas. Las micelas PIC dendríticas con lisozima son estables durante más de un mes a 4 °C en PBS 10 mM, pH 7.4, y durante varias semanas a esta temperatura en presencia de 150 mM NaCl. Además, estas micelas son estables durante
15 semanas a temperatura ambiente en PBS 10 mM, pH 7.4, aunque no es recomendable su almacenamiento a esta temperatura debido a su naturaleza proteica.

Una prueba más de la estabilidad de estas micelas es la posibilidad de liofilizarlas y resuspenderlas posteriormente en el mismo volumen, observándose tan sólo una mínima disminución de tamaño por DLS.

20

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).

25 El copolímero de bloque **PEG-[G3]-Benzoato**, obtenido a partir de PEG-NH₂ (Mn 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 miglobina (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
30 proteína al pH de trabajo, para dar lugar a micelas tipo PIC a un pH final 7.4. Tras 24h bajo agitación magnética, la disolución resultante se filtró y se analizó por DLS (Figura 4). 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.

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).

El copolímero de bloque **PEG-[G3]-Anilina·HCl**, obtenido a partir de PEG-NH₂ (M_n 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 lugar a micelas tipo PIC a un pH final 7.4. Tras 24h bajo agitación magnética, la disolución resultante se filtró y se analizó por DLS (Figura 5). 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.

Para la visualización mediante AFM de las micelas PIC dendríticas con insulina, se tomó una alícuota de una disolución de micelas de concentración 0.96 mg/mL en PBS 10 mM, pH 7.4, y se diluyó con agua Milli-Q hasta una concentración de 0.05 mg/mL. 10 µL de esa disolución se depositaron sobre una superficie de silicio que se dejó secar a temperatura ambiente. Se observaron partículas esféricas de aproximadamente 45 nm, en concordancia con las medidas de DLS (Fig. 6).

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.

Las micelas PIC dendríticas con insulina son estables durante varias semanas a temperatura ambiente, aunque no es recomendable su almacenamiento a esta temperatura debido a su naturaleza proteica. Además, las micelas pueden conservarse durante más de un mes a 4 °C, tanto en PBS 10 mM pH 7.4 como en PBS 10 mM pH 7.4, 150 mM NaCl.

Reivindicaciones.

1. Una micela polimérica formada por interacción electrostática entre:

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

$$\mathbf{P D q (c) [1]}$$

5 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**.

10 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.

15 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.

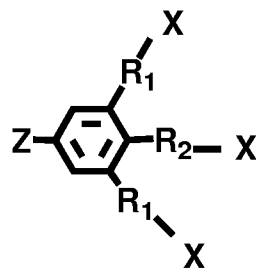
20 4. Una micela polimérica, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, donde el polímero **P** se selecciona preferentemente entre N-(2-Hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), Poli(estireno-co-ácido maleico/anhídrido) (SMA), Poli(divinil éter anhídrido maleico) (DIVEMA), Poli(N-vinil pirrolidona) (PVP), Poli(N-acriloil)morfolina (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).

25 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
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,
- R₁** y **R₂** 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 alternatively un grupo aniónico o catiónico.
10. Una micela polimérica, según la reivindicación 9, donde
- Z** es preferentemente un enlace amida;
- R₁** y **R₂** 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, morfolinas, sales de amonio, aminas primarias, secundarias, terciarias o grupos guanidinio.

11. Una micela polimérica, según la reivindicación 1, car:
contiene grupos benzoato en su periferia y **A** es lisozima.
12. Una micela polimérica, según la reivindicación 1, caracterizada porque **P** es PEG, **D**
contiene grupos benzoato en su periferia y **A** es mioglobina.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 17. Composición farmacéutica que comprende una micela según las reivindicaciones de
1 a 14 y un principio activo.

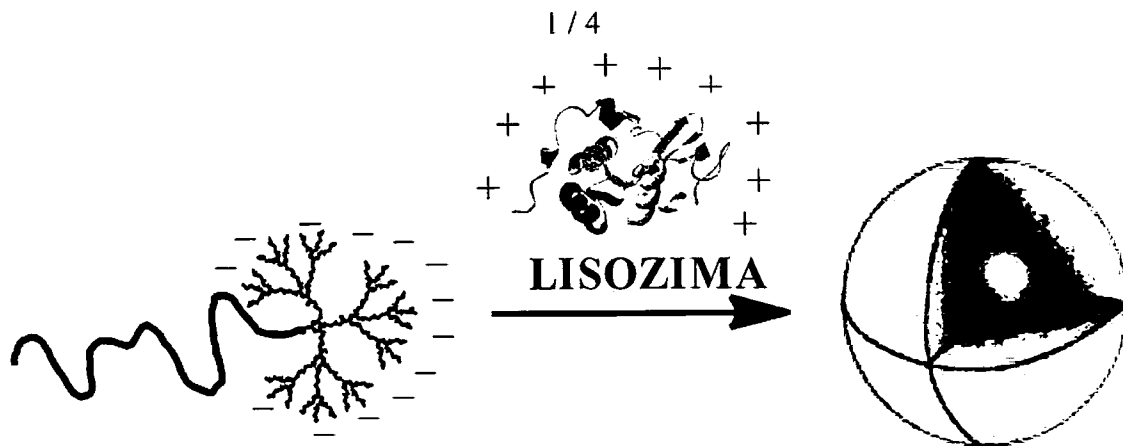


Figura 1

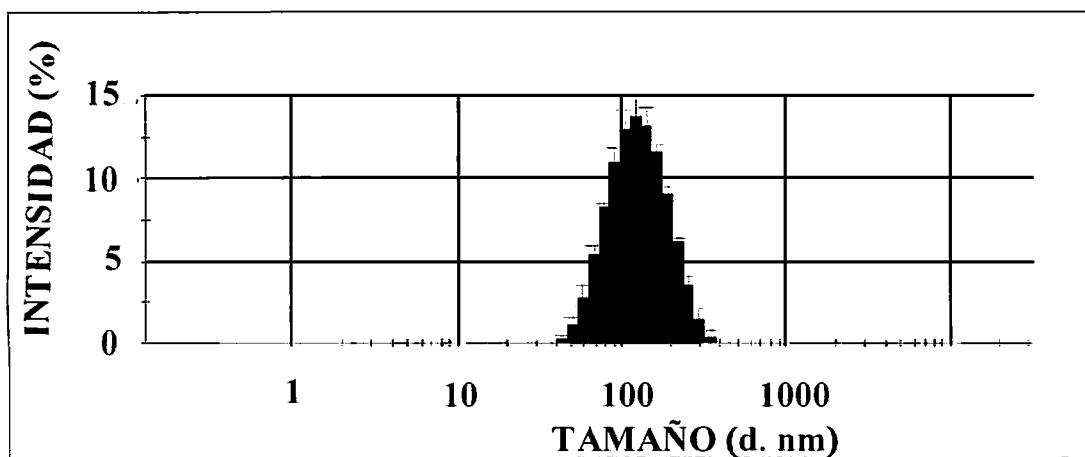
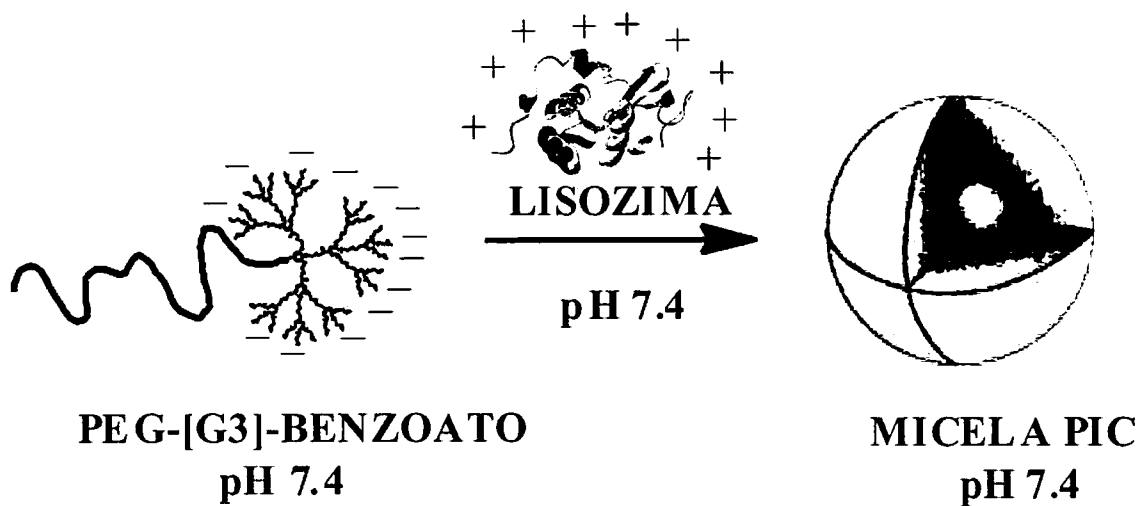


Figura 2

2 / 4

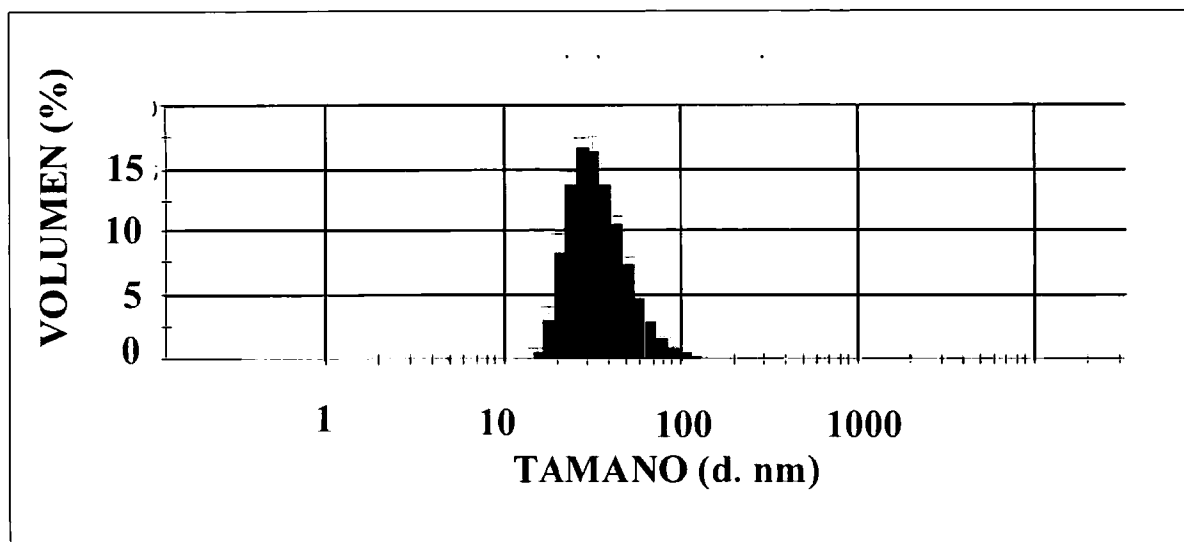
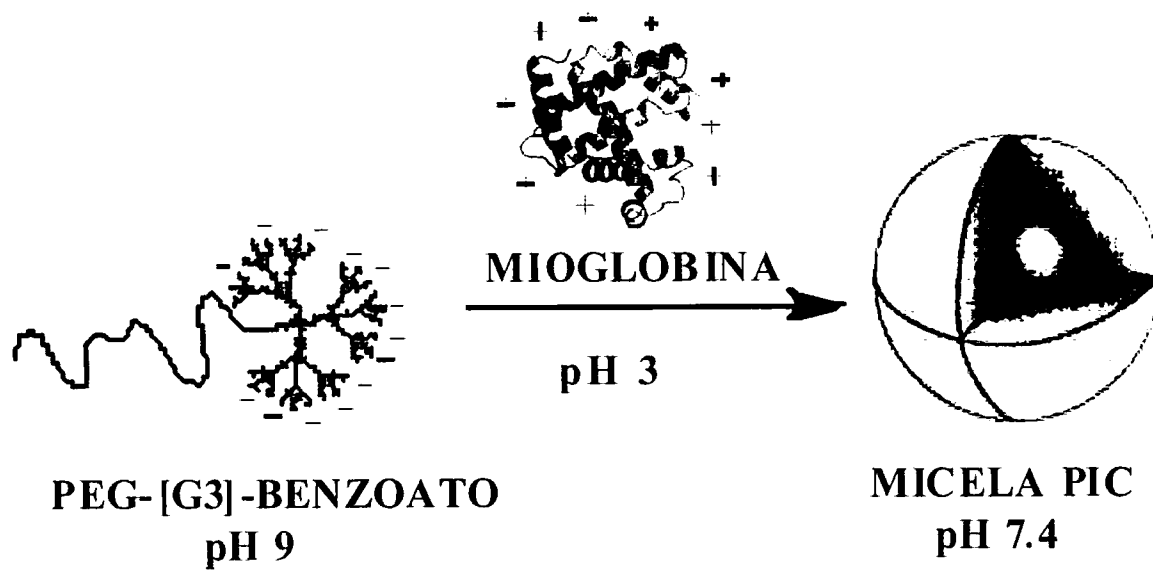


Figura 3

3 / 4

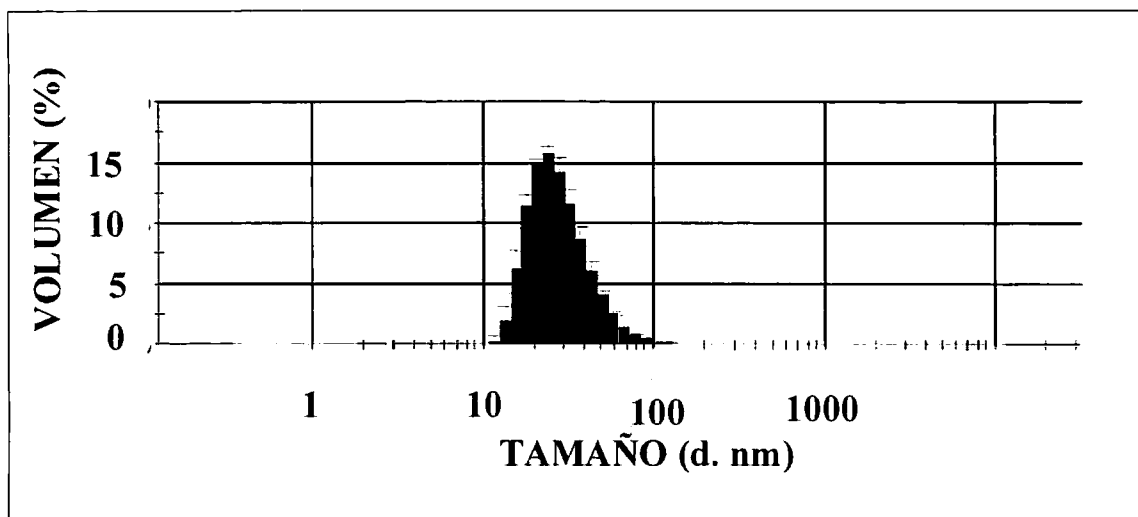
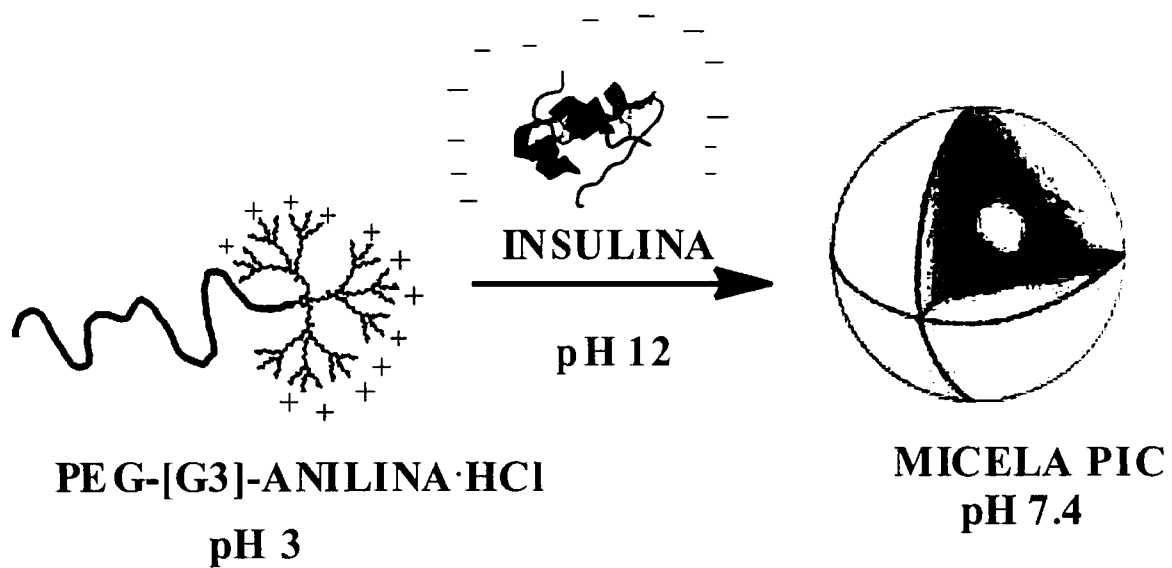


Figura 4

4 / 4

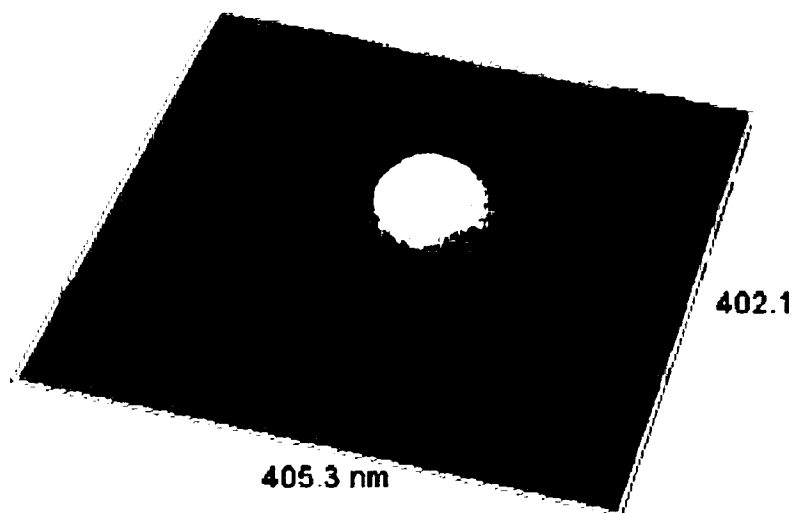


Figura 5

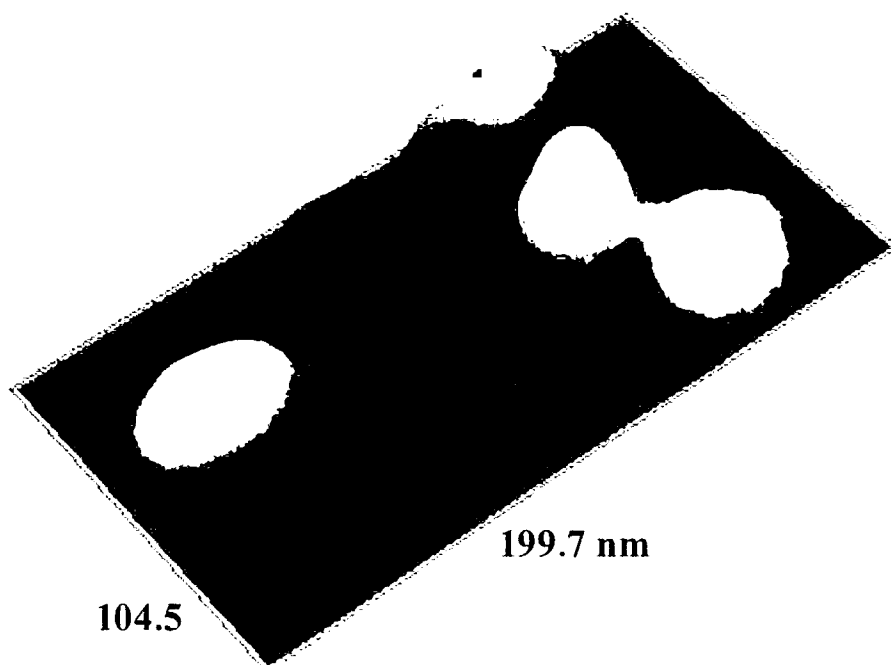


Figura 6