



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 079**

51 Int. Cl.:
A61K 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06725707 .1**

96 Fecha de presentación : **11.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1879558**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende microcápsulas rellenas con un gas, para un suministro mediado por ultrasonidos.**

30 Prioridad: **18.04.2005 EP 05103091**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2010

73 Titular/es: **Bracco Suisse S.A.**
Centro Galleria 2, Via Cantonale 2
6928 Manno, CH

72 Inventor/es: **Bettinger, Thierry;**
Yan, Feng;
Mehier-Humbert, Sophie y
Frinking, Peter

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 346 079 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende microcápsulas rellenas con un gas, para un suministro mediado por ultrasonidos.

Campo del invento

El presente invento se refiere al uso de una composición que comprende unas microcápsulas rellenas con un gas y un agente bioactivo para preparar una formulación para el suministro mediado por ultrasonidos de un agente bioactivo, y a un método para el suministro de un agente bioactivo, que comprende administrar una cantidad efectiva de dicho medicamento a un paciente que necesita del mismo.

Antecedentes del invento

Los agentes de contraste por ultrasonidos (UCA, acrónimo de ultrasound contrast agents) se han usado ampliamente en aplicaciones de diagnóstico en investigación médica y en la práctica clínica. Típicamente, dichos UCA están en la forma de unas burbujas gaseosas estabilizadas, también conocidas como microvesículas rellenas con un gas. Las microvesículas rellenas con un gas se dividen en general en dos categorías principales, a saber microburbujas y microcápsulas (o microglobos).

Las microburbujas incluyen unas suspensiones acuosas en las que las burbujas de un gas están delimitadas en la interfaz entre el gas y el líquido por una delgada envoltura (película) que implica a un material anfífilo estabilizador dispuesto en la interfaz entre gas y líquido. Las suspensiones de microburbujas se preparan típicamente poniendo en contacto unos materiales anfífilos pulverulentos, p. ej. unos liposomas previamente formados y liofilizados (es decir secados por congelación) o unas soluciones de fosfolípidos, liofilizadas o secadas por atomización, con aire o con otro gas y luego con un vehículo acuoso, mientras que se agita para generar una suspensión de microburbujas, que entonces se puede administrar, de manera preferible brevemente después de su preparación. Ejemplos de una suspensión acuosa de microburbujas de gas y de su preparación se describen, ilustrativamente, en los documentos de patentes de los EE.UU. US 5.271.928, US 5.445.813, US 5.413.774, US 5.556.610, US 5.597.549, US 5.827.504 y en el documento de solicitud de patente internacional WO 04/069284.

Las microcápsulas (o microglobos) incluyen unas suspensiones en las que las burbujas de un gas están rodeadas por una envoltura de un material sólido a base de un lípido o de polímeros naturales o sintéticos. El espesor de la envoltura de las microcápsulas puede variar desde unos pocos nanómetros hasta unos pocos cientos de nanómetros. Ejemplo de microcápsulas y de su preparación se describen, por ejemplo, en los documentos US 5.711.933 y US 6.333.021.

Recientemente, estos UCA han sido aprovechados en el suministro de genes mediado por ultrasonidos. Este nuevo enfoque usa los efectos de cavitación acústica de unas microvesículas de un gas para inducir una permeabilización transitoria de la membrana al nivel celular (también conocida como "sonoporación"), facilitando de esta manera la transferencia de fármacos o materiales genéticos dentro de la célula. De esta manera, se han desarrollado unas composiciones de microvesículas rellenas con un gas, en que las microvesículas contienen, o bien en su parte vacía interna o embebido dentro de la envoltura estabilizadora, un compuesto terapéutico. Por ejemplo, el documento de patente de los EE.UU. n° 6.416.740 describe un sistema terapéutico dirigido a una diana, que comprende microesferas rellenas con un gas que incorporan un compuesto terapéutico. Similarmente, la solicitud de patente de los EE.UU. n° 2004/0258760 se refiere a unas microcápsulas poliméricas cargadas con un compuesto bioactivo. Sin embargo, esta solución al problema tiene la desventaja de que el compuesto terapéutico ha de ser de algún modo introducido dentro de la microvesícula o fijado a la microvesícula rellena con un gas, implicando de esta manera unos complicados procesos de producción. Además, el hecho de que algunas microvesículas que llevan los compuestos terapéuticos deberán ser sometidas a los efectos de cavitación para proporcionar la necesaria permeabilización celular, hace bastante ineficaz a todo el sistema. Además, puesto que el compuesto terapéutico es en general hidrófobo o ha de ser hecho hidrófobo (p. ej. en el caso de un material genético) para que él sea compatible con el material que forma las microvesículas, la liberación del compuesto terapéutico puede ser menos efectiva en el entorno hidrófilo de la circulación sanguínea de las células.

La entidad solicitante ha encontrado ahora que el uso de una composición que comprende unas microcápsulas rellenas con un gas, que tienen una resistencia predeterminada al índice mecánico de la onda de ultrasonidos aplicada, acrecienta notablemente la efectividad del suministro de compuestos terapéuticos (tales como un material genético) dentro de la célula, particularmente cuando dicho material de compuestos terapéuticos está sustancialmente exento de cualquier unión estable con la envoltura de dichas microcápsulas.

Sumario del invento

Un aspecto del presente invento se refiere a una suspensión acuosa que comprende un agente bioactivo y unas microcápsulas rellenas con un gas, que tienen una envoltura polimérica y/o de lípido, en que dichas microcápsulas tienen una resistencia a un índice mecánico (MI, acrónimo de mechanical index) de al menos 0,15 y dicho agente bioactivo está sustancialmente sin unir con dicha envoltura y libremente dispersado en dicha dispersión.

ES 2 346 079 T3

El término “resistencia a un MI” significa que las microcápsulas de una composición del invento pueden resistir a un valor de umbral predeterminado de presión acústica aplicada a una frecuencia predeterminada sin sufrir daños sustanciales. En particular, menos de un 50% del número total de las microcápsulas, de manera preferible menos de un 30% e incluso de manera más preferible menos de un 20% de dicha microcápsulas, se destruye después de una aplicación de dicho valor de umbral predeterminado de presión acústica. El término “destrucción” de microcápsulas significa que por lo menos una parte de la envoltura de la microcápsula es destruida, para liberar el gas contenido dentro de ella.

El índice mecánico (MI) tal como se usa aquí es adimensional, siendo definido como:

$$MI = \frac{P}{C_{MI} \sqrt{f}}$$

en que P es la presión acústica negativa de pico (en MPa, medida en agua), f es la frecuencia (en MHz) de la onda de ultrasonido aplicada y C_{MI} es una constante de normalización que es igual a $1 \text{ MPa} \cdot \text{MHz}^{-1/2}$.

El termino “sustancialmente no unido” como se usa aquí, indica que el agente bioactivo no tiene ninguna interacción estable (p. ej. de tipo covalente o iónico) con las moléculas que forman la envoltura de la microcápsula y, por lo tanto, está libremente dispersado en la suspensión (fuera de la envoltura estabilizadora de la microvesícula). En particular, una composición de acuerdo con el invento es una suspensión acuosa que comprende microcápsulas y un agente bioactivo (opcionalmente asociado con un vehículo), estando disociada la mayoría de dicho agente bioactivo (es decir, más del 50%) con respecto de la envoltura de microcápsula. Preferiblemente, un 75%, más preferiblemente por lo menos un 90% de la cantidad total de dicho agente bioactivo está dispersado libremente (es decir no está unido establemente a las microcápsulas y no está incorporado dentro de ellas) en dicha suspensión.

Preferiblemente, dichas microcápsulas tienen una resistencia a un índice mecánico de por lo menos 0,18 y más preferiblemente de por lo menos 0,20. En particular, dichas microcápsulas tienen una resistencia a una presión acústica de por lo menos aproximadamente 200 kPa a 1,15 MHz o de por lo menos aproximadamente 300 kPa a 2,25 MHz.

Preferiblemente, las microcápsulas de la composición tienen una rigidez de por lo menos 5 N/m, más preferiblemente de por lo menos 8 N/m.

De acuerdo con una forma preferida de realización, dicho agente bioactivo está incorporado en un vehículo. Preferiblemente, dicho vehículo comprende un lípido o polímero cargado positivamente. Más preferiblemente, dicho vehículo está en la forma de una micela o de un liposoma.

De acuerdo con una forma de realización preferida adicional, dicho vehículo comprende además un ligando para dirección a una diana.

Otro aspecto del invento se refiere al uso de una composición que comprende un agente bioactivo y unas microcápsulas rellenas con un gas que tienen una envoltura polimérica y/o de lípido, para preparar una formulación destinada al suministro, mediado por ultrasonidos, de dicho agente bioactivo, en que dichas microcápsulas tienen una resistencia a un índice mecánico (MI) de por lo menos 0,15 y dicho agente bioactivo está sustancialmente sin unir con dicha envoltura.

Un aspecto adicional del invento se refiere a un estuche farmacéutico que comprende un agente bioactivo y unas microcápsulas rellenas con un gas como antes se han definido.

Todavía otro aspecto adicional del invento se refiere a un método para suministrar un agente bioactivo dentro de una célula, que comprende:

- administrar una composición, que comprende un agente bioactivo y una pluralidad de microcápsulas rellenas con un gas, que tienen una envoltura polimérica y/o de lípido, a una parte del cuerpo que comprende dicha célula en un paciente que necesita de ella, teniendo dichas microcápsulas una resistencia a un índice mecánico de por lo menos 0,15 y estando dicho agente bioactivo sustancialmente sin unir con dicha envoltura; y

- aplicar una onda de ultrasonidos a dicha parte del cuerpo, teniendo dicha onda una presión acústica capaz de destruir a una parte de dichas microcápsulas, para suministrar de una manera efectiva dicho agente bioactivo a dicha célula.

La parte de microcápsulas destruidas puede ser también bastante baja, por ejemplo de 1% o menos del número total de microcápsulas, (p. ej. cuando éstas se administran en altas concentraciones, p. ej. de 10^9 microcápsulas por ml de la suspensión). Preferiblemente, la cantidad de microcápsulas destruidas es de por lo menos 5%, de manera más preferible de por lo menos 10% e incluso de manera más preferible de 50%.

Dibujos

Las Figuras 1a y 1b muestran el % (tanto por ciento) de células positivas para GFP y las intensidades medias de fluorescencia de células positivas, medidas después de un suministro de genes mediado por ultrasonidos, por uso de unas composiciones que contienen microburbujas o microcápsulas a 2,25 MHz.

Las Figuras 2a y 2b muestran el % de células positivas para GFP y las intensidades medias de fluorescencia de células positivas, medidas después de un suministro de genes mediado por ultrasonidos, por uso de unas composiciones que contienen microburbujas o microcápsulas a 1,15 MHz.

La Figura 3 muestra las intensidades medias de fluorescencia de células positivas para GFP, medidas después de un suministro de genes mediado por ultrasonidos, por uso de unas composiciones que contienen microcápsulas hechas de polímeros de diferentes pesos moleculares.

La Figura 4 muestra las intensidades medias de fluorescencia de células positivas para GFP, medidas después de un suministro de genes mediado por ultrasonidos, por uso de unas composiciones que contienen microcápsulas rellenas con diferentes gases.

Descripción detallada

La composición farmacéuticamente activa del invento se puede usar para suministrar de una manera efectiva un agente bioactivo dentro de una célula, por aplicación de ondas de ultrasonidos, que tienen una presión acústica y una frecuencia predeterminadas, capaces de romper por lo menos a una parte de las microcápsulas de la composición.

El término “composición farmacéuticamente activa” incluye dentro de su significado cualquier formulación, o precursora de la misma, que incluye formulaciones bioactivas y/o activas terapéuticamente, que es capaz de ejercer un efecto farmacéutico (p. ej. un efecto bioactivo y/o terapéutico) cuando se administra en una cantidad efectiva a un paciente que necesita de la misma. Similarmente, el término “farmacéuticamente activo” cuando se refiere a un compuesto, a un agente o un estuche, incluye dentro de su significado a compuestos, agentes o estuches diagnósticos, bioactivos y/o terapéuticos.

El término “agente bioactivo” incluye dentro de su significado a cualquier sustancia, composición o partícula que sea capaz de ser usada en un tratamiento (incluyendo el diagnóstico, la prevención, el alivio, el alivio del dolor o la curación) de cualquier estado patológico en un paciente (incluyendo una enfermedad, una aflicción, una lesión o un daño causado por enfermedad), que incluye compuestos de formulaciones se pueden usar en cualquier aplicación terapéutica, tal como en métodos para el tratamiento de una enfermedad en un paciente, así como cualquier sustancia que sea capaz de ejercer o sea responsable de ejercer un efecto biológico *in vitro* y/o *in vivo*. Ejemplos de agentes bioactivos son fármacos, productos farmacéuticos, proteínas, péptidos naturales o sintéticos, incluyendo oligopéptidos y polipéptidos, vitaminas, esteroides, y un material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos. Un método o tratamiento terapéutico de un paciente incluye típicamente el uso de un agente bioactivo, que está incluido típicamente dentro de una composición farmacéuticamente activa.

Tal como se ha observado por la Entidad solicitante, el uso de microcápsulas con una envoltura sólida hecha de un material polimérico y/o lipídico (particularmente las que tienen un espesor de la envoltura de por lo menos 50 nm, preferiblemente de por lo menos 100 nm) permite un suministro más efectivo del material genético dentro de la célula, en comparación con el uso de microburbujas estabilizadas por delgadas películas (p. ej. de menos que 10 nm) de un material.

La envoltura de microcápsulas rellenas con un gas, de una composición del invento, es preferiblemente una envoltura polimérica, que comprende preferiblemente un polímero biodegradable, o una envoltura que comprende lípidos biodegradables, insolubles en agua. Ejemplo de microcápsulas apropiadas y de la preparación de las mismas se describen, por ejemplo, en los documentos US 5.711.933, US 6.333.021, US 5.837.221 o US 6.045.777. Se pueden emplear también unas microcápsulas que tienen una envoltura proteínica, es decir hecha de proteínas naturales (una albúmina, hemoglobina), tales como las que se describen en los documentos de patente de los EE. UU. US-A-4.276.885 o EP-A-0 324 938.

Los polímeros que forman la envoltura de las microcápsulas inyectables son preferiblemente unos polímeros hidrófilos, biodegradables, compatibles fisiológicamente. Ejemplos de tales polímeros, que pueden ser naturales o sintéticos, son unos polisacáridos sustancialmente insolubles (p. ej. quitosano o quitina), poli(cianoacrilatos), poli(lactidas) y poli(glicolidas) y sus copolímeros, copolímeros de lactidas y lactonas tales como γ -caprolactona o δ -valerolactona, copolímeros de óxido de etileno y de lactidas, poli(etileniminas), polipéptidos, y proteínas tales como gelatina, colágeno, globulinas o albúminas. Otros polímeros apropiados, mencionados en el documento US 5.711.933 antes citado, incluyen poli-(orto)ésteres, poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) y sus copolímeros (p. ej. DEXON[®], Davis & Geck, Montreal, Canadá); poli(DL-lactida-co- γ -caprolactona), poli(DL-lactida-co- δ -valerolactona), poli(DL-lactida-co- γ -butirolactona), poli(cianoacrilatos de alquilo); poliamidas, un poli(hidroxibutirato); una poli(dioxanona); poli(β -aminocetonas); poli-(fosfazenos); y poli(anhídridos). Unos poli(aminoácidos) tales como los poli(ácidos glutámicos) y poli(ácidos aspárticos), se pueden usar también, al igual que sus derivados, tales como ésteres parciales con alcoholes inferiores o glicoles. Se pueden usar también unos copolímeros con otros aminoácidos tales como me-

tionina, leucina, valina, prolina, glicina, alanina, etc. Se pueden usar también derivados de poli(ácidos glutámicos) y poli(ácidos aspárticos) con una biodegradabilidad controlada (tales como los que se describen en los documentos WO87/03891, US 4.888.398 o EP 130935). Estos polímeros (y copolímeros con otros aminoácidos) tienen fórmulas de los siguiente tipos: $-(NH-CHA-CO)_w$, $-(NH-CHX-CO)_y$, en que X designa a la cadena lateral de un residuo de aminoácido (p. ej. metilo, isopropilo, isobutilo o bencilo); A es un grupo de las fórmulas $-(CH_2)_nCOOR^1R^2-OCOR$, $-(CH_2)_nCOO-CHR^1COOR$, $-(CH_2)_nCO(NH-CHX-CO)_mNH-CH(COOH)-(CH_2)_pCOOH$, o los respectivos anhídridos de las mismas, en las que R¹ y R² representan H o alquilos inferiores, y R representa alquilo o arilo; o R y R¹ están conectados conjuntamente por un enlace sustituido o sin sustituir para proporcionar anillos de 5 ó 6 miembros; n, m y p son números enteros inferiores, que no superan el valor de 5; y w e y son números enteros seleccionados por tener unos pesos moleculares no situados por debajo de 5.000.

Se pueden usar también unos polímeros no biodegradables (p. ej. para producir unas microcápsulas que se han de usar en el tracto digestivo), opcionalmente en combinación con los anteriores polímeros biodegradables. Éstos se pueden seleccionar unos polímeros biorresistentes, fisiológicamente aceptables, en su mayor parte insolubles en agua, por ejemplo poliolefinas (un poliestireno), resinas acrílicas (poliacrilatos, un poli(acrilonitrilo)), poliésteres (policarbonatos), poliuretanos, poliureas y sus copolímeros. El ABS (acrónimo de acrilonitrilo, butadieno y estireno) es un copolímero preferido.

Ventajosamente, se pueden usar también unos polímeros iónicos (es decir unos polímeros que llevan unos restos iónicos en su estructura), preferiblemente polímeros iónicos biodegradables, para formar la envoltura estabilizadora de las microcápsulas, confiriendo de esta manera una carga neta global a las mismas. Los polímeros iónicos se pueden usar como componentes principales de la envoltura estabilizadora, o se pueden mezclar en diversas proporciones (p. ej. de 2 a 80% en peso) con polímeros no iónicos. Unos apropiados polímeros iónicos son, por ejemplo, unos polímeros que comprenden un átomo de nitrógeno cuaternizado tales como aminas cuaternizadas o unos polímeros cuaternizados que comprenden restos carboxílicos, o de sulfato, sulfonato o fosfonato. Ejemplos de apropiados polímeros iónicos incluyen sin ninguna limitación, un poli(cloruro de dialil-dimetil-amonio), un poli{bis(2-cloro-etil)éter-alt-1,3-bis[3-(dimetilamino)propil]urea} cuaternizado (Poliquaternium[®]-2), un poli(tribromuro de 4-vinil-piridinio), un compuesto etoxilado cuaternizado de hidroxietil-celulosa (Poliquaternium[®]-4, un poli(cloruro de p-xileno tetrahidrotiofenio), una poli(L-lisina), quitina, un dietilnaminoetil dextrano, un poli(ácido acrílico), un poli(ácido metacrílico), un poli(estireno-alt-ácido maleico), poli(aminoácidos), ácido algínico, un poli(ácido uridílico), un ácido hialurónico, es decir una poli(β-ácido glucurónico-alt-β-N-acetil-glucosamida), un poli(ácido galacturónico), un poli(acetato de vinilo-co-ácido crotónico), una poli(dianhídrido de ácido 3,3',4,4'-benzofenonetetracarboxílico-co-4,4'-oxidianilina), un poli(isopreno-injerto-éter monometílico de ácido maleico), un copolímero de ácido glutámico con un glutamato de alquilo, heparina, un poli(estireno sulfonato), un poli(ácido isoftálico) sulfonado, un poli(vinil sulfonato, sal de potasio), un poli(vinil sulfato, sal de potasio), sulfato de condroitina A, sulfato de dextrano, fucoidano, un ácido polifosfórico, un polifosfato de sodio, un poli(vinil-fosfonato de sodio), quitosano, sulfato de quitosano, un alginato de sodio, un ácido algínico y un lignina-sulfonato.

Los lípidos biodegradables, insolubles en agua, que son útiles para formar microcápsulas para una composición de acuerdo con el invento, comprenden, por ejemplo, mono-, di- o tri-glicéridos sólidos, insolubles en agua, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides tales como colesterol, ceras y mezclas de las mismas. Los mono-, di- y triglicéridos incluyen principalmente los compuestos mono-, di- y tri-laurina, así como los correspondientes derivados de miristina, palmitina, araquidina y behenina. Son particularmente útiles los compuestos mono-, di- y tri-miristina, -palmitina, -estearina y triglicéridos mixtos tales como el dipalmitoil-monooleil glicérido; se prefieren tripalmitina y triestearina. Los ácidos grasos incluyen unos ácidos grasos sólidos (a la temperatura ambiente, aproximadamente 18-25°C) (preferiblemente saturados) que tienen 12 o más átomos de carbono, incluyendo, por ejemplo los ácidos láurico, araquídico, behénico, palmítico, esteárico, sebácico, mirístico, cerotínico, melísico y erúcico y los ésteres de ácidos grasos de los mismos. Preferiblemente, los ácidos grasos y sus ésteres se usan en mezcla con otros glicéridos.

Los esteroides se usan preferiblemente en mezcla con los otros glicéricos y/o ácidos grasos, y se seleccionan entre colesterol, fitosterol, lanosterol, ergosterol, etc. y ésteres de los esteroides con los ácidos grasos antes mencionados; sin embargo, se prefiere el colesterol.

Los preferidos lípidos biodegradables son triglicéridos tales como tripalmitina, triestearina o mezclas de los triglicéridos antes mencionados.

Opcionalmente, hasta un 75% en peso de un polímero biodegradable, tal como los que se han enumerado con anterioridad, se puede mezclar conjuntamente con el lípido biodegradable, insoluble en agua, que forma la envoltura de la microcápsula.

Se pueden incorporar también unos aditivos convencionales dentro de la envoltura de las microcápsulas, con el fin de modificar las propiedades físicas de las mismas, tales como la dispersabilidad, la elasticidad y la permeabilidad al agua. En particular, unas cantidades efectivas de materiales anfífilos tales como lípidos, fosfolípidos o fosfolípidos modificados, se pueden añadir a la emulsión preparada para la producción de dichas microcápsulas, con el fin de aumentar la estabilidad de las mismas.

ES 2 346 079 T3

Otros excipientes o aditivos, usados en particular para la preparación de microcápsulas, se pueden incorporar dentro de la envoltura, tales como agentes redispersantes intensificadores de la viscosidad.

Se pueden preparar unas microcápsulas que contienen polímeros biodegradables, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento US 5.711.933, el cual comprende (a) emulsionar una fase orgánica hidrófoba dentro de una fase acuosa de manera tal que se obtengan gotitas de dicha fase hidrófoba como una emulsión del tipo de aceite en agua en dicha fase acuosa; (b) añadir a dicha emulsión una solución de por lo menos un polímero en un disolvente volátil que es insoluble en la fase acuosa, de manera tal que dicho polímero forme una capa alrededor de dichas gotitas; (c) evaporar dicho disolvente volátil de manera tal que el polímero se deposite por precipitación interfacial alrededor de las gotitas que entonces formen unas perlas con un núcleo de dicha fase hidrófoba encapsulada por una membrana de dicho polímero, estando dichas perlas en suspensión en dicha fase acuosa; (d) eliminar dicha fase hidrófoba encapsulada por evaporación sometiendo dicha suspensión a una presión reducida, y (e) reemplazar dicha fase hidrófoba evaporada por un gas soluble.

Unas microcápsulas que contienen lípidos biodegradables se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento que se describe en el documento US 6.333.021, por dispersamiento de una mezcla de uno o más de los constituyentes sólidos de la envoltura de microcápsulas, disueltos en un disolvente orgánico, en una fase acuosa de vehículo, de manera tal que se produzca una emulsión del tipo de aceite en agua. La fase acuosa de la emulsión puede contener una cantidad efectiva de materiales anfífilos, que se usan para estabilizar a la emulsión.

Una cierta cantidad de un agente redispersante y/o de un agente crioprotector o lioprotector se añade luego a la emulsión de diminutas gotitas de la solución orgánica en la fase acuosa, antes de congelar a una temperatura situada por debajo de -30°C . Se puede usar cualquier conveniente agente redispersante, se prefieren agentes redispersantes seleccionados entre azúcares, una albúmina, una gelatina, una poli(vinil-pirrolidona) (PVP), un poli(alcohol vinílico) (PVA), un poli(etilenglicol) (PEG) y un copolímero de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno (p. ej. Pluronic[®], o Synperonic[®]) o mezclas de los mismos. Los agentes redispersantes que se añaden para evitar la aglomeración de las partículas son particularmente útiles cuando las microcápsulas están en la forma de polvos no coalescentes, secos y dispersables instantáneamente. Ejemplos de un agente crioprotector o lioprotector son, por ejemplo, aminoácidos, tales como glicina; hidratos de carbono; p. ej., un azúcar, tal como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa, glucosa o una ciclodextrina, o polisacáridos, tales como dextrano; o poliglicoles, tales como un poli(etilenglicol).

Luego la emulsión congelada es sometida a una presión reducida con el fin de efectuar la liofilización, es decir, la eliminación por sublimación del disolvente orgánico a partir de las gotitas y del agua de la fase de vehículo, y el producto liofilizado se pone en contacto luego con el gas deseado.

Las microcápsulas que son apropiadas para una composición del invento tienen típicamente una envoltura con un espesor de por lo menos 50 nm, de manera preferible de por lo menos 100 nm, hasta de unos pocos cientos de nanómetros (p. ej. de aproximadamente 600 nm). Tal como se ha observado por la entidad solicitante, el espesor de la envoltura es un parámetro que puede ser modulado para conferir a dicha microcápsula la deseada resistencia a unos altos valores de MI.

Se ha observado además que las deseadas propiedades de las microcápsulas pueden también ser moduladas mediante una selección apropiada del material que forma la envoltura, basándose en el conocimiento de los expertos en la especialidad a la vista de la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, cuando el material que forma la envoltura es un polímero, las deseadas propiedades se pueden obtener seleccionando un peso molecular apropiado de dicho polímero; típicamente, dicho peso molecular deberá ser preferiblemente de por lo menos 30 kDa (kiloDaltons), más preferiblemente de por lo menos 100 kDa e incluso más preferiblemente de por lo menos 300 kDa. Alternativamente, o además de ello, la resistencia a un MI predeterminado se puede aumentar por reticulación de las moléculas del material que forma la envoltura (p. ej. un lípido o un polímero de bajo peso molecular) y/o aumentando de manera apropiada el espesor de la envoltura.

En general, puede ser ventajoso utilizar para la envoltura unos materiales que son capaces de conferir una cierta rigidez a las microcápsulas.

La rigidez proporcionada por la envoltura, S_p , puede ser determinada por un análisis del mejor ajuste entre los espectros de atenuación medidos y calculados de las microvesículas (microburbujas o microcápsulas). Una atenuación es el resultado de una disipación de energía debida a una absorción y una diseminación mediante la propagación de la onda de ultrasonidos a través de un volumen relleno con una suspensión de microvesículas. Los espectros de atenuación se miden corrientemente usando la técnica de sustitución, como se ha descrito, por ejemplo, por Gorce JM, Arditi M y Schneider M. "Influence of bubbles size distribution of the echogenicity of ultrasound contrast agents: A study of SonoVue" [influencia de la distribución de tamaños de burbujas de la ecogenicidad de agentes de contraste por ultrasonidos: un estudio de SonoVue], Invest. Radiol., vol 35(11), páginas 661-671, 2000. Dicho brevemente, se mide la respuesta acústica de un reflector plano, p. ej. la pared trasera de un recipiente relleno con NaCl al 0,9%, y se usa como eco de referencia, $I_{ref}(\omega)$. Seguidamente el NaCl al 0,9% existente en el recipiente, es reemplazado por una suspensión con las microvesículas y se mide de nuevo la respuesta de la pared trasera, $I_{atten}(\omega)$. La relación de los dos resultados de mediciones da como resultado la atenuación determinada experimentalmente como una función de la frecuencia:

$$\alpha_{\text{exp}}(\omega) = \frac{I_{\text{atten}}(\omega)}{I_{\text{ref}}(\omega)}.$$

5 Los espectros de atenuación se pueden calcular usando modelos teóricos que son bien conocidos y han sido exten-
samente descritos en la bibliografía (p. ej. en la referencia antes citada de Gorce y colaboradores). Dicho brevemente,
basándose en una medición de la distribución de tamaños de las microvesículas, p. ej. con un aparato Coulter Mul-
tiszizer II (Coulter Electronics Ltd., Luton, Reino Unido), se calcula el espectro de atenuación para un valor inicial
10 de S_p . Un criterio de error para el análisis del mejor ajuste es calculado luego como el error medio cuadrático (RMS
acrónimo de Root Mean Square) entre espectros de atenuación experimentales y teóricos. Este error de atenuación se
puede escribir como

$$15 \quad \Delta\alpha_{\text{RMS}} = \sqrt{\frac{\sum_{\omega_i} |\alpha_{\text{exp}}(\omega_i) - \alpha_{\text{th}}(\omega_i)|^2}{N}},$$

20 en donde $\omega_i = [\omega_1, \dots, \omega_N]$ son las frecuencias muestreadas que se usan para el ajuste y $\alpha_{\text{th}}(\omega)$ es la atenuación
calculada en función de la frecuencia. La S_p que produce un error RMS mínimo para la distribución dada de tamaños
se considera como la mejor estimación.

De acuerdo con el presente invento, las microcápsulas preferidas son las que tienen un valor de S_p de por lo menos
aproximadamente 5 N/m, de manera preferible de por lo menos aproximadamente 8 N/m.

25 Para las mediciones de la atenuación, se puede usar la siguiente disposición. Dos transductores de elementos úni-
cos, de 7,5 MHz y 20 MHz (V3640 y V316, de Panametrics Inc., Waltham, MA) son propulsados por un pulsador
ultrasónico-receptor (5800PR, de Panametrics Inc., Waltham, MA) en el modo de pulso - eco (transmisión y recep-
ción). De esta manera, se cubre una banda de frecuencias que fluctúan entre 5 y 25 MHz. La salida del pulsador-
receptor es conectada a una entrada de 50 Ω de un osciloscopio digital (modelo DL4100, 10bit, 100MS/s, de Yokoga-
30 wa Electric Corp, Tokio, Japón). El pulsador-receptor y el osciloscopio se controlan a través de una conexión GPIB
por un ordenador personal (PC, acrónimo de Personal Computer). De esta manera, todas las etapas de la adquisición
se controlan por un programa lógico software (desarrollado internamente usando Delphi 4, Inprise Corp, Scotts Va-
lley, CA). Los espectros de Fourier de las señales adquiridas, el promediado y los cálculos de espectros de atenuación
35 son realizados también por este software. Los resultados y todos los parámetros de adquisición son guardados en el
PC. Todos los cálculos de modelación y el análisis del mejor ajuste se realizan con el programa lógico MATLAB[®]
software (v7.04, The Math Works Inc., Natick, MA).

40 Cualquiera que sea el material que forma la envolvente de cáscara rígida, la solicitante ha observado que, con el fin
de proporcionar una penetración efectiva del material genético dentro la célula, las microcápsulas de una composición
de acuerdo con el invento deberán tener una resistencia a un índice mecánico de 0,15, de manera preferible de por
lo menos 0,18 y de manera incluso más preferible de por lo menos 0,20. Preferiblemente, las microcápsulas no se
resisten a unos índices mecánicos más altos que aproximadamente 10, con el fin de evitar la necesidad de tener que
45 aplicar unas presiones acústicas que pueden causar un efecto excesivamente negativo sobre la viabilidad de las células
sometidas a dichas ondas de ultrasonidos.

Cualquier gas biocompatible, precursor de gas o mezcla de los mismos se puede emplear para rellenar las micro-
cápsulas de una composición del invento.

50 El gas puede comprender, por ejemplo, aire; nitrógeno; oxígeno; dióxido de carbono; hidrógeno; óxido nitroso;
un gas noble o inerte, tal como helio, argón, xenón o criptón; un gas radiactivo tal como Xe¹³³ o Kr⁸¹; un gas noble
hiperpolarizado tal como helio hiperpolarizado, xenón hiperpolarizado o neón hiperpolarizado; un hidrocarburo de
bajo peso molecular (que contiene, p. ej., hasta 7 átomos de carbono), por ejemplo un alcano tal como metano, etano,
propano, butano, isobutano, pentano o isopentano, un cicloalcano tal como ciclobutano o ciclopentano, un alqueno tal
55 como propeno, buteno o isobuteno, o un alquino tal como acetileno; un éter; una cetona; un éster, gases halogenados,
preferiblemente gases fluorados; tales como hidrocarburos de bajo peso molecular como tales o halogenados, fluorados
o perfluorados (que contienen p. ej. hasta 7 átomos de carbono); o una mezcla de cualquiera de los precedentes.
Cuando se usa un hidrocarburo halogenado, preferiblemente por lo menos alguno, más preferiblemente la totalidad,
de los átomos de halógeno en dicho compuesto son átomos de flúor.

60 Se prefieren gases fluorados, en particular gases perfluorados. Los gases fluorados incluyen unos materiales que
contienen por lo menos un átomo de flúor, tales como, por ejemplo, hidrocarburos fluorados (compuestos orgánicos
que contienen uno o más átomos de carbono y de flúor); hexafluoruro de azufre; cetonas fluoradas, preferiblemen-
te perfluoradas, tales como perfluoroacetona; y éteres fluorados, preferiblemente perfluorados, tal como dietil-éter
perfluorado. Compuestos preferidos son unos gases perfluorados, tales como SF₆ o perfluorocarbonos (hidrocarburos
65 perfluorados), es decir unos hidrocarburos en los que la totalidad de los átomos de hidrógeno han sido reemplazados
por átomos de flúor, de los que se conoce que forman unas suspensiones de microburbujas particularmente estables,
tal como se describe, por ejemplo en el documento de patente europea EP 0554 213.

ES 2 346 079 T3

El término perfluorocarbono incluye perfluorocarbonos saturados, insaturados y cíclicos. Ejemplos de perfluorocarbonos biocompatibles y fisiológicamente aceptables son: perfluoroalcanos, tales como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropanos, perfluorobutanos (p. ej. perfluoro-n-butano, opcionalmente en mezcla con otros isómeros tales como perfluoro-isobutano), perfluoropentanos, perfluorohexanos o perfluoroheptanos; perfluoroalquenos, tales como perfluoropropeno, perfluorobutenos (p. ej. perfluorobut-2-eno) o perfluorobutadieno; perfluoroalquinos (p. ej. perfluoro-but-2-ino); y perfluorocicloalcanos (p. ej. perfluorociclobutano, perfluorometilciclobutano, perfluorodimetilciclobutanos, perfluorotrimetilciclobutanos, perfluorociclopentano, perfluorometilciclopentano, perfluorodimetilciclopentanos, perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano y perfluorocicloheptano). Los perfluorocarbonos preferidos tienen la fórmula C_nF_{2n+2} , en la que n es de 1 a 12, de manera preferible de 2 a 10, de manera sumamente preferible de 3 a 8 y de manera incluso más preferible de 3 a 6. Los perfluorocarbonos apropiados incluyen, por ejemplo, CF_4 , C_2F_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} , C_5F_{12} , C_6F_{14} , C_7F_{16} , C_8F_{18} , y C_9F_{20} .

Gases particularmente preferidos son SF_6 o perfluorocarbonos seleccionados entre CF_4 , C_2F_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} o mezclas de los mismos; se prefieren particularmente SF_6 , C_3F_8 o C_4F_{10} .

También puede ser ventajoso usar una mezcla de cualquiera de los anteriores gases en cualquier relación. Por ejemplo, la mezcla puede comprender un gas convencional, tal como nitrógeno, aire o dióxido de carbono y un gas fluorado, tal como hexafluoruro de azufre o un perfluorocarbono tal como arriba se ha indicado. Ejemplos de apropiadas mezclas de gases se pueden encontrar, por ejemplo, en el documento WO 94/09829. Se prefieren particularmente las siguientes combinaciones: una mezcla de los gases (A) y (B), en la que el gas (B) es un gas fluorado, seleccionado preferiblemente entre SF_6 , CF_4 , C_2F_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} , C_5F_{12} o sus mezclas, y (A) se selecciona entre aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono o mezclas de los mismos. La cantidad del gas (B) puede representar desde aproximadamente 0,5% hasta aproximadamente 95% v/v (volumen/volumen) de la mezcla total, de manera preferible de aproximadamente 5% a 80%.

En ciertas circunstancias puede ser deseable incluir un precursor de una sustancia gaseosa (es decir, un material que es capaz de ser convertido en un gas *in vivo*). Preferiblemente, el precursor gaseoso y el gas que se deriva del mismo son fisiológicamente aceptables. El precursor gaseoso puede ser activado por el pH, foto-activado, activado por las temperaturas, etc. Por ejemplo, ciertos perfluorocarbonos se pueden usar como precursores gaseosos activados por las temperaturas. Estos perfluorocarbonos, tales como perfluoropentano o perfluorohexano, tienen una temperatura de transición de fases líquida/gaseosa situada por encima de la temperatura ambiente (o la temperatura a la que los agentes son producidos y/o almacenados) pero por debajo de la temperatura corporal; por lo tanto, ellos experimentan una transición de fases líquida/gaseosa y son convertidos en un gas dentro del cuerpo humano.

La formulación del invento comprende además un agente bioactivo tal como antes se ha definido.

De acuerdo con una forma preferida de realización, el agente bioactivo comprendido en una composición del invento es un material genético. El término de material genético incluye dentro de su significado cualquier ácido nucleico (o secuencia de nucleótidos) que se puede usar o bien como tal o para expresar un/una correspondiente aminoácido, péptido o proteína, una vez que ha sido suministrado dentro de una célula. El material genético suministrado de acuerdo con el método del invento incluye en particular ácidos nucleicos, ARN (ácidos ribonucleicos) y ADN (ácidos desoxirribonucleicos), de origen ya sea natural o sintético, incluyendo ARN y ADN recombinantes, ARN antisentido o de antígeno. El término se refiere tanto a la secuencia de nucleótidos (gen) como tal o preferiblemente al gen incorporado dentro de un vehículo apropiado. Vehículos apropiados para soportar y llevar los genes incluyen vectores de expresión tales como plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC, acrónimo de Yeast Artificial Chromosomes), cromosomas artificiales bacterianos (BAC, acrónimo de Bacterial Artificial Chromosomes), cromosomas artificiales humanos (HAC, acrónimo de Human Artificial Chromosomes), un oligonucleótido quimérico que comprende residuos de ARN y ADN en una conformación de dúplex, una ribozima de horquilla de pelo o de cabeza de martillo, un ARN interferente pequeño (siRNA acrónimo de small interfering RNA), casetes de expresión de ARN interferente pequeño, ribonucleasas de ADN, un transposón, ARN y ADN de hebras tanto únicas como dobles y compuestos análogos a los mismos, tales como un fosforotioato o un fosforoditioato oligodesoxinucleótido.

Dicho material genético se puede usar, por ejemplo, para reemplazar genes ausentes o en defecto, para catalizar la destrucción de células cancerosas o causar que las células cancerosas se reviertan de retorno a la forma de un tejido normal, para intensificar o estimular una respuesta inmunitaria, para promover el crecimiento de un nuevo tejido o estimular la regeneración de un tejido dañado, para hacer posible la reparación de genes mutados o dañados, para catalizar una disociación endorribonucleolítica, para bloquear la expresión de genes por formación de un triplex o para bloquear la traducción de un ARNm (ARN mensajero).

Ejemplos de un material genético que se puede suministrar usando las microcápsulas del presente invento incluyen un ADN que codifica por lo menos una parte de los siguientes genes; el regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística destinado a tratar la fibrosis quística (CFTR, acrónimo de cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, que regula el cloruro intracelular), distrofina para tratar la distrofia muscular, adenosina desaminasa para tratar una inmunodeficiencia grave, receptores de HDL (lipoproteínas de alta densidad) para el tratamiento de hipercolesterolemia, ApoE para el tratamiento de la aterosclerosis, el Factor VIII (de hemofilia A, que regula la coagulación de la sangre), el Factor IX (de hemofilia B, que regula la coagulación de la sangre), un gen que expresa citocinas tales como la interleucina-2 o la interleucina-4 o la interleucina-7, o la interleucina-12, o el factor de necrosis de tumores α ($TNF\alpha$) o linfocitos que se infiltran en tumores (TIL, acrónimo de tumor-infiltrating lymphocytes), o el HLA-

B7, para estimular el sistema inmunitario con el fin de aniquilar células cancerosas, o el supresor de tumores p53 o timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK, acrónimo de herpes simplex virus thymidine kinase) se pueden proporcionar para tratar un cáncer haciendo que las células cancerosas experimenten una muerte celular, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, acrónimo de vascular endothelial growth factor) o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, acrónimo de hepatocyte growth factor) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, acrónimo de fibroblast growth factor) se pueden proporcionar para tratar enfermedades cardiovasculares por promoción de una angiogénesis, y la alfa-hormona estimuladora de melanocitos (alfa-MSH, acrónimo de melanocyte-stimulating hormone) se puede proporcionar para tratar una inflamación, la hormona concentradora de melanina para la terapia contra la obesidad y el VIH env (de envoltura) o la interferencia de ARN se puede proporcionar para tratar una infección por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). La formulación “por lo menos una parte de” tal como se utiliza en el presente contexto, significa que el gen entero no necesita ser representado por el oligonucleótido, siempre y cuando que la parte representada del gen proporcione un bloque efectivo para la expresión de genes. Si se desea, se puede suministrar más de un material genético usando las microcápsulas. Además, para algunas aplicaciones, un ácido nucleico puede ser conjugado con una señal de localización nuclear (NLS, acrónimo de nuclear localization signal) con el fin de intensificar el suministro nuclear de ADN plasmídico.

Un material genético se puede usar o bien como tal en una composición del invento o puede ser asociado con unos apropiados vehículos víricos o no víricos (p. ej. para limitar o evitar la degradación por nucleasas de un ácido nucleico en el torrente sanguíneo). Los vehículos víricos comprenden retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de herpes, virus de vaccinia, virus de la anemia infecciosa equina (EIAV, acrónimo de equine infectious anemia virus), alfa-virus Sindbis y Semliki Forest, virus de Ebstein Barr (EBV, Ebstein Barr Virus). Esto comprende también unos virus con un tropismo alterado, obtenidos por modificación genética de la proteína cápsida o una modificación química de la superficie de la cápsida con polímeros hidrófilos y el ligando para dirección a una diana.

Los vehículos no víricos se pueden seleccionar entre lípidos catiónicos conocidos (es decir, unos lípidos que son portadores de una carga eléctrica positiva neta global) o unos polímeros que se pueden asociar con unas secuencias de nucleótidos cargadas negativamente.

Ejemplos de lípidos catiónicos apropiados que se pueden usar (para formar los denominados lipoplejos) son, por ejemplo derivados de etil-fosfatidilcolina, en particular ésteres de etil-fosfatidilcolina con ácidos grasos, tales como 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etil-fosfocolina (Ethyl-DSPC o DSEPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etil-fosfocolina (Ethyl-DPPC o DPEPC). Ejemplos de lípidos cargados positivamente son sales de alquil-amonio con un ion con carga de signo contrario de un halógeno (p. ej. cloro o bromo) que comprende por lo menos una cadena de alquilo de (C₁₀-C₂₀), preferiblemente de (C₁₄-C₁₈), tal como, por ejemplo, cloruro de estearil-amonio, cloruro de hexadecil-amonio, bromuro de dimetil-dioctadecil-amonio (DDAB), bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB). Otros ejemplos de lípidos cargados positivamente son sales de amonio terciarias o cuaternarias con un ion con carga de signo contrario de un halógeno (p. ej. cloro o bromo) que comprende una o preferiblemente dos cadenas de acilo de (C₁₀-C₂₀), preferiblemente de (C₁₄-C₁₈), enlazada(s) al átomo de N a través de un puente de alquileo de (C₃-C₆), tal como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-3-trimetil-amonio-propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetil-amonio-propano (DPTAP), 1,2-dioleoil-3-trimetil-amonio-propano (DOTAP), 1,2-diestearoil-3-dimetil-amonio-propano (DSDAP).

Se pueden usar también lípidos catiónicos sintéticos, tales como los que se describen en la patente de los EE.UU. N° 5.830.430, que se incorpora aquí por su referencia en su totalidad. Éstos incluyen, por ejemplo,

tetrayoduro de N,N'-bis-(dodecilaminocarbonilmetileno)-N,N'-bis(β-N,N,N-trimetilamonioetil-aminocarbonilmetileno)etilendiamina;

hexayoduro de N,N''-bis-(hexadecilaminocarbonilmetileno)-N,N',N''-tris(β-N,N,N-trimetilamonio-etilaminocarbonilmetileno)etilendiamina;

tetrayoduro de N,N'-bis(dodecilaminocarbonilmetileno)-N,N''-bis(β-N,N,N-trimetilamonio-etilaminocarbonilmetileno)ciclohexileno-1,4-diamina,

heptayoduro de 1,1,7,7-tetra-(β-N,N,N,N-tetrametilamonio-metilaminocarbonil-metileno)-3-hexadecilaminocarbonilmetileno-1,3,7-triaza-heptano; y

tetrayoduro de N,N,N',N'-tetra(fosfoetanolaminocarbonilmetileno)diethylentriammina, dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS);

trifluoroacetato de 2-3-dioleiloxi-N-(2-(esperminacarboxiamido)etil)-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA); dipalmitoil-fosfatidil-etanolamidoespermina (DPPE);

derivados de glicina y betaína tales como el GB12; lípidos catiónicos portadores de una cadena doble insaturada basada en el ácido 3,4-dihidroxi-benzoico (MVL5); lípidos que contienen guanidina, tales como el bis-guanidinio-tren-colesterol (BGTC), derivados de colesterol tales como la colesteril-3β-carboxiamidoetileno-dimetilamina (DC-Chol).

Opcionalmente, el ácido nucleico puede también ser condensado previamente con sulfato de protamina (para formar las denominadas “partículas LDP”).

Los anteriores lípidos catiónicos pueden también ser formulados en combinación con lípidos neutros y/o cargados negativamente, que incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolinas tales como dilauroil-fosfatidilcolina (DALC), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC); diaraquidoil-fosfatidilcolina (DAPC), diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC) o dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC); fosfatidiletanolaminas tales como dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dioleil-fosfatidiletanolamina (DOPE), diaraquidoil-fosfatidiletanolamina (DAPE) o dilinoleil-fosfatidiletanolamina (DLPE); fosfatidilserinas, tales como dimiristoil-fosfatidilserina (DMPS), diaraquidoil-fosfatidilserina (DAPS), dipalmitoil-fosfatidilserina (DPPS), diestearoil-fosfatidilserina (DSPS), dioleoil-fosfatidilserina (DOPS); derivados de ácidos fosfatídicos, tales como ácido dipalmitoil-fosfatídico (DPPA), ácido dimiristoil-fosfatídico (DMPA), ácido diestearoil-fosfatídico (DSPA), ácido diaraquidoil-fosfatídico (DAPA) y sus sales de metales alcalinos; fosfatidilglicérol, tales como dimiristoil-fosfatidilglicérol (DMPG) y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoil-fosfatidilglicérol (DPPG) y sus sales de metales alcalinos, diestearoil-fosfatidilglicérol (DSPG) y sus sales de metales alcalinos, dioleoil-fosfatidilglicérol (DOPG); fosfatidilinositales, tales como dilauroil-fosfatidilinositol (DLPI), diaraquidoil-fosfatidilinositol (DAPI), dimiristoil-fosfatidilinositol (DMPI), dipalmitoil-fosfatidilinositol (DPPI), diestearoil-fosfatidilinositol (DSPPI), dioleoil-fosfatidilinositol (DOPI); fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, tales como DMPE-PEG1000, DMPE-PEG2000, DMPE-PEG3000, DMPE-PEG4000, DMPE-PEG5000, DPPE-PEG1000, DPPE-PEG2000, DPPE-PEG3000, DPPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DAPE-PEG1000, DAPE-PEG2000, DAPE-PEG3000, DAPE-PEG4000 o DAPEPEG5000; sales de ácidos biliares tales como sales de ácido cólico, sales de ácido desoxicólico o sales de ácido glicocólico; y sales de ácidos grasos de (C₁₂-C₂₄), preferiblemente de (C₁₄-C₂₂), tales como, por ejemplo una sal de ácido palmítico, una sal de ácido esteárico, una sal de 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicérol o una sal de 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicérol; colesteroil, o lípidos polimerizados (tales como unos lípidos que comprenden por ejemplo restos de cisteína o de tiol para hacer posible una policondensación oxidante de lípidos).

Además, también se pueden emplear ventajosamente los derivados fluorados de los anteriores lípidos.

El vehículo obtenido que contiene el ácido nucleico, o bien puede estar en la forma de un único complejo de material genético con el lípido (lipoplejo), o una pluralidad de complejos pueden ser asociados conjuntamente para formar unas estructuras “supramoleculares” tales como, por ejemplo, micelas o liposomas.

Alternativamente, o además de las anteriores formulaciones de lípidos, ciertos ácidos nucleicos pueden también ser asociados con polímeros (para formar los/las denominados/as poliplejos o nanopartículas poliméricas). Ejemplos de polímeros apropiados son polímeros o copolímeros sintéticos que se preparan a partir de unos monómeros seleccionados entre el conjunto que consiste en ácido acrílico, ácido metacrílico, etilenimina, ácido crotónico, acrilamida, acrilato de etilo, metacrilato de metilo, metacrilato de 2-hidroxi-etilo, ácido láctico, ácido glicólico, ϵ -caprolactona, acroleína, un cianoacrilato, un cianometacrilato, bisfenol A, epiclorhidrina, acrilatos de hidroxialquilo, un siloxano, un dimetil-siloxano, óxido de etileno, etilenglicol, metacrilatos de hidroxialquilo, acrilamidas substituidas en N, metacrilamidas substituidas en N, N-vinil-2-pirrolidona, 2,4-pentadien-1-ol, acetato de vinilo, acrilonitrilo, estireno, p-amino-estireno, p-amino-bencil-estireno, estireno sulfonato de sodio, 2-sulfoxi-etil-metacrilato de sodio, vinil-piridina, metacrilatos de aminoetilo, lactidas, y cloruro de 2-metacrilofloxi-trimetil-amonio. Ejemplos de (co-)polímeros sintéticos son, por ejemplo, un poli(ácido acrílico), una poli(etilenimina), un poli(ácido metacrílico), un poli(metacrilato de metilo), un poli(cianometacrilato), una dendrímeros de poli(amido-aminas), dendrímeros de compuestos orgánicos de fósforo, un polisiloxano, un poli(dimetil-siloxano), un poli(ácido láctico), una poli(ϵ -caprolactona), una resina epoxídica, una poliamida, un polivinilideno-poliacrilonitrilo, un polivinilideno-poliacrilonitrilo-poli(metacrilato de metilo), polímeros de poli(lactida-co-glicolida) (tales como polímeros de poli-(d-L-lactida-co-glicolida), nylon y un poliestireno-poliacrilonitrilo así como monómeros reticuladores polifuncionales tales como N,N'-metilen-bisacrilamida, dimetacrilatos de etilenglicol, dimetacrilato de 2,2'-(p-fenilendioxo)-di-etilo, divinil-benceno, trietil-amina y metilen-bis-(4-fenil-isocianato), incluyendo combinaciones de los mismos, tales como compuestos polivinílicos (tales como, por ejemplo un poli(alcohol vinílico) (PVA), un poli(cloruro de vinilo) y una poli(vinil-pirrolidona)), un poliestireno, poli(ácidos lácticos), hidrocarburos fluorados, carbonos fluorados (tales como, por ejemplo, poli(tetrafluoroetileno), y poli(metacrilato de metilo), y derivados de los mismos. También se incluyen compuestos anfífilos que se componen de polímeros catiónicos que han sido modificados covalentemente con grupos hidrófobos (p. ej. restos de lípidos tales como palmitoil) y/o grupos hidrófilos (de un poli(etilenglicol)). Los polímeros pueden opcionalmente estar reticulados, si se desea, para intensificar, por ejemplo, la estabilidad de las nanopartículas. Esto se podría conseguir mediante reticulación de polímeros portadores de cisteína mediante una policondensación oxidante.

Ejemplos de polímeros naturales incluyen hidratos de carbono o polisacáridos que se presentan en la naturaleza tales como, por ejemplo, polímeros de, o formados a partir de, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tales como, por ejemplo, inulina), levano, fucoidano, carragenano, galatocarolosa, ácido péptico, pectinas, incluyendo amilosa, pululano, glicógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, dextrina, dextrosa, una polidextrosa, pustulano, quitina, quitosano, agarosa, queratano, condroitano, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma de xantano, un almidón, heparina (incluyendo, por ejemplo, sulfato de heparina o sulfato de heparitina), y otros diversos homopolímeros o heteropolímeros naturales, tales como los que contienen una o más de las/las siguientes aldosas, cetosas, ácidos o aminas: eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrusosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, manitol,

sorbitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neuramínico, y derivados de los mismos que se presentan en la naturaleza. Correspondientemente, unos apropiados polímeros naturales incluyen, por ejemplo, proteínas tales como una albúmina, un colágeno y una gelatina. Ejemplos de polímeros semi-sintéticos incluyen carboximetil-celulosa, hidroximetil-celulosa, hidroxipropil-metil-celulosa, metil-celulosa y metoxi-celulosa.

El tiempo de permanencia del vehículo (así como de las microcápsulas) en la circulación sistémica se puede ajustar (preferiblemente aumentar) incorporando en él unos apropiados materiales poliméricos, incluyendo, por ejemplo, polietilenos (tales como, por ejemplo, un poli(etilenglicol), un poli(oxietileno) y un poli(tereftalato de etileno), polipropilenos (tales como, por ejemplo, un poli(propilenglicol)), copolímeros de poli(oxietileno) y de poli(oxipropileno), incluyendo copolímeros de bloques de poli(oxietileno) y poli(oxipropileno), derivados de poli(oxialquileo) de poli(etilenglicol), tales como, por ejemplo la clase de compuestos citados como Pluronic[®], disponibles comercialmente de BASF, Parsippany, N.J.).

Igual que para los lipoplejos, también se pueden formular poliplejos como entidades singulares únicas o en estructuras más complejas tales como micelas o liposomas. Además de composiciones formuladas a partir de lípidos y/o polímeros, los métodos del presente invento pueden implicar también unas composiciones y unas vesículas que comprenden péptidos catiónicos tales como el péptido KALA (derivado de la subunidad HA-2 de influenza), melitina, TAT. Además, también están previstas unas formulaciones que comprenden combinaciones de cualquiera de los anteriores lípidos y polímeros. Por ejemplo un vehículo de genes puede incluir unos lipopoliplejos, en los que el material genético está condensado con un polication y atrapado dentro de liposomas aniónicos o neutros.

De acuerdo con una forma de realización alternativa, dicho agente bioactivo es un fármaco, que incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, tales como vincristina, vinblastina, vindesina, busulfano, clorambucil, espiroplatino, cisplatino, carboplatino, metotrexato, adriamicina, mitomicina, bleomicina, bleomicina, citosina arabinósido, arabinosil adenina, mercaptopurina, mitotano, procarbazona, dactinomicina (antinomicina D), daunorrubicina, hidrocloruro de doxorubicina, taxol, plicamicina, aminoglutetimida, estramustina, flutamida, leuprolida, acetato de megestrol, tamoxifeno, testolactona, trilostano, amsacrina (m-AMSA), asparaginasa (L-asparaginasa), etoposido, los interferones α -2a y 2b, productos sanguíneos tales como las hematóporfirinas o derivados de los precedentes; agentes modificadores de la respuesta biológica, tales como muramil - péptidos; agentes antifúngicos, tales como ketoconazol, nistatina, griseofulvina, flucitosina, miconazol o amfotericina B; hormonas o compuestos análogos a hormonas, tales como una hormona del crecimiento, la hormona estimuladora de melanocitos, estradiol, dipropionato de beclometasona, betametasona, acetato de cortisona, dexametasona, flunisolida, hidrocortisona, metil-prednisolona, acetato de parametasona, prednisolona, prednisona, triamcinolona o acetato de fludrocortisona; vitaminas, tales como cianocobalamina o retinoides; enzimas, tales como una fosfatasa alcalina o manganeso superóxido dismutasa; agentes antialérgicos, tales como amalexano; agentes anticoagulantes, tales como warfarina, fenprocoumona o heparina; agentes antitrombóticos; fármacos circulatorios, tales como propranolol; agentes potenciadores metabólicos, tales como glutatión; agentes antituberculosos, tales como ácido p-amino-salicílico, isoniazida, sulfato de capreomicina, ciclohexina, etambutol, etionamida, pirazinamida, rifampina o sulfato de estreptomycin; agentes antivíricos, tales como aciclovir, amantadina, azidotimidina, ribavirina o vidarabina; agentes dilatadores de los vasos sanguíneos, tales como diltiazem, nifedipina, verapamil, tetranitrato de eritritol, dinitrato de isosorbida, nitroglicerina o tetranitrato de pentaeritritol; antibióticos, tales como dapsona, cloranfenicol, neomicina, cefacloro, cefadroxil, cefalexina, cefradina, eritromicina, clindamicina, lincomicina, amoxicilina, ampicilina, bacampicilina, carbenicilina, dicloxacilina, ciclacilina, picloxacilina, hetacilina, meticilina, nafcilina, penicilina o tetraciclina; agentes antiinflamatorios, tales como diflunisal, ibuprofeno, indometacina, meclufenamato, ácido mefenámico, naproxeno, fenilbutazona, piroxicam, tolmetina, aspirina o salicilatos; agentes antiprotzoicos, tales como cloroquina, metronidazol, quinina o antimonio de meglumina; agentes antirreumáticos, tales como penicilamina; agentes narcóticos, tales como paregoric; agentes opiáceos, tales como codeína, morfina u opio; glucósidos cardiacos, tales como deslanesida, digitoxina, digoxina, digitalina o digitalis; agentes bloqueadores neuromusculares, tales como mesilato de atracurio, trietoyoduro de galamina, bromuro de hexafluorenio, yoduro de metocurina, bromuro de pancuronio, cloruro de succinilcolina, cloruro de tubocurarina o bromuro de vecuronio; agentes sedantes, tales como amobarbital, amobarbital sódico, aprobarbital, butabarbital sódico, hidrato de cloral, etoclorovinol, etinamato, hidrocloruro de flurazepam, glutetimida, hidrocloruro de metotrimeprazina, metiprilón, hidrocloruro de midazolam, paraldehído, pentobarbital, secobarbital sódico, talbutal, temazepam o triazolam; agentes anestésicos locales, tales como bupivacaína, cloroprocaína, etidocaína, lidocaína, mepivacaína, procaína o tetracaína; agentes anestésicos generales tales como droperidol, etomidato, citrato de fentanil con droperidol, hidrocloruro de ketamina, metohexital sódico o tiopental y sales farmacéuticamente aceptables (p. ej. sales por adición de ácidos tales como el hidrocloruro o hidrobromuro o sales de bases tales como sales de sodio, calcio o magnesio) o derivados (p. ej. acetatos) de los mismos; y agentes radioquímicos, p. ej. que comprenden emisores alfa, beta o gamma tales como, por ejemplo, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y o ¹³¹I.

Los anteriores fármacos pueden estar presentes como tales en la composición del invento o preferiblemente son asociados con unos componentes estabilizadores, para formar p. ej. micelas o liposomas. Ejemplos de compuestos apropiados son fosfolípidos, incluyendo diésteres con ácidos grasos de fosfatidilcolina, etil-fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o esfingomielina; fosfolípidos modificados con PEG, incluyendo en particular fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG; sales de amonio, tales como las anteriormente enumeradas, que comprenden una o preferiblemente dos cadenas de acilo de (C₁₀-C₂₀), preferiblemente de (C₁₄-C₁₈), enlazadas al átomo de N a través de un puente de alquileo de (C₃-C₆), tales como 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-

ES 2 346 079 T3

propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP), 1,2-dioleoil-3-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (DSDAP); sales de ácidos grasos, preferiblemente sales de metales alcalinos, en particular de sodio, tales como palmitato de sodio, estearato de sodio, oleato de sodio, linoleato de sodio, dodecanoato de sodio, una sal de sodio de 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerato o una sal de sodio de 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol. Se pueden usar también agentes tensioactivos poliméricos, tales como, por ejemplo, poli(óxidos de etileno) (PEO), tales como un PEO - n-alkil de (C₈-C₁₆)-monoéter, un n-alkil de (C₈-C₁₀)-fenil PEO, tetrametilbutilfenil PEO, un PEO polisorbato, siendo vendidos estos PEO bajo los nombres comerciales registrados de Brij[®], Lubrol[®], Triton[®], Nonidet[®] o Tween[®]; copolímeros de bloques tales como copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno (p. ej. Pluronic[®] o Synperonic[®]), que tienen preferiblemente un PM (peso molecular) desde aproximadamente 3.000 a 20.000 daltones, preferiblemente de desde 5.000 a 15.000 daltones; derivados de azúcares tales como un alkil de (C₆-C₁₀)-β-D-glucopiranosido, un alkil de (C₈-C₁₂)-β-D-maltósido; un alkil de (C₈-C₁₆)-dimetilamonio-propano-sulfonato; y ácidos biliares y derivados de los mismos, tales como colato de sodio o desoxicolato de sodio.

De acuerdo con una forma preferida de realización del invento, un fármaco se puede suministrar por vía local en combinación con un material genético, permitiendo de esta manera una terapia farmacéutica/genética combinada del paciente (p. ej. en el caso de un tratamiento de tumores).

Cualquiera que sea el vehículo empleado para asociar el agente bioactivo, es importante que una parte relevante del resultante "vehículo bioactivo" (es decir el vehículo asociado con el agente bioactivo) no sea incorporada establenente dentro de la envoltura de las microcápsulas ni asociada con ésta, de manera tal que la mayor cantidad del material genético esté libre para penetrar en la célula después de una aplicación de ultrasonidos y de un estallido de las microcápsulas.

Los vehículos bioactivos se preparan tal como es conocido en la especialidad. Preferiblemente, ellos se obtienen como unos materiales liofilizados, que han de ser reconstituídos antes del uso con un apropiado vehículo fisiológicamente aceptable.

Por ejemplo, unos vehículos bioactivos en la forma de micelas se pueden preparar dispersando el agente bioactivo y el lípido o compuesto polimérico en un vehículo líquido acuoso, y opcionalmente agitando la mezcla. Ejemplos de apropiados vehículos líquidos son agua, una solución salina (cloruro de sodio al 0,9%), una solución salina tamponada con fosfato (10 mM, de pH 7,4), un tampón HEPES (20 mM de pH 7,4), glucosa al 5% p/p (peso/peso) en agua. Por ejemplo los compuestos anteriores pueden ser dispersados en una concentración de desde aproximadamente 1 hasta 100 mg/ml en un líquido acuoso y disueltos por medio de agitación o sonicación.

Las micelas pueden ser luego almacenadas como una dispersión acuosa (p. ej., en el vehículo acuoso que se ha usado para su preparación) antes de ser administradas o añadidas y mezcladas con una suspensión que contiene microcápsulas. Alternativamente, la suspensión de micelas se puede liofilizar de acuerdo con técnicas convencionales, con el fin de eliminar el líquido y almacenar el producto seco final para los usos subsiguientes.

Los anteriores vehículos se pueden modificar adicionalmente para incluir un apropiado ligando para dirección a una diana. Esta modificación adicional permite que el vehículo, que es portador del agente bioactivo, se fije selectivamente a una célula, un tejido o un órgano que se desee, a la o al que será suministrado el agente bioactivo.

El término "ligando para dirección a una diana" incluye dentro de su significado cualquier compuesto, resto o residuo que tenga, o sea capaz de promover, una actividad de dirección a una diana del vehículo que comprende el material genético hacia cualquier sitio biológico o patológico dentro de un cuerpo vivo. Las dianas con las que se puede asociar el ligando para dirección a una diana incluyen tejidos, tales como, por ejemplo, un tejido de miocardio (incluyendo células de miocardio y cardiomiocitos), tejidos membranosos (incluyendo endotelio y epitelio), láminas, un tejido conjuntivo (incluyendo tejido intersticial) o tumores; coágulos de sangre; y receptores, tales como, por ejemplo receptores de superficies celulares para hormonas peptídicas, agentes neurotransmisores, antígenos, fragmentos del complemento, inmunoglobulinas y receptores citoplasmáticos para hormonas esteroides.

Los materiales o las sustancias que pueden servir como ligandos para dirección a una diana incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, proteínas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas de receptores, moléculas de fijación a receptores, glicoproteínas y lectinas; péptidos, incluyendo oligopéptidos y polipéptidos; agentes peptidomiméticos; sacáridos, incluyendo mono- y poli-sacáridos; vitaminas; esteroides, compuestos análogos a esteroides, hormonas, cofactores, agentes bioactivos y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos.

Ejemplos de apropiadas/os dianas y ligandos para dirección a una diana se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n° 6.139.819.

El ligando para dirección a una diana puede ser un compuesto *per se*, que se añade y mezcla con los otros componentes del vehículo, o puede ser un compuesto que está unido a una molécula incluida en el vehículo.

En una forma de realización preferida, el ligando para dirección a una diana puede ser unido a una molécula del vehículo a través de un enlace covalente. En dicho caso, el resto reactivo específico, que necesita estar presente en la molécula, dependerá del particular ligando para dirección a una diana, que se ha de acoplar con él. Como un ejemplo,

si el ligando para dirección a una diana puede ser enlazado a la molécula a través de un grupo amino, unos apropiados restos reactivos para la molécula pueden ser grupos de isotiocianato (que formarán un enlace de tiourea), ésteres reactivos (para formar un enlace de amida), grupos de aldehído (para la formación de un enlace de imina que ha de ser reducido para dar un enlace de alquilamina), etc; si el ligando para dirección a una diana puede ser enlazado a la molécula a través de un grupo de tiol, unos apropiados restos reactivos complementarios para la molécula incluyen derivados de haloacetilo o maleimidias (para formar un enlace de tioéter); y si el ligando para dirección a una diana puede ser enlazado a la molécula a través de un grupo carboxílico, apropiados restos reactivos para la molécula pueden ser aminas e hidrazidas (para formar enlaces de amidas o alquilamidas). Con el fin de unir covalentemente un deseado ligando para dirección a una diana, por lo menos una parte de los compuestos que forman el vehículo deberá contener por lo tanto un apropiado resto reactivo y el ligando para dirección a una diana que contiene la funcionalidad complementaria será enlazado a él de acuerdo con técnicas conocidas; p. ej. añadiéndolo a una dispersión acuosa que comprende los apropiados componentes del vehículo. El compuesto puede ser combinado con el deseado ligando para dirección a una diana antes de preparar el vehículo, y la combinación así obtenida se puede usar en el proceso de preparación del vehículo. Alternativamente, el ligando para dirección a una diana puede ser enlazado al respectivo compuesto durante el proceso de preparación del vehículo o puede ser enlazado directamente al compuesto que ya está incorporado en el vehículo.

De acuerdo con una forma alternativa de realización, el ligando para dirección a una diana puede también ser asociado de una manera apropiada con el vehículo mediante una interacción física y/o electrostática. Como un ejemplo, un resto funcional que tiene una afinidad y una selectividad altas para un resto complementario, se puede introducir dentro de una molécula del vehículo, mientras que el resto complementario será enlazado al ligando para dirección a una diana. Por ejemplo, un resto de avidina (o estreptavidina, neutravidina o de Extravidin[®]) (que tiene una alta afinidad para biotina) puede ser enlazada covalentemente a un fosfolípido mientras el resto de biotina complementario puede ser incorporado en un apropiado ligando para dirección a una diana, p. ej. un péptido o un anticuerpo. El ligando para dirección a una diana, marcado con biotina, será de esta manera asociado con el fosfolípido marcado con avidina del vehículo por medio del sistema de acoplamiento entre avidina y biotina. Alternativamente, tanto el fosfolípido como el ligando para dirección a una diana pueden ser provistos de un resto de biotina y subsiguientemente acoplados unos con otros por medio de avidina (que es un componente bifuncional capaz de formar un puente entre las dos moléculas de biotina). Ejemplos de un acoplamiento entre biotina/avidina de fosfolípidos y péptidos se describen también en el documento US 6.139.819, que antes se ha citado. Alternativamente, unas interacciones de van der Waal's, interacciones electrostáticas y otros procesos de asociación pueden asociar o unir el ligando para dirección a una diana con las moléculas deseadas.

De acuerdo con una forma alternativa de realización, el ligando para dirección a una diana puede ser un compuesto que se ha añadido y mezclado con los componentes que forman el vehículo, para ser incorporado eventualmente dentro del vehículo, tal como, por ejemplo, un lipopéptido como se describe p. ej. en los documentos WO 98/18501 o 99/55383.

Alternativamente, se puede producir primeramente un vehículo, que comprende un compuesto que tiene un apropiado resto capaz de interactuar con un correspondiente resto complementario de un ligando para dirección a una diana; después de esto el deseado ligando para dirección a una diana es añadido a una suspensión del vehículo, para unirlo con el correspondiente resto complementario situado en el vehículo.

Ejemplos de apropiadas dianas específicas, hacia las que puede ser dirigido el conjunto, son, por ejemplo, fibrina y el receptor de fijación a GPIIb/IIIa en plaquetas activadas. La fibrina y las plaquetas están de hecho generalmente presentes en "trombos", es decir coágulos que se pueden formar en el torrente sanguíneo, y causar una obstrucción vascular. Se describen apropiados péptidos de fijación, por ejemplo en el documento US 6.139.819 que antes se ha citado. Unos péptidos de fijación adicionales, específicos para dirección a una diana de fibrina, se describen, por ejemplo, en el documento WO 02/055544.

Otros ejemplos de dianas importantes incluyen receptores en placas vulnerables y receptores específicos para tumores, tal como una región de dominio de cinasa (KDR acrónimo de kinase domain region) y un complejo de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y KDR. Unos péptidos de fijación apropiados para la KDR o para el complejo de VEGF y KDR se describen, por ejemplo, en los documentos WO 03/74005 y WO 03/084574. Otros ejemplos de ligandos específicos para tumores son, por ejemplo, transferrina, ácido fólico, una secuencia de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), una secuencia NRG (para dirigir hacia una diana la aminopeptidasa expresada en vasos que se han formado de nuevas) o la secuencia de péptido GA3 (el receptor de Tie2 diana implicado en una angiogénesis de tumor).

La composición del invento puede contener además, si se desea, un agente de diagnóstico, que también se puede incorporar en el anterior vehículo o se puede proporcionar como una entidad separada.

El término "agente de diagnóstico" incluye dentro de su significado cualquier compuesto, composición o partícula que se pueda usar en conexión con métodos de diagnóstico, incluyendo reproducir en imágenes una región interna de un paciente y/o diagnosticar la presencia o ausencia de una enfermedad en un paciente. Agentes de diagnóstico ilustrativos incluyen, por ejemplo, agentes de contraste destinados a su uso en conexión con la reproducción en imágenes por ultrasonidos (p. ej. microburbujas rellenas con un gas), la reproducción en imágenes por resonancia magnética, la reproducción en imágenes por rayos X, en particular una tomografía computarizada, una reproducción en imágenes

ópticas, una reproducción en imágenes nucleares o una reproducción en imágenes moleculares de un paciente, que incluyen, por ejemplo, nanopartículas de magnetita. Un agente de diagnóstico puede ser útil, por ejemplo para identificar el lugar exacto donde se han de aplicar ondas de ultrasonidos, con el fin de determinar un suministro efectivo del agente bioactivo.

5 La composición del invento puede contener además unos apropiados agentes adyuvantes para intensificar aún más el suministro del agente bioactivo, en particular de un material genético, dentro de células. Unos adyuvantes útiles incluyen, poli(oxialquilen) ésteres de ácidos grasos (tales como poli(oxietilen) ésteres de ácidos grasos), poli(oxialquilen) alcoholes grasos (tales como poli(oxietilen) alcoholes grasos), poli(oxialquilen) éteres de alcoholes grasos (tales como poli(oxietilen) éteres de alcoholes grasos), poli(oxialquilen) ésteres de ácidos grasos de sorbitán (tales como, por ejemplo, la clase de compuestos que se citan como TWEEN[®], disponibles comercialmente de ICI Americas, Inc., Wilmington, Del.), poli(etilenglicoles) (PEG) con diversos pesos moleculares, copolímeros de poli(oxietileno) y poli(oxipropileno) (tales como Pluronic[®], Synperonic[®]) preferiblemente con un balance hidrófilo-lipófilo (HLB, acrónimo de hydrophilic-lipophilic balance) superior a 10 (p. ej. Pluronic F68, F127 o F85), polisorbatos (tales como Tween20, Tween40, y Tween80), poli(oxietilen) alcoholes (tales como Brij) y plasmalógenos, que es el término que se aplica a un grupo de fosfolípidos presentes en plaquetas que liberan aldehídos grasos superiores, p. ej. palmital. También se conoce que unos anestésicos locales tales como lidocaína, ropivacaína, bupivacaína, mepivacaína, así como fenobarbital o pentobarbital, aumentan la fluidez de las membranas y pueden mejorar aún más el suministro de genes después de una insonación. Se pueden usar también derivados de 1-4-dihidropirina (p. ej. hexadecil 4 beta piridilo) así como alquil glicósidos y derivados de alquil poliglicósidos.

La composición del invento puede ser formulada en una diversidad de maneras, con el fin de ser administrada en un método para suministrar eficazmente un agente bioactivo dentro de una célula.

25 Por ejemplo, la composición se puede obtener añadiendo y mezclando una suspensión acuosa que comprende las microcápsulas (obtenida de acuerdo con cualquiera de los métodos de producción antes citados) con una suspensión acuosa que comprende el agente bioactivo, asociado preferiblemente con un vehículo apropiado. Los productos son de hecho reconstituibles con facilidad en un vehículo líquido acuoso apropiado, que es fisiológicamente aceptable, estéril e inyectable, para formar las microvesículas rellenas con un gas. Apropriados vehículos líquidos son agua, soluciones acuosas tales como una solución salina (que ventajosamente puede estar equilibrada de manera tal que el producto final para inyección no sea hipotónico), o soluciones de una o más sustancias que ajustan la tonicidad, tales como sales o azúcares, alcoholes de azúcares, glicoles u otros materiales polioles no iónicos (p. ej. glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, glicerol, poli(etilenglicoles), propilenglicoles y similares). Si se desea, se pueden añadir a la formulación aditivos apropiados, tales como, por ejemplo, los adyuvantes anteriormente mencionados.

35 Después de su formación, la suspensión que comprende la composición del invento se puede almacenar para una administración subsiguiente o se puede administrar directamente. Si se desea, el vehículo líquido de la suspensión puede ser eliminado (p. ej., mediante una liofilización) para obtener un polvo seco de la composición, que puede ser almacenado (preferiblemente en la presencia de un gas apropiado para formar las microcápsulas rellenas con un gas, después de su reconstitución) durante unos períodos de tiempo relativamente largos antes de su reconstitución.

45 Alternativamente, los componentes de la composición pueden ser almacenados como composiciones separadas en una forma secada (preferiblemente liofilizada) y reconstituídos como una suspensión antes de la administración. Para el almacenamiento, los componentes secados son preferiblemente mantenidos en una atmósfera del gas que formará las microcápsulas después de una reconstitución. La reconstitución con un vehículo líquido acuoso puede tener lugar por separado en las dos composiciones secadas que comprenden los respectivos componentes, obteniendo de esta manera dos suspensiones separadas. Éstas pueden ser luego administradas por separado o añadidas y mezcladas antes de la administración. De acuerdo con una forma preferida de realización, una suspensión del agente bioactivo secado se usa para reconstituir la composición de microcápsulas secadas, para obtener finalmente una suspensión de la composición. Opcionalmente, el agente bioactivo liofilizado (asociado preferiblemente con un vehículo) es en primer lugar reconstituido con un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable y luego la suspensión obtenida es usada para reconstituir la composición de microcápsulas secadas.

55 Unas composiciones inyectables (también después de una reconstitución de la composición liofilizada) deberán ser, siempre que sea posible, isotónicas con la sangre. Por lo tanto, antes de una inyección, se pueden añadir también pequeñas cantidades de agentes isotónicos a las suspensiones que comprenden el conjunto del invento. Los agentes isotónicos son unas soluciones fisiológicas usadas corrientemente en medicina, tales como, por ejemplo, una solución salina acuosa (NaCl al 0,9%), una solución al 2,6% de glicerol o una solución al 5% de dextrosa. La reconstitución de las suspensiones acuosas se obtiene generalmente por simple disolución del agente tensioactivo que forma películas secadas y almacenadas en gas, y por suave agitación.

65 El volumen y las concentraciones del líquido de reconstitución se pueden equilibrar deseablemente para hacer sustancialmente isotónicas a las resultantes formulaciones prestas para el uso. Por lo tanto, el volumen y la concentración del fluido de reconstitución escogido dependerán del tipo y de la cantidad del agente estabilizador (y de otros agentes de voluminosidad) presentes en el producto liofilizado.

El presente invento se dirige también a un estuche farmacéutico que comprende microcápsulas y un agente bioactivo, tal como antes se han definido. Los componentes se pueden mezclar conjuntamente o disponer por separado

en el estuche, ya sea como suspensiones o como componentes liofilizados. Preferiblemente, ambos componentes se proporcionan en una forma liofilizada, por ejemplo en recipientes separados, tales como viales o paquetes separados. El estuche puede comprender, por lo tanto, además un vehículo fisiológicamente aceptable apropiado, tal como los que anteriormente se han enumerado, para reconstituir los componentes liofilizados (ya sea por separado o en una única suspensión). El estuche farmacéutico puede comprender además unos convencionales componentes de estuches conocidos para los expertos en la especialidad, una vez que se han armado o montado de acuerdo con la presente descripción, tales como viales mezcladores, jeringas, agujas.

La dosificación útil de microcápsulas y del agente bioactivo que se ha de administrar o suministrar, así como el modo de administración, variaran dependiendo del tipo y de la naturaleza del compuesto que se ha de suministrar, de la edad, del peso, de las células del paciente (animal) que se ha de tratar, de la particular aplicación diagnóstica, terapéutica o de otro tipo, pretendida (incluyendo el estado patológico, si lo hay, que se ha de tratar) y el vehículo (si lo hay) que se emplee. Típicamente, la dosificación es iniciada en unos niveles más bajos y se puede aumentar hasta que se consiga el deseado efecto terapéutico. Las microcápsulas y el agente bioactivo de una composición del invento se pueden administrar ya sea concurrentemente (p. ej. en una misma solución fisiológica), o en momentos subsiguientes, formando de esta manera la composición del invento en el sitio deseado en el que se aplican los ultrasonidos. En este último caso, el agente bioactivo puede ser administrado en primer lugar, con el fin de dejar tiempo suficiente para que éste circule y/o se una con la diana deseada (en el caso de que sea asociado con un vehículo dirigido a diana). Alternativamente, las microcápsulas se pueden administrar en primer lugar, seguido por la administración del agente bioactivo.

Los expertos en la especialidad, basándose en la presente descripción y en la bibliografía médica general serán capaces de ajustar la deseada dosificación, incluyendo cualesquiera cantidades de dosificación terapéuticamente efectivas.

La composición del invento se puede administrar de diversas maneras, también dependiendo de su formulación específica. Ejemplos de administraciones apropiadas son, por ejemplo, las efectuadas por las vías intravascular, intralinfática, parenteral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intersticial, intratecal, intranasal, por la vía de nebulizadores dentro de las vías aéreas, por vía ocular, oral, intrarrectal, tópica, o por vía intratumoral, usando una variedad de formas de dosificación. El método de administración por vía tópica es la inyección de una secuencia de nucleótidos (o de otro compuesto que se haya de suministrar), por un catéter de globo poroso (de SCIMED Remedy, Boston Scientific, Natick, MA) o por un catéter de inyección con agujas (Boston Scientific, Natick, MA). El catéter de globo (que contiene unos canales) es introducido en el torrente sanguíneo de un paciente. Una vez que el globo del catéter alcanza el lugar en el que se ha de administrar el agente bioactivo, el globo es inflado por bombeo y luego una mezcla de microcápsulas y del agente bioactivo es infundida a través del canal suministrando de esta manera la composición a la pared del vaso. Se aplica luego un ultrasonido en el sitio deseado, ya sea internamente (por ejemplo por vía endoscópica o intramuscular) o externamente. Un segundo catéter para suministro de fármacos está basado en un catéter de inyección con agujas, haciendo posible la administración directa de las microcápsulas y del agente bioactivo en el sitio deseado, seguido luego por una exposición a ultrasonidos como antes se ha descrito.

Los conceptos de “ultrasonido”, “aplicaciones por ultrasonidos” y términos similares se refieren a ondas de energía sonora, transmitidas preferiblemente de una manera repetitiva, en lo suficiente para inducir un estallido sustancial de microcápsulas rellenas con un gas y ayudar al suministro de un agente bioactivo dentro de una célula. Preferiblemente, el ultrasonido está en el intervalo de frecuencias de desde aproximadamente 20 kHz hasta menos de aproximadamente 50 MHz, con un nivel de energía (también citado como intensidad promediada en el tiempo de pico espacial, I_{spta}) de desde aproximadamente 0,5 mW/cm² hasta aproximadamente 10 W/cm². Para el método específico del invento, dicho ultrasonido tendrá preferiblemente una presión acústica de por lo menos 200 kPa a una frecuencia de 1,15 MHz, o de por lo menos 300 kPa a una frecuencia de 2,25 MHz, que aumenta hasta p. ej. 10 MPa. Típicamente, el ultrasonido es aplicado mediante aplicación externa, por medio de convencionales dispositivos clínicos de ultrasonidos o un transmisor de un único elemento, pero también se pueden aplicar internamente, tal como por vía endoscópica e intravascular, como antes se ha descrito.

Típicamente, se requieren unos niveles de energía más altos y unas frecuencias ultrasónicas más bajas para la penetración dentro de tejidos asentados profundamente; se pueden usar unos niveles de energía más bajos y unas frecuencias ultrasónicas más altas para el tratamiento de tejidos superficiales o cuando el transductor de ultrasonidos se puede aplicar directamente a la superficie de un tejido. Para aplicaciones *in vitro*, el volumen y la forma geométrica del recipiente que contiene el cultivo de células pueden afectar a la elección de la energía y de la frecuencia. Por ejemplo, unas muestras de cultivos celulares de pequeño volumen pueden necesitar menos energía para una transfección acrecentada por ultrasonidos que unas cámaras de biorreactores de gran volumen.

Para aplicaciones intravasculares, que pueden emplear unos catéteres intravasculares equipados con transductores de ultrasonidos para una terapia génica endovascular, se pueden emplear frecuencias más altas, tales como las situadas por encima de aproximadamente 10 MHz. Para la mayor parte de las aplicaciones, sin embargo, la frecuencia del sonido varía desde aproximadamente 300 kHz hasta aproximadamente 3 MHz, de manera preferible desde aproximadamente 500 kHz hasta aproximadamente 1,5 MHz, más preferiblemente en alrededor de 1 MHz. Típicamente, el ultrasonido destinado a usarse en el presente invento se proporciona a una frecuencia más baja que la frecuencia convencional que se usa para aplicaciones de reproducción en imágenes.

ES 2 346 079 T3

Típicamente, los ajustes del nivel de energía pueden ser más altos que los empleados en el ultrasonido de diagnóstico, fluctuando desde 0,5 mW/cm² hasta aproximadamente 10 W/cm², de manera preferible desde aproximadamente 1 mW/cm² hasta aproximadamente 3 W/cm². El nivel de energía que se aplica es seleccionado de manera tal que la deposición total de energía está generalmente por debajo del umbral citotóxico para las células o el tejido.

Generalmente, se aplican frecuencias y niveles de energía en cantidades más bajas y luego éstas se aumentan hasta que se consiga la absorción celular deseada del compuesto administrado.

La energía de ultrasonidos es aplicada en unos períodos que son definidos por un ciclo de servicio dado. Generalmente, se emplea un ultrasonido de onda continua que aplica una exposición constante de energía de ultrasonidos (ciclo de servicio de 100%). El ciclo de servicio se selecciona de manera tal que el nivel de la salida de energía esté en un intervalo deseado. El ciclo de servicio puede ser adaptado a la aplicación y puede hacerse variar a lo largo de un amplio intervalo de valores (p. ej. de 0,1%-100%).

Aunque unos altos niveles de energía de ultrasonidos se pueden usar para obtener una hipertermia con el fin de calentar el tejido y también para ablacionar directamente tejidos, en el método del invento, los niveles de energía están generalmente muy por debajo de los que causan la ablación de tejidos y por debajo de los que causan un significativo efecto hipertérmico. Mientras que la aplicación de energía de ultrasonidos, que es necesaria para aumentar la eficiencia del suministro de un agente bioactivo, puede dar como resultado un aumento en la temperatura de unos pocos grados centígrados, cualquier aumento en la temperatura es típicamente transitorio y la temperatura vuelve con rapidez a la línea de base. Preferiblemente, la temperatura no aumenta de manera significativa durante la aplicación del ultrasonido, siendo cualquier aumento de la temperatura típicamente menor que desde aproximadamente 1°C hasta aproximadamente 2°C. Unos niveles progresivamente más altos de energía de ultrasonidos darán como resultado unas subidas progresivas de la temperatura, pero la temperatura se mantiene de manera preferible por debajo del nivel en el que se producirá una citotoxicidad significativa (p. ej. a 44°C o más alta). La cantidad de energía y/o el período de tiempo de exposición se pueden modificar de manera tal que se impida una destrucción de las células inducida por las temperaturas. Algunas aplicaciones pueden beneficiarse, sin embargo, de un cierto grado de hipertermia, tal como, por ejemplo, en el caso de la terapia de un cáncer, en la que la combinación de un suministro mediado por ultrasonidos y una hipertermia pueden mejorar el tratamiento, haciendo posible la aniquilación de una parte de células tumorales por el efecto hipertérmico.

La energía de ultrasonidos puede ser aplicada al tejido o a las células después de una inyección de microcápsulas, simultáneamente con o después de la administración del agente bioactivo a la célula. Típicamente, la energía de ultrasonidos es aplicada después de una inyección de microcápsulas y no más de aproximadamente 48 horas después de que el agente bioactivo haya sido administrado, aunque se pueden aplicar unos períodos de tiempo más largos o más cortos.

Se pueden emplear ya sea una o múltiples exposiciones de energía de ultrasonidos. La duración de la exposición a ultrasonidos (período de tiempo de exposición) variará dependiendo del nivel de energía del ultrasonido y del ciclo de servicio. Para determinar la duración preferible, el ultrasonido se aplica típicamente en unos períodos de tiempo de exposición más bajos, y se aumenta hasta que se consiga la absorción celular deseada del compuesto administrado. Una onda de choque de ultrasonido con un alto nivel de energía (típicamente mayor que alrededor de 2 W/cm², preferiblemente por encima de 5 W/cm², y también preferiblemente por encima de alrededor de 10 W/cm², dependiendo del ciclo de servicio) puede requerir solamente unos pocos milisegundos de período de tiempo de exposición. Más típicamente, el período de tiempo de exposición fluctúa desde aproximadamente unos pocos segundos hasta aproximadamente una hora de exposición de la célula a energía de ultrasonidos, con el fin de conseguir un suministro intensificado por ultrasonidos más efectivo del agente bioactivo. Incluso más preferiblemente, la duración de una exposición a ultrasonidos fluctúa entre aproximadamente unos pocos segundos y aproximadamente unos pocos minutos y se puede repetir a intervalos diversos durante la transfeción. La duración de una exposición a energía de ultrasonidos debería ser suficiente para causar el deseado efecto, pero no tan larga que pueda resultar una significativa citotoxicidad (a menos que ésta se requiera expresamente).

La energía de ultrasonidos se puede aplicar con uno cualquiera de una diversidad de sistemas de ultrasonidos disponibles comercialmente. Por ejemplo, se puede usar un aparato para terapia ultrasónica Rich-Mar modelo Sonitron 2000 (Inola, Okla.) con la frecuencia central de aproximadamente 1 MHz, en un modo pulsado o continuo. Unos transductores convencionales, unos amplificadores de potencia y otros sistemas componentes para practicar el invento se pueden ensamblar también con facilidad. Alternativamente, se puede incorporar también en el sistema un generador de impulsos/funciones o un generador de funciones arbitrarias Tabor 8024 (Tabor electronics Ltd, Hanan, Israel) para permitir un control sobre los intervalos de repetición de impulsos, los ciclos de servicio, etc. Si se desea, unos efectos específicos de frecuencia y amplitud, tales como, por ejemplo, unas pautas de forma de onda de impulsos CHIRP (aumento en frecuencia) y PRICH (disminución en frecuencia) se pueden obtener modificando el ultrasonido. Las energías ultrasónicas se pueden suministrar también a partir de amplificadores, transductores y generadores de frecuencia comercialmente disponibles. Por vía de ejemplo, un transductor de potencia con una frecuencia central de 1,15 MHz, procedente de Valpey-Fisher (Valpey-Fisher, Hopkinton, Mass.), un amplificador de RF (radiofrecuencia) de potencia, procedente de ENI (ENI, Rochester, N.Y.), y un generador de funciones arbitrarias Tabor 8024 (de Hanan, Israel) pueden constituir una disposición apropiada. Alternativamente, un transductor de potencia procedente de Panametrics (Panametrics V304) con una frecuencia central de 2,25 MHz, se puede usar también en la disposición. Finalmente, se puede aplicar una energía de ultrasonidos a través de unos equipos de ultrasonidos para diagnóstico.

ES 2 346 079 T3

El sistema de ultrasonidos de alta energía se puede incorporar también con un sistema convencional de reproducción en imágenes por ultrasonidos, para permitir una reproducción en imágenes y una aplicación terapéutica de un ultrasonido con el mismo aparato.

5 Alternativamente, la aplicación de un ultrasonido de alta energía se puede realizar también en combinación con otras formas convencionales de reproducción en imágenes tales como una endoscopia (p. ej. un sistema de fibra óptica), tomografía computarizada, reproducción en imágenes por resonancia magnética, angiografía y medicina nuclear.

10 Cualquier técnica asociada de reproducción en imágenes se puede emplear, por ejemplo para localizar e identificar en un paciente a las células (situadas p. ej. en un tejido u órgano) a las que se deberá de aplicar el ultrasonido de alta energía, o se puede usar para vigilar y/o localizar la composición del invento después de una administración a un paciente.

Los siguientes Ejemplos ilustraran el invento con mayor detalle.

15

Ejemplos

Ejemplo 1

20 *Preparación de microburbujas con envoltura delgada, rellenas con aire (comparativa)*

25 Se prepara una solución que contiene 15 mg de diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), 15 mg de dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG) y 3 mg de ácido palmítico en una mezcla de hexano y etanol 8/2 (v/v) y el disolvente se evapora hasta sequedad. El polvo resultante y 2 g de un poli(etilenglicol) (de PM 4.000) se disuelven en 14 g de terc.-butanol a 60°C. La solución es repartida en partes alcuotas en viales de vidrio con una capacidad de 10 ml (250 μ l/vial), enfriada rápidamente a -45°C y liofilizada. El material liofilizado es expuesto al aire y luego es reconstituido con 5 ml a una solución salina al 0,9% mediante una suave turbulencia. La resultante suspensión contiene microburbujas rellenas con aire (2 x 10⁸ de burbujas/ml, analizado por un Coulter Multisizer II).

30

Ejemplo 2

Preparación de microburbujas con envoltura delgada, rellenas con un perfluorocarbono (comparativa)

35 Se repite el procedimiento del Ejemplo 1 excepto que el aire existente en un vial de vidrio que contenía el material liofilizado fue primeramente evacuado por una bomba de vacío y reemplazado por un perfluorocarbono gaseoso (C₄F₁₀). La rigidez de las microburbujas obtenidas, medida de acuerdo con la metodología descrita con anterioridad, es de aproximadamente 1 N/m.

40

Ejemplo 3

Preparación de microcápsulas con una envoltura de lípido, rellenas con aire

45 60 mg de tripalmitina se disuelven en ciclohexano (0,6 ml). La sal sódica de diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG.Na - 40 mg) es dispersada en agua destilada (30 ml) a 70°C durante 20 minutos y enfriada a 45°C. La fase orgánica es emulsionada en la fase acuosa usando un homogeneizador POLYTRON® (a 8.500 rpm). El diámetro medio de las gotitas resultantes es de aproximadamente 3 μ m, según se determina con un espectrómetro de correlación de fotones (Malvern Master Sizer®).

50

Esta emulsión se añadió a un recipiente de vidrio con una capacidad de 500 ml, que contenía 200 mg de un poli (alcohol vinílico) (PVA - PM 9000 - de Aldrich) disueltos en 5 ml de agua destilada. Después de haber mezclado, la emulsión resultante se congeló rápidamente a -40°C y se liofilizó (Christ Beta 1-8K).

55

La torta fue vuelta a suspender en 20 ml de agua. Unas microburbujas que contenían aire subieron hasta la superficie. Las cápsulas flotantes fueron recuperadas, vueltas a suspender en NaCl al 0,9% y analizadas con un Coulter counter Multisizer II. La rigidez de las microcápsulas obtenidas, medida de acuerdo con la metodología anteriormente descrita, era más alta que 50 N/m.

60

Ejemplo 4

Preparación de microcápsulas con una envoltura de lípido, rellenas con un perfluorocarbono gaseoso

65 Se repite el Ejemplo 3, excepto que el aire existente en el vial de vidrio que contiene el material liofilizado es primeramente evacuado por una bomba de vacío y el material liofilizado es expuesto al perfluorobutano con el fin de generar unas cápsulas que contienen C₄F₁₀. La rigidez de las microcápsulas obtenidas, medida de acuerdo con la metodología descrita anteriormente, era más alta que 50 N/m.

ES 2 346 079 T3

Ejemplo 5

Preparación de microcápsulas con una envoltura de polímero

- 5 40 mg de un poliestireno con un PM de 30 kDa (Standard MW 30,000, de Fluka Chemie) se disuelven en ciclohexano (1 ml). Una sal de sodio de diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG.Na - 40 mg) se dispersa en agua destilada (30 ml) a 70°C durante 20 minutos y se enfría a 45°C. La fase orgánica es emulsionada en la fase acuosa usando un homogeneizador POLYTRON® (13'000 rpm, Kinematica, Suiza).
- 10 La emulsión es añadida a un recipiente de vidrio con una capacidad de 500 ml, que contiene 200 mg de un poli(alcohol vinílico) (PVA - PM 9000, de Aldrich) disueltos en 5 ml de agua destilada. Después de haber mezclado, la emulsión resultante es congelada rápidamente a -40°C y liofilizada. La torta es vuelta a suspender en 20 ml de agua. Unas microcápsulas que contienen aire suben hasta la superficie. Las cápsulas flotantes se recuperan, se vuelven a suspender en una solución al 0,9% de NaCl que contiene 0,05% de Pluronic F68, y se analizan con un Coulter counter
- 15 Multisizer II. La rigidez de las microcápsulas obtenidas, medida de acuerdo con la metodología anteriormente descrita, era de aproximadamente 8 N/m.

Ejemplo 6

Preparación de microcápsulas con una envoltura de polímero

- 20 Se repite el Ejemplo 5, reemplazando el poliestireno con un PM de 30 kDa por la misma cantidad de un poliestireno de 100 kDa. La rigidez de las microcápsulas obtenidas, medida de acuerdo con la metodología anteriormente descrita, era de aproximadamente 12 N/m.

Ejemplo 7

Preparación de microcápsulas con una envoltura de polímero

- 30 El Ejemplo 5 se repite reemplazando el poliestireno con un PM de 30 kDa por la misma cantidad de un poliestireno de 300 kDa. La rigidez de las microcápsulas obtenidas, medida de acuerdo con la metodología antes descrita, era de aproximadamente 15 N/m.

Ejemplo 8

Preparación de un complejo de micelas dirigidas a una diana, que contiene un plásmido

- 40 Se preparan micelas catiónicas con 1 mg/ml de un fosfolípido catiónico DPEPC (Dipalmitoil Glicero-3-etil-fosfocolina, Avanti® Polar Lipids, Inc. EE.UU.), 4 mg/ml de DSPE-PTE020 (un fosfolípido PEG de brazos múltiples, de NOF Corporation, Japón), y 0,25 mg/ml de maleimida-PEG2000-diestearoil-fosfatidiletanolamina (de Shearwater Polymer, AL, EE.UU.).

- 45 Estos compuestos son primeramente disueltos en una mezcla de cloroformo y metanol (2:1, v/v) en un matraz de fondo redondo y luego los disolventes son evaporados bajo presión reducida con el fin de obtener una película de lípido. Se obtienen micelas catiónicas por hidratación de la película de lípido en un tampón HEPES 10 mM a 60°C.

- 50 Un acetiltioacetil RGD - péptido (un péptido con afinidad para Alfa v beta 3-integrinas expresadas en una angiogénesis de tumor) es desacetilado en una solución acuosa de una mezcla de HEPES 0,05 M e hidroxilamina-HCl 0,05 M y EDTA 0,03 mM a un pH de 7 durante 30 min a la temperatura ambiente. El RGD-péptido activado es incubado durante una noche a 4°C con las micelas en una relación molar de péptido a maleimida de 1:2. Las resultantes micelas
- 55 con RGD son purificadas en una columna con Sephadex G-100 usando un tampón HEPES como eluyente.

- Un plásmido gWiz®-GFP (5.757 pares de bases; Aldevron, Fargo, EE.UU.), que codifica la proteína fluorescente verde (GFP acrónimo de Green Fluorescent Protein) a razón de 100 µg/ml en un tampón Hepes se añade a micelas catiónicas con RGD con el fin de obtener un plásmido dirigido a diana que contiene un complejo de micelas, que se puede usar en combinación con las microcápsulas antes descritas en una composición de acuerdo con el invento.

65

ES 2 346 079 T3

Ejemplo 9

Preparación de microcápsulas dirigidas a una diana

5 *Preparación de RGD-PEG2000-DSPE*

Un acetiltioacetil RGD - péptido (un péptido con afinidad para Alfa y beta 3-integrinas expresadas en una angiogénesis de tumor) es desacetilado en una solución acuosa de mezcla de HEPES 0,05 M, hidroxilamina-HCl 0,05 M y EDTA 0,03 mM a un pH de 7 durante 30 min a la temperatura ambiente. El péptido con RGD es incubado durante una noche a 4°C con una solución de maleimida PEG2.000-DSPE en una relación molar de péptido a maleimida de 1:2. El resultante RGD-PEG2000-DSPE es purificado sobre una columna de Sephadex G-100 usando un tampón HEPES como eluyente.

15 *Preparación de microcápsulas dirigidas a una diana que contienen RGD*

60 mg de palmitina se disuelven en ciclooctano (0,6 ml). 5 mg de RGD-PEG2000-DSPE y 40 mg de DSPG.Na se dispersan en agua destilada (30 ml) a 70°C durante 20 minutos y se enfrían a 45°C. La fase orgánica es emulsionada en la fase acuosa usando un homogeneizador POLYTRON® (a 8.500 rpm).

20 La resultante microemulsión es centrifugada para eliminar los lípidos en exceso (tripalmitina, DSPG y RGD-PEG2000-DSPE) y es añadida luego a un recipiente de vidrio con una capacidad de 500 ml, que contiene 40 mg/ml de una solución acuosa de un poli(alcohol vinílico) (PVA). Finalmente, la emulsión es congelada a -40°C y liofilizada. Se obtuvieron finalmente unas microcápsulas que contenían el péptido de RGD por reconstitución de una torta liofilizada con una solución salina.

Ejemplo 10

30 Unas microcápsulas dirigidas a una diana, que contienen RGD, se preparan tal como se ha descrito en el Ejemplo 9, excepto que el RGD-PEG2000-DSPE es disuelto en la fase orgánica (ciclooctano) en vez de en la fase acuosa (suspensión en agua de (DSPG.Na).

35 Ejemplos 11-15

Experimentos de suministro in vitro de genes

Protocolo para los ensayos de suministro de genes

40 Los ensayos de suministro de genes se realizan en unos tubos de ensayo con una capacidad de 3 ml, que contienen una suspensión de células con un plásmido que expresa una proteína fluorescente, a la que se le añaden diferentes formulaciones de microvesículas (microburbujas o microcápsulas) rellenas con un gas, preparadas de acuerdo con los Ejemplos anteriores.

45 Unas células de adenocarcinoma mamario de rata MAT B III (#CRL-1666 procedente de ATCC) se incuban a 37°C bajo una atmósfera con 5% de CO₂ en matraces de cultivo de tejidos con una capacidad de 225 cm², en el medio 5A de Mac Coy que contiene Glutamax-I (Life Technologie Suiza), se suplementan con suero de ternero fetal (FCS, acrónimo de foetal calf serum) desactivado por calor al 10% v/v y 1% v/v de antibióticos (concentración inicial: 10.000 UI (unidades internacionales)/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomina, 25 µg/ml de Fungizone).

50 Cada tubo contiene 500 µl de una suspensión de células en una concentración final de 1 x 10⁶ células/ml, que se mezcla con un medio de cultivo (medio A de Mac Coy de Life Technologie, Suiza) que contiene el plásmido gWiz®-GFP (Aldevron, Fargo, EE.UU), que codifica la proteína fluorescente verde (GFP).

55 Unos ensayos de suministro de genes se realizan con una concentración de plásmido de 10 µg/ml y una relación de microvesículas/células de 30. El tubo es montado sobre un sistema rotatorio de exposición y sumergido en un baño de agua de 37°C (D.L. Miller, S. Bao, J.E. Morris, Sonoporation of cultured cells in the rotating tube exposure system [sonoporación de células cultivadas en el sistema de exposición en tubo rotatorio], Ultrasound in Med. Biol., 25, 1, (1999) 143-149). La distancia entre el transductor y el tubo es de 7,6 cm. Los tubos son insonados durante 10 segundos usando dos diferentes transductores (T1 o T2) que son caracterizados de la siguiente manera:

65

ES 2 346 079 T3

	Fabricante	Frecuencia de funcionamiento [MHz]	Tipo	Abertura [mm]	Distancia al campo cercano [mm]	
5	T1	Valpey Fisher	1,15	No enfocado/ respaldado por aire	19,1	76
	T2	Panametrics V304	2,25	Enfocado	25,4	76

10

La insonación de una suspensión de células se realiza de acuerdo con los siguientes parámetros: ciclo de servicio de 20%, con una frecuencia de repetición de impulsos de 100 Hz, y a unas presiones acústicas como las que se indican en los Ejemplos específicos. El sistema de suministro por ultrasonidos comprende además un amplificador de RF de potencia ENI A150 (ENI, Rochester, N.Y.), y un generador de ondas arbitrarias Tabor 8024 (Tabor Electronics Ltd, Hanan, Israel).

15

Los valores de la presión acústica (negativa de pico) indicados en los siguientes Ejemplos se miden siguiendo un proceso de calibración patrón usando un hidrófono de membrana calibrado (hidrófono de membrana #MH026, Precision Acoustic Ltd, Dorshester, Inglaterra).

20

Después de una insonación, las respectivas mezclas son transferidas desde el tubo a unas placas de 12 pocillos y suplementadas con 2 ml de un medio que contiene 10% de FCS. Luego las células se incuban a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 24 horas.

25

Luego las células se analizan con un FACS Calibur (Becton Dickinson AG, Suiza) con el fin de determinar el porcentaje de células positivas para GFP y la intensidad media de fluorescencia de unas células transfectadas positivamente. Dicho brevemente, el medio de cultivo y las células se colocan en un tubo de poliestireno con una capacidad de 5 ml, durante 24 horas después de una transfección, se lavan con una solución salina tamponada con fosfato (PBS, acrónimo de phosphate buffer saline), luego se vuelven a suspender en 300-400 µl de PBS y se mantienen sobre hielo. La GFP es excitada usando la línea de 488 nm de un láser de argón, y la luz emitida es recogida a 520 nm (fluorescencia verde) y a 575 nm (fluorescencia roja) para permitir una corrección en cuanto a autofluorescencia mediante regulación por puerta diagonal. Antes de la medición, se añade cloruro de propidio (20 µl procedentes de una solución de 40 µl/ml) al tubo con el fin de determinar la viabilidad de las células. La fluorescencia de fondo es determinada usando células transfectadas artificialmente (es decir, células expuestas a un ultrasonido en ausencia de un ADN de plásmido y microvesículas). El programa lógico software CellQuest Pro se usa para analizar los datos con el fin de expresar el porcentaje de células positivas para GFP y la intensidad media de fluorescencia (unidad arbitraria, AU, acrónimo de arbitrary unit). El porcentaje de células positivas para GFP (que indica la cantidad de células que han sido transfectadas positivamente) se refiere a toda la población celular, incluyendo las células muertas; sin embargo, los desperdicios procedentes de células destruidas por ultrasonidos no son tomados en cuenta. La intensidad media de fluorescencia medida es proporcional a la cantidad de GFP que se ha producido por las células después de una transfección (y por lo tanto a su vez es proporcional el número de copias de plásmidos que han sido suministrados efectivamente dentro de la célula).

30

35

40

45

Ejemplo 11

Suministro de genes por insonación en presencia de microcápsulas o microburbujas

50

Cuatro partes alícuotas de las formulaciones de microburbujas que se han preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 son añadidas a unos respectivos tubos de ensayo que contienen la suspensión de células y el plásmido como antes se han descrito, y son insonadas con el transductor T2 a unas respectivas presiones acústicas de 247 KPa, 364 KPa, 571 KPa y 808 KPa. El porcentaje medido de células positivas para GFP (% de células positivas para GFP) y las intensidades medias de fluorescencia de células positivas se señalan en las Figuras 1a y 1b, respectivamente como círculos negros.

55

Similarmente, cuatro partes alícuotas de las formulaciones de microcápsulas preparadas de acuerdo con el Ejemplo 3 son añadidas a unos respectivos tubos de ensayo que contienen la suspensión de células y el plásmido como antes se han descrito, y son insonadas con el mismo transductor T2 a las mismas respectivas presiones acústicas diferentes.

60

El % medido de células positivas para GFP y las intensidades de fluorescencia de las células positivas se señalan en las Figuras 1a y 1b, respectivamente como círculos blancos.

65

Tal como se observa a partir de estas Figuras, el % máximo de células positivas para GFP es de aproximadamente 25% para las microburbujas (a 364 kPa) y de aproximadamente 17% para las microcápsulas (a 808 kPa). Sin embargo, las células insonadas en la presencia de microcápsulas muestran un valor más alto de la intensidad media de fluorescencia (aproximadamente 440 AU a 808 kPa) con respecto a unas células insonadas en la presencia de microburbujas (aproximadamente 340 AU a 571 KPa). Así, a pesar de una cantidad ligeramente más baja de células transfectadas, las

ES 2 346 079 T3

microcápsulas permiten una transferencia más efectiva de un agente bioactivo dentro de las células. En la práctica, un número más bajo de células son transfectadas después de una insonación en la presencia de microcápsulas, pero una concentración más alta de un agente bioactivo es suministrada no obstante dentro de las células.

5

Ejemplo 12

Suministro de genes por insonación, microcápsulas frente a microburbujas

10 Se repite el Ejemplo 11, comparando las microburbujas del Ejemplo 2 con las microcápsulas del Ejemplo 4, con la misma modalidad. Además, se emplea el transductor T1 (enfocado, a 1,15 MHz) en lugar del T2, a unas respectivas presiones acústicas de 207 kPa, 307 kPa, 402 kPa y 480 kPa. Los resultados (% de células positivas para GFP y las intensidades medias de fluorescencia) se muestran en las Figuras 2a y 2b) (círculos negros: microburbujas; círculo blanco: microcápsulas).

15

Como se observa a partir de la Figura 2a, el % máximo de células positivas para GFP es de aproximadamente 18,5% para las microburbujas y de aproximadamente 14% para las microcápsulas. De acuerdo con la Figura 2b, se puede observar que unas células insonadas en la presencia de microcápsulas muestran un valor mucho más alto (casi del doble) de la intensidad media de fluorescencia con respecto a unas células insonadas en la presencia de microburbujas (es decir de aproximadamente 1.120 AU en comparación con aproximadamente 550 AU, a 480 KPa).

20

Ejemplo 13

Suministro de genes por insonación con microcápsulas poliméricas; efecto del peso molecular

25 Cuatro partes alícuotas de cada una de las tres formulaciones preparadas de acuerdo con los Ejemplos 5, 6 y 7, respectivamente, son añadidas a unos respectivos tubos de poliestireno que contienen la suspensión de células y el plásmido, como antes se ha descrito, y son insonadas con el transductor T2 a unas respectivas presiones acústicas de 247 KPa, 364 KPa, 571 KPa y 808 KPa. Las intensidades medias de fluorescencia que se han medido (determinadas como antes se ha descrito) se señalan en la Figura 3 (Ejemplo 5: rombos blancos; Ejemplo 6: cuadrados blancos, Ejemplo 7: triángulo negro). A partir de la Figura 3, se puede observar que las células insonadas en la presencia de unas microcápsulas hechas de un polímero de más alto peso molecular, particularmente a unas presiones acústicas más altas que 400 KPa, muestran unas intensidades medias de fluorescencia más altas, que corresponden a un suministro más efectivo de los plásmidos dentro de las células.

35

Ejemplo 14

Suministro de genes por insonación: efecto del gas de relleno

40 Cuatro partes alícuotas de cada una de las formulaciones preparadas de acuerdo con el Ejemplo 3 o del Ejemplo 4, fueron añadidas a unos respectivos tubos de poliestireno, que contenían la suspensión de células y el plásmido como antes se han descrito, e insonadas con el transductor T2 a unas respectivas presiones acústicas de 247 KPa, 364 KPa, 571 KPa y 808 KPa.

45

Las intensidades medias de fluorescencia que se midieron (determinadas como antes se ha descrito) se señalan en la Figura 4 (Ejemplo 5: círculos blancos; Ejemplo 4; círculos negros). A partir de la Figura 4 puede observarse que las células insonadas en la presencia de microcápsulas rellenas con un gas perfluorado muestran una intensidad media de fluorescencia mucho más alta (casi del doble) con respecto a las microcápsulas rellenas con aire.

50

Ejemplo 15

Suministro de genes por insonación: efecto de los adyuvantes

55 Cuatro partes alícuotas de las formulaciones preparadas de acuerdo con el Ejemplo 3 se añaden a unos respectivos tubos de ensayo que contienen una suspensión de células y el plásmido, como antes se han descrito. Se añaden por separado un poli(etilenglicol) 4000 (PEG₄₀₀₀) (de Fluka, Buchs, Suiza), Pluronic F68 o Pluronic F127 (ambos suministrados por Sigma, Buchs, Suiza) a la suspensión de células a razón de 0,05% p/v (peso/volumen) antes de una exposición a ultrasonidos. Luego se añaden microcápsulas a la suspensión y las células son insonadas con el transductor T2 a las presiones acústicas de 571 KPa con el sistema de suministro por ultrasonido que antes se ha descrito. Un acondicionamiento con microcápsulas, sin adyuvante y expuestas a ultrasonidos, se usa como testigo.

60

65 Se encuentra que unos adyuvantes tales como PEG₄₀₀₀ y Pluronic F68/127 mejoran el porcentaje de células positivas para GFP por al menos en un 20%, en comparación con el testigo.

ES 2 346 079 T3

Ejemplo 16

Suministro de genes *in vivo* por insonación con microcápsulas poliméricas

5 Sistema de preparación de los animales y de exposición a ultrasonidos

5 5×10^6 células MAT B III (adenocarcinoma mamario de rata, #CRL-1666 procedente de ATCC) se inyectan por vía subcutánea (100 μ l) dentro de la almohadilla mamaria grasa de ratas Fischer 344 hembras, seis días antes del tratamiento.

10 Un transductor enfocado de 1 MHz (T3) es montado sobre un tubo de plexiglass relleno con agua que tiene una longitud de 100 mm, permitiendo que la insonación se efectúe a la deseada distancia al campo cercano (100 mm). Los detalles del transductor T3 son los siguientes:

	Fabricante	Frecuencia de funcionamiento [MHz]	Tipo	Abertura [mm]	Distancia al campo cercano [mm]	
20	T3	Vermon	1	Enfocado	40	100

25 El sistema de suministro por ultrasonido comprende además un amplificador de RF de potencia ENI A150 (de ENI, Rochester, N.Y.) y un generador de ondas arbitrarias Tabor 8024 (Tabor Electronics Ltd, Hanan, Israel).

30 Los tumores son insonados a una presión negativa de pico de 1 MPa, con un ciclo de servicio (DC, acrónimo de duty cycle) de 3% y una frecuencia de repetición de impulsos (PRF, acrónimo de pulse repetition frequency) de 100 Hz, durante 60 segundos. El eje central de la propagación de los ultrasonidos es enfocado sobre el tumor, y no interfiere con otras partes de la rata. En cada experimento, se usa un sistema de diagnóstico (sonda lineal que funciona a una frecuencia transmitida de 4 MHz, sonda L7-4, ATL, HDI-5000, versión 10.5, Philips ultrasound, Bothell, WA, EE.UU) para reproducir en imágenes el tumor (modo B) y para comprobar tanto la distribución intratumoral de microcápsulas después de una inyección como la destrucción de las microcápsulas a continuación de una insonación. Todos los datos ecográficos se registran sobre una cinta de vídeo.

35 Suministro de ADN *in vivo*

40 Unas ratas son anestesiadas por inyección de una mezcla de ketamina y xilazina (1 ml/kg). Después de una depilación, una mezcla que contiene formulaciones de microcápsulas preparadas de acuerdo con el Ejemplo 3 (3 μ l ó 10 μ l, equivalentes a 2,6 y 8,6 $\times 10^6$ microcápsulas) y 20 μ l de una solución de 1 mg/ml de un ADN de plásmido que codifica la proteína luciferasa (vector reportero de luciferasa pGL3, de Promega - Catalys AG, Wallisellen, Suiza) se inyectan por vía intratumoral usando una aguja 27 G (la aguja es dejada en su sitio durante 30 segundos después de una inyección y luego es retirada lentamente). A continuación, el tumor es insonado usando la sonda ajustada a medida que antes se ha detallado. La insonación se realiza con un gel conductor de ultrasonidos para asegurar una buena transmisión de los ultrasonidos.

45 En experimentos testigos, una inyección intratumoral de ADN en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) se realiza en microcápsulas, seguido por una insonación en condiciones de ultrasonidos similares.

50 Análisis de tumores

55 Para análisis cuantitativos de la transfección, se extirpan tumores 48 horas después de una insonación, y se homogeneizan en 5 ml de un Reactivo de Lisis de Cultivos Celulares (de Promega - Catalys AG, Wallisellen, Suiza) a 18.000 rpm durante 20 segundos, usando un homogeneizador POLYTRON®. Los materiales homogeneizados son luego centrifugados a 1.000 g durante 10 minutos y el material sobrenadante es analizado con un luminómetro (Victor², Perkin Elmer, Courtaboeuf, Francia) usando el estuche Promega para luciferasa (Reactivo de Ensayo de Luciferasa, Promega - Catalys AG, Wallisellen, Suiza). La actividad de luciferasa es calibrada a la unidad luminosa por picógramo (pg) de una solución patrón de luciferasa (QuantiLum® Recombinant Luciferase, Promega - Catalys AG, Wallisellen, Suiza). El resultado final es expresado como pg de luciferasa por g de tumor.

60 Como se muestra en la Tabla 1 siguiente, la eficiencia de transfección es más alta en unos tumores en los que se ha inyectado con microcápsulas y se ha insonado, en comparación con tumores testigo. Además, la eficiencia de suministro de genes aumenta con la dosis de las microcápsulas inyectadas.

65

ES 2 346 079 T3

TABLA 1

Suministro de genes in vivo en tumores de ratas mediado por ultrasonidos

	pg de luciferasa/ g de tumor
Tumores testigos (n = 3): Sin microcápsulas + ADN + US	0,7
Tumores tratados (n = 4): 2,6x10 ⁶ microcápsulas + ADN + US	2,4
Tumores tratados (n = 6): 8,6x10 ⁶ microcápsulas + ADN + US	6,3

Ejemplo 17

20 *Suministro in vivo de fármacos por insonación con microcápsulas*

Preparación de los animales

25 Unas células de adenocarcinoma mamario R3230, cosechadas a partir de un vehículo vivo y homogeneizadas, se implantan en ratas Fisher 344 hembras. Unas células R3230 en suspensión (0,2 ml, aproximadamente 1 x 10⁷ células tumorales) se inyectan por vía subcutánea en una almohadilla mamaria a cada lado del abdomen en cada animal (con una edad de 10-12 semanas). Los tumores se hacen crecer durante aproximadamente 20 días hasta que se alcanza el tamaño deseado. Unos tumores no necróticos sólidos con un diámetro de 10-15 mm, se usan para experimentos de insonación.

Suministro in vivo de doxorrubicina por exposición a ultrasonidos

35 Se usa un total de 10 ratas cada una con 2 tumores para los experimentos. Uno de los tumores de cada par se usa como un testigo interno, y por lo tanto no es expuesto a ultrasonidos. Las ratas son anestesiadas por inyección de una mezcla de ketamina y xilazina (1 ml/kg). Luego, una doxorrubicina liposomal (Caelyx[®], de Schering-Plough) es inyectada lentamente en la vena yugular (a través de un catéter crónico) en una dosis de 8 mg/kg de peso corporal, con una aguja del calibre 27 (1 mg de doxorrubicina en 500 μ l). Después de 10 minutos, unas formulaciones de microcápsulas, preparadas de acuerdo con el Ejemplo 3, son infundidas dentro de la vena yugular en un caudal de 0,1 ml/min (5 x 10⁸ microcápsulas/ml). Luego, 30 segundos más tarde, se usa un transductor de 1 MHz (T4) montado en un tubo de plexiglass relleno con agua que tiene una longitud de 50 mm, permitiendo una insonación de tumores en la distancia al campo cercano, con el fin de insonar a uno de los tumores. Detalles del transductor T4 son los siguientes:

	Fabricante	Frecuencia de funcionamiento [MHz]	Tipo	Abertura [mm]	Distancia al campo cercano [mm]
50	T4	1	No enfocado respaldado por aire	12,7	50

55 El sistema de suministro por ultrasonidos comprende además un amplificador de RF de potencia ENI A150 (de ENI, Rochester, N.Y.), y un generador de ondas arbitrarias Tabor 8024 (Tabor Electronics Ltd, Hanan, Israel). Uno de los tumores se selecciona aleatoriamente para ser insonado en condiciones controladas (1,5 MPa, ciclo de servicio de 60 40%, frecuencia de repetición de impulsos de 100 Hz, 12 veces con una duración de la exposición de 5 segundos, con un intervalo de pulsación de 30 segundos para permitir el relleno máximo de las microcápsulas en la vasculatura del tumor), el segundo tumor sirve como un testigo. El volumen total de microcápsulas inyectadas es de aproximadamente 1 ml.

65

ES 2 346 079 T3

Cuantificación de doxorubicina intratumoral

Las propiedades fluorescentes de la doxorubicina (DOX) se usan para cuantificar la cantidad intratumoral de doxorubicina. Unos tumores R3230 se cosechan 24 horas después del tratamiento, se pesan y se homogeneizan con un Ultra-Turrax en un tampón Tris de pH 7 que contiene el patrón interno de Daunorrubicina (DNR) (Fluka, Buchs, Suiza). Luego las muestras se centrifugan a 8.800 g durante 10 minutos, y 200 μ l del material sobrenadante se mezclan con 125 μ l de una solución de Triton X-100 (3% v/v) y con 675 μ l de un tampón de formiato de amonio 5 mM de pH 4,5. La suspensión es centrifugada brevemente y sometida a una extracción de la fase sólida. Las muestras tratadas son luego analizadas por cromatografía de fase líquida de alto rendimiento (HPLC, acrónimo de High Performance Liquid Chromatography) usando una columna de fase inversa. Los compuestos eluidos que interesan, a saber DOX y DNR, se vigilan con un detector de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación y de emisión se ajustan a 475 y 550 nm, respectivamente. Las muestras se tratan siempre en ausencia de luz y dentro de unos tubos de polipropileno.

Los tumores expuestos a ultrasonidos en presencia de microcápsulas, presentan una más alta concentración de doxorubicina en comparación con los tumores testigos no insonados, indicando por lo tanto una mejoría en el suministro de fármacos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una suspensión acuosa que comprende un agente bioactivo y unas microcápsulas rellenas con un gas, que tienen una envoltura polimérica y/o de lípido, en la que dichas microcápsulas tienen una resistencia a un índice mecánico (MI) de una onda de ultrasonidos aplicada de por lo menos 0,15 y dicho agente bioactivo está sustancialmente sin unir con dicha envoltura y dispersado libremente en dicha suspensión.
- 10 2. Una suspensión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas microcápsulas tienen una resistencia a un índice mecánico de por lo menos 0,18.
3. Una suspensión de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la envoltura de dichas microcápsulas comprende un polímero biodegradable fisiológicamente compatible.
- 15 4. Una suspensión de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la envoltura de dichas microcápsulas comprende un lípido biodegradable insoluble en agua.
5. Una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en la que las microcápsulas tienen una rigidez Sp de por lo menos 5 N/m.
- 20 6. Una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en la que el gas contenido en las microcápsulas es un gas perfluorado.
7. Una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en la que dicho agente bioactivo es un fármaco o un material genético.
- 25 8. Una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en la que dicho agente bioactivo está asociado con un vehículo.
- 30 9. Una suspensión de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho agente bioactivo y dicho vehículo están asociados en la forma de una micela o de un liposoma.
10. Una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones 8 ó 9, en la que dicho vehículo comprende además un ligando para dirección a una diana.
- 35 11. Una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un agente de diagnóstico.
12. Una suspensión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además unos adyuvantes para intensificar el suministro del agente bioactivo dentro de las células.
- 40 13. Uso de una composición que comprende unas microcápsulas rellenas con un gas y un agente bioactivo como se define en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones para preparar una formulación farmacéuticamente activa para el suministro de dicho agente bioactivo mediado por ultrasonidos.
- 45 14. Un estuche farmacéutico que comprende un agente bioactivo y unas microcápsulas rellenas con un gas como se han definido en una cualquiera de las precedentes reivindicaciones 1 a 12, o como componentes liofilizados.
- 50
- 55
- 60
- 65

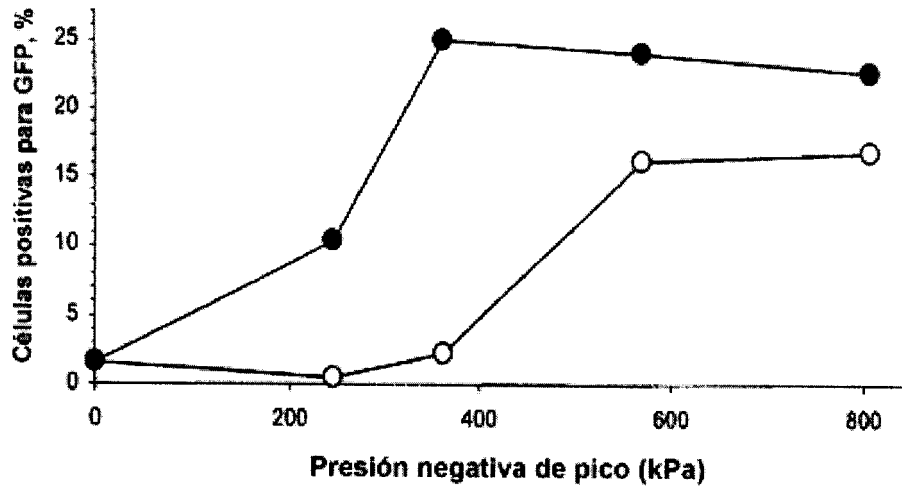


Figura 1a

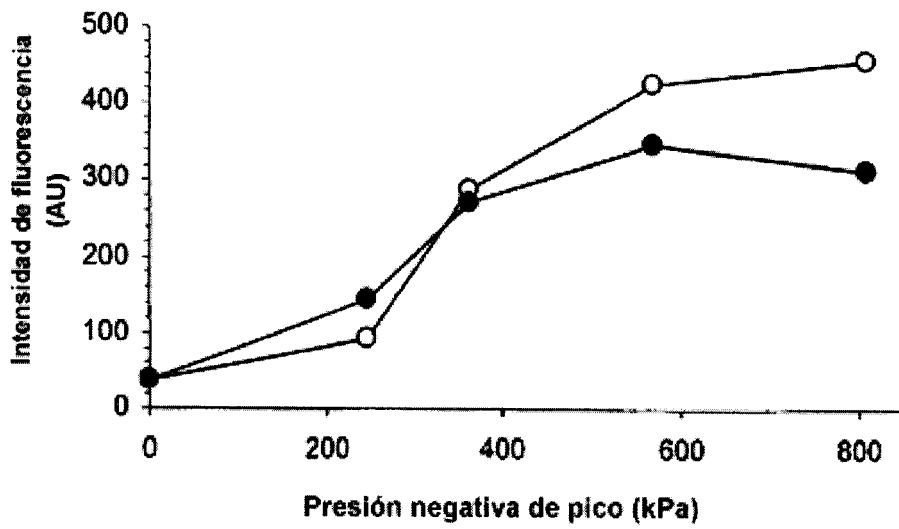


Figura 1b

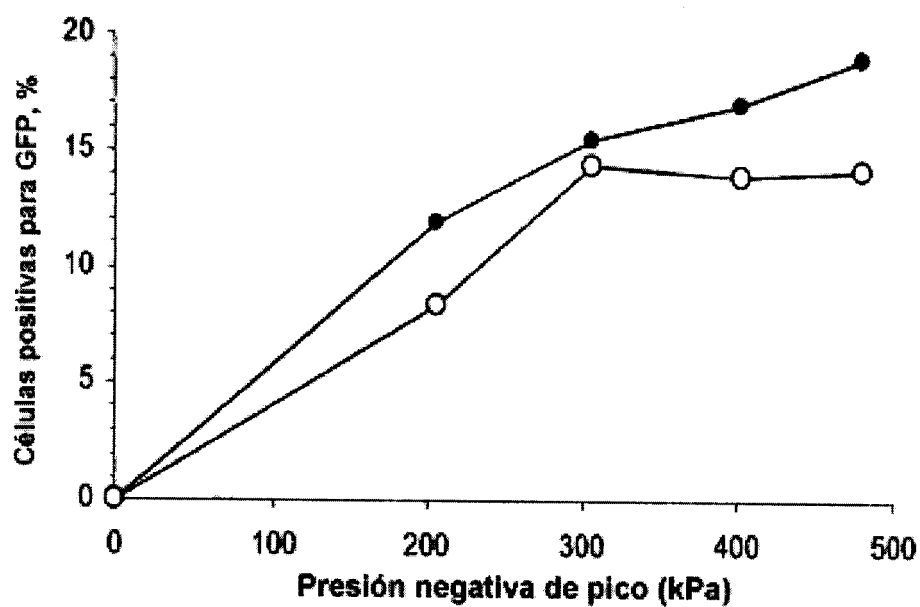


Figura 2a

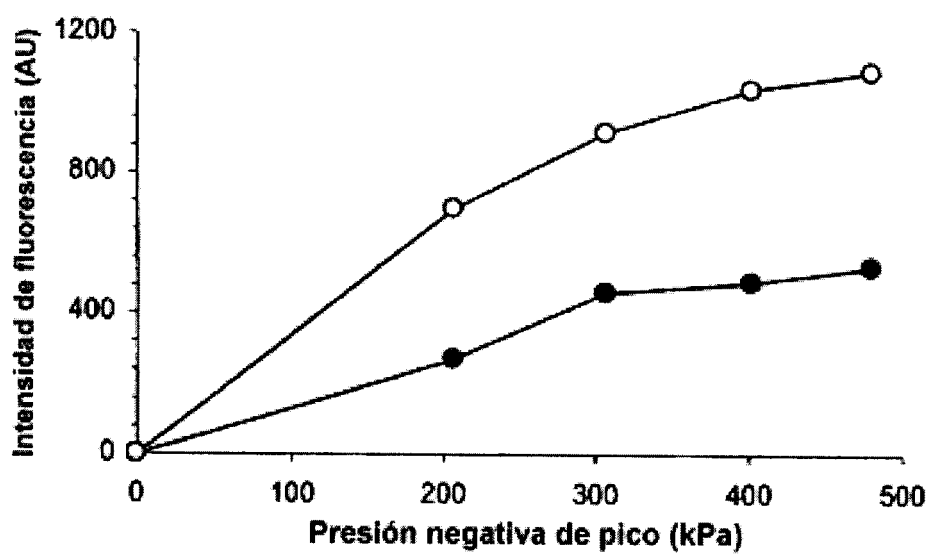


Figura 2b

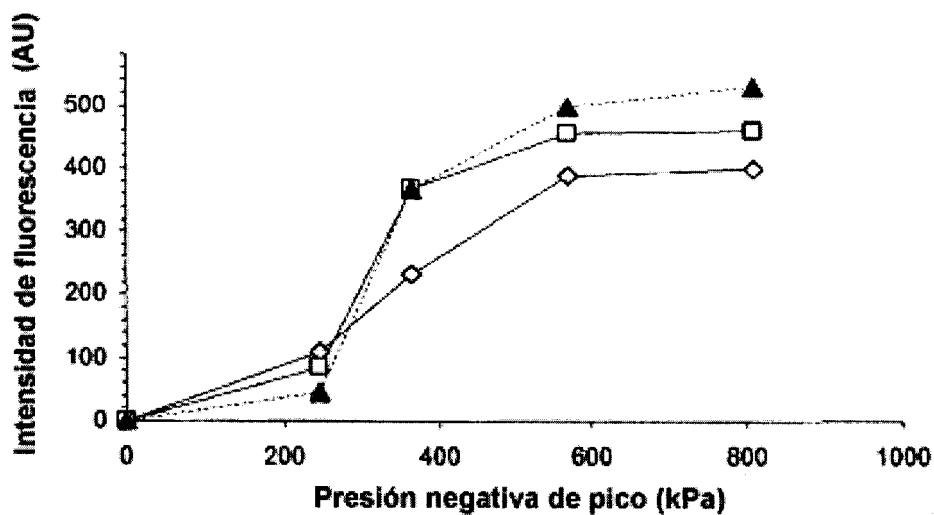


Figura 3

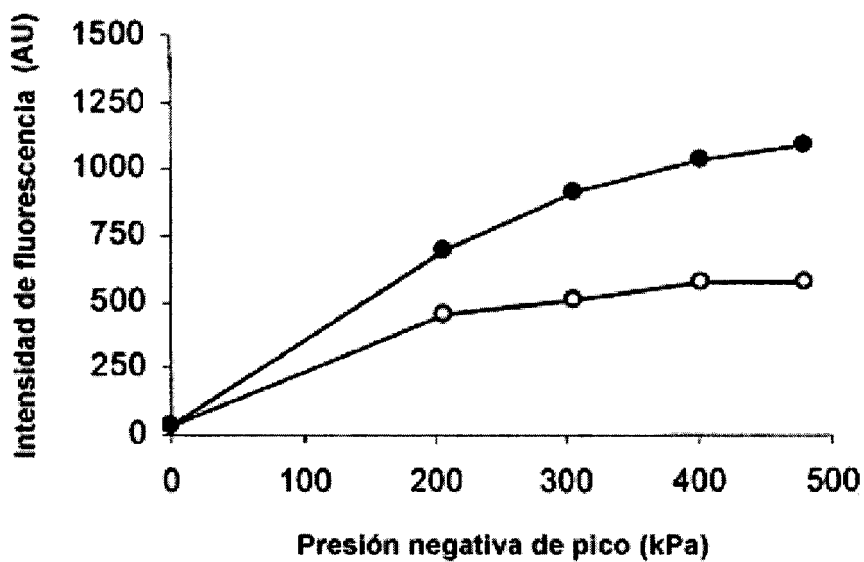


Figura 4