



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 725**

(51) Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 49/22 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02761334 .8**

(96) Fecha de presentación : **13.08.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1465666**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

(54) Título: **Ensamblajes multicomponente que tienen propiedades de unión mejoradas para diagnóstico y terapia.**

(30) Prioridad: **17.08.2001 US 932291**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

(73) Titular/es: **MALLINCKRODT Inc.**
675 McDonnell Boulevard, P.O. Box 5840
St. Louis, Missouri 63134, US

(72) Inventor/es: **Cantrell, Gary, L. y**
Burleigh, Daniel, B.

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Ensamblajes multicomponente que tienen propiedades de unión mejoradas para diagnóstico y terapia

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a composiciones para una unión dirigida mejorada para administrar selectivamente agentes de diagnóstico y terapéuticos a tejidos y órganos diana.

Antecedentes de la invención

10

Las fuerzas intermoleculares no covalentes (por ejemplo, electrostáticas, formación de enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals) desempeñan un papel vital en muchos procesos biológicos. Los ejemplos de dichos procesos incluyen la catálisis enzimática, la interacción de fármaco-receptor, la interacción de antígeno-anticuerpo, la interacción de biotina-avidina, la formación de doble hélice de ADN, la fagocitosis, la pigmentación en plantas y animales y el transporte celular.

15

20

La administración dirigida de moléculas médicamente útiles es bien conocida y se ha aplicado con éxito en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. En la química de bioconjugados convencional, casi todos los conjugados se preparan por unión covalente de diversas moléculas efectoras, tales como fármacos, colorantes, hormonas, agentes formadores de imágenes de resonancia magnética, agentes ecogénicos, agentes radiofarmacéuticos o agentes quimioterápicos, a transportadores bioactivos, tales como anticuerpos, péptidos y peptidomiméticos, carbohidratos o agonistas y antagonistas de receptores moleculares pequeños. Por ejemplo, en la medicina de diagnóstico, diversos radionúclidos y quelatos de radionúclidos unidos covalentemente a anticuerpos, hormonas, péptidos, peptidomiméticos y similares se han usado para detectar lesiones tales como tumores, inflamación, isquemia y trombos (Tenenbaum et al., Radiolabeled somatostatin analog scintigraphy in differentiated thyroid carcinoma, J. Nucl. Med., 1995, 36, 807-810; Haldemann et al., Somatostatin receptor scintigraphy in central nervous system tumors: Role of blood-brain barrier permeability. J. Nucl. Med., 1995, 36, 403-410; Babich et al., Technetium-99m-labeled chemotactic peptides: Comparison with indium-111-labeled white blood cells for localizing acute bacterial infection in the rabbit. J. Nucl. Med., 1993, 34, 2176-2181; Knight et al., Thrombus imaging with technetium-99m-labeled synthetic peptides based upon the binding domain of a monoclonal antibody to activated platelets. J. Nucl. Med., 1994, 35, 282-288). Por lo tanto, el sitio diana pueden ser células tales como células tumorales, plaquetas, eritrocitos, leucocitos, macrófagos, células endoteliales vasculares, células miocárdicas, hepatocitos, etc., o la matriz extracelular que rodea estas células.

25

30

35

Además de la administración directa de compuestos biológicamente activos al cuerpo, también se han encapsulado moléculas como éstas dentro de agregados anfífilos organizados tales como liposomas, vesículas u otras estructuras multilaminares. Los agregados se administran después a los órganos o tejidos particulares de interés (Patentes de Estados Unidos N° 5.985.852; 5.785.969; y 5.542.935).

40

45

Un requisito para la administración dirigida es una fuerte interacción entre el compuesto de unión o el resto de dirección (por ejemplo, ligando) y la diana o sitio de unión (por ejemplo, receptor) en la formación de un complejo (por ejemplo, complejo de ligando-receptor). El valor de la constante de disociación (K_d) del complejo debería estar típicamente en el intervalo nanomolar. Los compuestos que presentan valores de K_d de aproximadamente 100 nM y hacia arriba se consideran compuestos de unión débiles y generalmente no se consideran útiles para la formación de imágenes dirigida y aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, hay muchos procesos biológicos *in vivo* que funcionan usando múltiples interacciones de unión débiles. Estos incluyen, por ejemplo, complejos de enzima-sustrato y moléculas de adhesión celular, que funcionan en el intervalo de unión micromolar. Las moléculas de adhesión celular tales como selectinas E, P y L son moduladores biológicos importantes implicados en procesos inflamatorios y tromboticos. (McEver, Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis, Glycoconj. J., 1997, 14(5), 585-91; McEver et al., Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions, J. Biol. Chem., 1995, 270(19), 11025-8; Bischoff, Cell adhesion and angiogenesis. J. Clin. Invest., 1997, 100 (11 Supl.), S37-39; Lesley et al., CD44 in inflammation and metastasis, Glycoconj. J., 1997, 14(5), 611-22; Siegelman et al., Activation and interaction of CD44 and hyaluronin in immunological systems. J. Leukoc. Biol., 1999, 66(2), 315-21).

50

55

60

Trabajos anteriores en este área implicaban el uso de únicamente ligandos de alta unión (Torchilin et al., Preservation of antimyosin antibody activity after covalent coupling to liposomes, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, 89(4), 1114-9; Allen et al., A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1237, 99-108; Zalipsky et al., Peptide attachment to extremities of liposomal surface grafted PEG chains: preparation of the long-circulating form of laminin pentapeptide, YIGSR. Bioconjug. Chem., 1995, 6(6), 705-8). Aunque se observó una unión aumentada en este sistema, no era necesario un efecto cooperativo debido a que el ligando ya estaba dotado de una afinidad suficiente para los fines del direccionamiento. Por el contrario, los ligandos que se unían débilmente representaban un desafío formidable.

El documento US 5962422 describe liposomas polimerizados que comprenden dos agentes de unión diferentes, un oligosacárido y un compuesto aniónico, para mejorar la unión a selectinas.

65

Se están realizando esfuerzos considerables para mejorar la afinidad de unión de selectinas y miméticos de selectina

que se unen relativamente débilmente, y para unir las covalentemente a moléculas efectoras con fines de formación de imágenes y terapéuticos (Fukuda et al., Peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells, Cancer Research, 2000, 60, 450-456). Sin embargo, dichos esfuerzos implican habitualmente sintetizar y explorar un gran número de nuevas entidades químicas para descubrir las que muestran propiedades de unión sustancialmente mejoradas. Además, se espera que la simple conjugación de restos efectoras con un transportador que ya se unía débilmente dé como resultado un bioconjugado cuya bioactividad se disminuya enormemente o se evite totalmente. Por lo tanto, existe la necesidad de un método simple para aumentar la afinidad de cualquier molécula dirigida que se una débilmente para mejorar su utilidad para fines de diagnóstico y/o terapéuticos.

Sumario de la invención

La invención se refiere a composiciones que mejoran la unión de un compuesto, particularmente un compuesto que se une débilmente, a su sitio diana en un paciente.

Se prepara y se proporciona a un paciente un ensamblaje de conjugado multifuncional móvil organizado (OMMC), como se define en las reivindicaciones. El ensamblaje de OMMC se prepara por anclaje de al menos dos compuestos de unión a una estructura laminar. En una realización, un compuesto de unión es un compuesto aniónico, y otro compuesto de unión es un sacárido, y la estructura laminar es un liposoma, microesfera, micela. Los compuestos de unión incorporados en la estructura laminar son móviles, y se autoajustan el uno respecto al otro para formar un conjunto de OMMC. El conjunto de OMMC se une a una diana que contiene al menos dos sitios de afinidad complementarios para los compuestos de unión. Un agente, también denominado una molécula efectora, puede unirse a y/o estar contenido dentro de la estructura laminar para proporcionar un agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a un paciente al que se administra el OMMC.

Estas y otras ventajas de los compuestos y métodos de la invención serán evidentes a la luz de las figuras, descripción y ejemplos siguientes.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una ilustración esquemática de la estructura general de un ensamblaje de conjugado multifuncional móvil organizado (OMMC).

La FIG. 2 es una ilustración esquemática de las etapas en la formación y la unión de un conjunto de OMMC a una diana.

La FIG. 3 es una ilustración esquemática bidimensional de un conjunto de OMMC que se une a una diana.

La FIG. 4 muestra los resultados de un conjunto de OMMC compuesto que se une a células endoteliales humanas. Descripción detallada

En interacciones no covalentes, aunque la energía libre de asociación por interacción unitaria es bastante pequeña (menos de aproximadamente 40 kJ/interacción), el efecto acumulado de múltiples puntos de interacción a lo largo de dos superficies puede ser importante. Esto puede conducir a una unión específica fuerte entre las entidades de unión. La mejora de la unión debido al efecto cooperativo de múltiples dominios de unión entre dos unidades de interacción es bien conocida en la química biológica. Por ejemplo, la multivalencia de la mayoría de los antígenos conduce a un efecto sinérgico, en el que la unión de dos moléculas de antígeno por anticuerpo es mayor que la suma de las uniones de antígeno-anticuerpo individuales (J. Kuby, Immunology, 2ª Edición, 1994, W.H. Freeman & Co., Nueva York, págs. 138-139).

En la invención, se consigue una unión mejorada de un compuesto de unión que se une débilmente (es decir, una K_d de aproximadamente 100 nM o superior) a una diana usando un ensamblaje multicomponente. En concreto, un ensamblaje de conjugado multifuncional móvil organizado (OMMC) se prepara por anclaje de al menos dos compuestos de unión a una estructura laminar como se define en las reivindicaciones. En una realización, los compuestos de unión son un compuesto aniónico y un sacárido, y la estructura laminar es un liposoma, microesfera, micela. El ensamblaje de OMMC se proporciona a un paciente. Los compuestos de unión incorporados en la estructura laminar son móviles, y se autoajustan el uno respecto al otro para formar un conjunto de OMMC que se une a una diana que contiene al menos dos sitios de afinidad complementarios para los compuestos de unión.

El término "organizado" se refiere a ensamblajes que son capaces de asumir una configuración próxima a la óptima en una superficie de ensamblaje para unirse en sitios de interacción particulares. El término "móvil" se refiere al grado de libertad dentro del ensamblaje para permitir que los componentes o compuestos de unión complementarios se muevan independientemente dentro de la estructura laminar, el uno con respecto al otro, para asumir la configuración óptima. La expresión "conjugado multifuncional" se refiere a dos o más componentes anfífilos, conteniendo cada uno un compuesto de unión para un sitio de afinidad complementario diana. Los compuestos de unión del conjunto se unen cooperativamente a la diana con una afinidad de unión mejorada, sin que las regiones de unión específicas estén contenidas dentro de una sola molécula. Además, los compuestos de unión en el conjunto de la invención, contruidos de modo que se expresan a lo largo de un volumen de espacio ocupado fuera del conjunto, se mueven dentro de este espacio para interrogar al espacio hasta que encuentran sus complementos de unión respectivos.

Un agente o molécula efectora, por ejemplo, un agente de contraste, puede unirse a y/o estar contenido dentro de la estructura laminar para proporcionar la administración dirigida del agente en un paciente al que se administra el ensamblaje de OMMC como se define en las reivindicaciones. La unión mejorada de estos compuestos de unión puede aprovecharse para fines de diagnóstico y terapéuticos.

La invención supera los problemas presentados por compuestos que se unen débilmente usando nuevos ensamblajes de OMMC. Estos ensamblajes de OMMC de autoajuste dinámico permiten una especificidad y afinidad de dirección aumentadas del compuesto de unión hacia sitios de afinidad en la diana, particularmente en comparación con un agregado de componentes de unión activos individuales.

La invención también se refiere al uso de los ensamblajes de OMMC descritos como se definen en las reivindicaciones para administrar moléculas efectoras a los tejidos u órganos diana para fines de diagnóstico y/o terapéuticos. Se preparan ensamblajes de OMMC apropiados que contienen un agente de diagnóstico y/o terapéutico o una molécula efectora unida a, incorporada en o contenida dentro de la estructura laminar. Se incorporan dos o más compuestos de unión sobre o en la superficie de los ensamblajes de OMMC. Los ensamblajes de OMMC se administran en una cantidad eficaz a un paciente, y los compuestos de unión se mueven alrededor en o sobre la superficie y autoajustan sus posiciones y configuraciones relativas en o sobre el ensamblaje para unirse a sitios de afinidad en una diana. Por lo tanto, se realiza en el paciente un procedimiento de diagnóstico o terapéutico. El procedimiento puede usar una técnica de formación de imágenes, por ejemplo, rayos X, tomografía computarizada (CT), tomografía por emisión de positrones (PET), resonancia magnética (MR), ultrasonido, óptica o radiografía. El procedimiento también puede usar un procedimiento de diagnóstico *in vitro*, o un procedimiento químico-, foto- o radioterapéutico, usando métodos conocidos en la técnica.

Una ventaja de la presente invención es que no requiere moléculas de alta unión para conseguir un efecto cooperativo.

La estructura general de un ensamblaje de OMMC 10 se muestra en la FIG.1. Una estructura laminar 13, formando la superficie externa un tipo de carcasa circundante 11, contiene los compuestos de unión 16a, 16b. Los compuestos de unión 16a, 16b pueden ser un ligando, un anticuerpo, un péptido, un peptidomimético, un carbohidrato o un ligando agonista o antagonista de receptor molecular pequeño. En la estructura laminar 13 hay regiones 12a, 12b que incorporan los compuestos de unión 16a, 16b sobre o en el ensamblaje 10. Los compuestos de unión 16a, 16b contienen regiones de unión o epítopos 14a, 14b. Estos epítopos 14a, 14b pueden tener individualmente una unión débil y unirse a una diana sólo a través de un efecto cooperativo. Los enlazadores flexibles 18a, 18b conectan o unen las regiones de unión 14a, 14b a las regiones de anclaje 12a, 12b.

Las regiones de anclaje 12a, 12b son hidrófobas y se autoensamblan para minimizar su aspecto respecto a la fase acuosa. Las regiones de anclaje 12a, 12b pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a\text{-W}$, $\text{CF}_3(\text{CH}_2)_a\text{-W}$, $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_a\text{-W}$, $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_a\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-W}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a\text{-O-(CH}_2)_b\text{-W}$, $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_a\text{-O-(CH}_2)_b\text{-W}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a\text{-S-(CH}_2)_b\text{-W}$ o $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a\text{-S-S-(CH}_2)_b\text{-W}$, en las que a y b varían de 16 a 32, W es una unidad conectora de $-\text{O}-$, $-\text{CO}-$, $-\text{CO}_2^-$, $-\text{OCO}-$, $\text{O}_2\text{CO}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2^-$, $-\text{NH}-$, $\text{NHCO}-$, $-\text{NHCS}-$, $-\text{NHSO}_2^-$, $-\text{PO}_2^-$, $-\text{OPO}_2^-$, $-\text{PO}_2\text{H}-$ o $-\text{OPO}_2\text{H}-$.

Las regiones de unión 14a, 14b son hidrófilas y están solvatadas con una fase acuosa. Las regiones de unión 14a, 14b pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan de aminoácidos, péptidos y peptidomiméticos; mono-, di- y oligosacáridos, tales como C u O monosacáridos y glucósidos, C u O glucósidos, glucosa, galactosa, fucosa, ácido siálico, ácido carmínico o compuestos aniónicos de $-(\text{CH}_2)_d\text{-CO}_2^-$, $-(\text{CH}_2)_d\text{-SO}_3^-$, $-(\text{CH}_2)_d\text{-OSO}_3^-$, $-(\text{CH}_2)_d\text{-PO}_3^{=}$, $-(\text{CH}_2)_d\text{-OPO}_3^{=}$, $-\text{Ar-SO}_3^-$, DTPA, EDTA, DOTA o EGTA, en los que d varía de 1 a 10.

Los enlazadores 18a, 18b pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan de polisorbatos, poligliceroles, polipéptidos, polinucleótidos, polisacáridos, polivinilpirrolidonas, alcoholes polivinílicos, polietilenglicoles tales como polietilenglicoles que tienen un peso molecular en el intervalo de 1.000 a 4.000, poliglicolato, polilactato o copolímeros derivados de cualquiera de los grupos anteriores.

La estructura laminar 13 es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_e\text{-X}$, e varía de 16 a 32, X es carboxilato, sulfonato, sulfato, fosfato o fosfonato. La estructura laminar 13 también pueden ser sales de ácidos docosanoico, tetracosanoico, hexacosanoico, octacosanoico y triacontanoico.

Las diversas composiciones químicas de las regiones de anclaje, regiones de unión, enlazadores y estructura laminar son como se enumeran en las tablas siguientes.

Tabla 1: Anclajes

A1 y/o A2 (12a o 12b)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a\text{-W}$
$\text{CF}_3(\text{CH}_2)_a\text{-W}$
$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_a\text{-W}$
$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_a\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-W}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a\text{-O-(CH}_2)_b\text{-W}$
$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_a\text{-O-(CH}_2)_b\text{-WCF}_3(\text{CF}_2)_a\text{-O-(CH}_2)_b\text{-W}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a\text{-S-(CH}_2)_b\text{-W}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_A\text{-S-S-(CH}_2)_B\text{-W}$
a, b = 16-32
R^1 es un radical alquilo normal que contiene 16-24 átomos de carbono.
W
-O-
-CO-
-CO ₂
-OCO-
-O ₂ CO-
-S-
-SO-
-SO ₂ -
-OPO ₂ H-
-NH-
-NHCO-
-NHCS-
-NHSO ₂ -
-PO ₂ H
-PO ₂ -
-OPO ₂ -

Tabla 2: Región de unión (Epítomos)

B1 y/o B2 (14a, 14b)
aminoácidos
péptidos (1-20 aminoácidos)
peptidomiméticos
monosacáridos
oligosacáridos (1-10)
compuestos aniónicos seleccionados de:
$\text{-(CH}_2)_d\text{-CO}_2^-$

B1 y/o B2 (14a, 14b)	
-(CH ₂) _d -SO ₃ ⁻	
-(CH ₂) _d -OSO ₃ ⁻	
-(CH ₂) _d -PO ₃ ⁼	
-(CH ₂) _d -OPO ₃ ⁼	
d = 1-10	
-Ar-SO ₃ ⁻	
DTPA	
EDTA	
DOTA	
EGTA	
C- u O-monosacáridos y glucósidos tales como:	
glucosa	
manosa	
fucosa	
galactosa	
glucosamina	
manosamina	
galactosamina	
ácido siálico	
C- u O-glucósidos tales como:	
rutina	
neohesperidina dihidrochalcona	
floridizina	
hesperidina	
hesperidina metilchalcona	
naringenina	
esculina	
familia del ácido carmínico incluyendo carmina, ácido 18b-glicirretínico y sal	
B1	B2
oligosacárido derivado de la familia de carbohidratos de los glucanos, incluyendo:	-O (CH ₂) _{1 ó 2} CO ₂ ⁻
ácido hialurónico	-O (CH ₂) _{1 ó 2} SO ₃ ⁻
heparina	-O (CH ₂) _{1 ó 2} SO ₄ ⁻
sulfato de condroitina	-O (CH ₂) _{1 ó 2} PO ₄ ⁻
dermatán	
mono o disacárido, incluyendo:	
galactosa	
fucosa	
glucosa	

B1 y/o B2 (14a, 14b)	
manosa	
ácido hialurónico	

Tabla 3: Estructura laminar

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_e\text{-X}$
$e = 16-32$
$X = \text{carboxilato, sulfonato, sulfato, fosfato, fosfonato}$
sales de:
ácido docosanoico
ácido tetracosanoico
ácido hexacosanoico
ácido octacosanoico
ácido triacontanoico

Tabla 4: Enlazadores

L1 y/o L2 (18a, 18b)
polisorbatos
poligliceroles
polipéptidos
polinucleótidos
polisacáridos
polivinilpirrolidonas
alcoholes polivinílicos
polietilenglicoles
poliglicolato
polilactato
poli(etilenglicol) _p (p = 40-150)

5

En una realización de la invención, los ensamblajes de OMMC 10, como se definen en las reivindicaciones, tienen la estructura general mostrada en la FIG. 1, en la que los anclajes 12a, 12b pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan del grupo o grupos que consisten en $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a\text{-W}$, en el que a varía de 16 a 24 y W es una unidad conectora seleccionada del grupo que consiste en -O-, -CO-, -CO₂-, -OCO-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NH-, -NHCO-, -NHCS-, -NHSO₂-, -PO₂H- o -OPO₂H-. Las regiones de unión 14a, 14b pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en C u O monosacáridos y glucósidos, conteniendo los oligosacáridos de 1 a 10 unidades de furanosa o piranosa, aminoácidos o péptidos que contienen de 1 a 20 restos aminoácidos, C- u O-glucósidos (rutina, neohesperidina dihidrochalcona, floridizina, hesperidina, hesperidina metilchalcona, naringenina, esculina); miembros de la familia del ácido carmínico incluyendo carmina, ácido 18b-glicirretínico y sales. Los enlazadores 18a, 18b pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en polietilenglicoles, poliglicolato y polilactato. La estructura laminar 13 se selecciona del grupo que consiste en $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_e\text{-X}$, en el que e varía de 16 a 32, y X se selecciona del grupo que consiste en carboxilato, sulfonato, sulfato, fosfato y fosfonato.

En otra realización de la invención, los ensamblajes de OMMC 10, como se definen en las reivindicaciones, tienen la estructura general que se muestra en la FIG. 1, en la que la región de unión 14a es un oligosacárido derivado de la familia de carbohidratos de los glucanos, que incluye ácido hialurónico, heparina, sulfato de condroitina y dermatán, o un

mono- o disacárido que incluye galactosa, fucosa, glucosa, manosa o ácido hialurónico. En esta realización, la región de unión 14b se selecciona del grupo que consiste en $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1 \text{ ó } 2}\text{CO}_2^-$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1 \text{ ó } 2}\text{SO}_3^-$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1 \text{ ó } 2}\text{SO}_4^-$; $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1 \text{ ó } 2}\text{PO}_4^-$. Los enlazadores 18a, 18b se seleccionan del grupo que consiste en poli(etilenglicol)_p, siendo p entre 40 y 150 unidades. La estructura laminar 13 se selecciona del grupo que consiste en sales de ácido docosanoico, tetracosanoico, hexacosanoico, octacosanoico y triacontanoico.

La mejora de la afinidad de los compuestos que se unen débilmente 16a, 16b se logra de acuerdo con el método siguiente, como se ilustra esquemáticamente en las FIGS. 2 y 3. Dos o más compuestos de unión 16a, 16b, tales como compuestos que se unen débilmente, se añaden a la estructura laminar 13 para formar un ensamblaje de OMMC 10a. Los compuestos de unión 16a, 16b se distribuyen inicialmente de forma aleatoria por toda la estructura laminar 13.

Los compuestos de unión 16a, 16b en el ensamblaje 10, en presencia de los sitios de afinidad complementarios 15a, 15b en la diana 17, se mueven alrededor de la estructura laminar en o sobre la superficie y autoajustan sus posiciones y configuraciones relativas por movimiento diferencial para producir una estructura de conjunto optimizada 30, unida a los sitios de afinidad complementarios 15a, 15b, tales como receptores. La movilidad de los compuestos de unión 16a, 16b en y sobre el ensamblaje de OMMC 10a es similar al movimiento diferencial de las moléculas anfífilas dentro de una superficie de membrana celular. La unión óptima se produce por aproximación a un proceso de equilibrio. Todos los componentes del ensamblaje de OMMC 10 tienen un movimiento dinámico, tanto hacia arriba y hacia abajo como de lado a lado. Además, los enlazadores 18a, 18b actúan como uniones también pueden "flotar" dentro de un volumen de espacio dado a lo largo de la superficie del ensamblaje 10 en la fase acuosa. Si se encuentra una región expresada de una diana 17 que tiene muchos sitios de afinidad 15a, 15b, comienzan a aparecer múltiples uniones y se establece un equilibrio dinámico: a medida que un conjunto de compuestos de unión 16a, 16b se desprende, otro conjunto de compuestos de unión 16c, 16d (no se muestra) adyacente a los compuestos de unión 16a, 16b están dentro de una distancia espacial para unirse. En un punto, el número de uniones a una diana 17 es suficiente para detener el movimiento del ensamblaje 10, esencialmente "inmovilizándolo" sobre la diana 17. Los compuestos de unión (por ejemplo, ligandos) 16a, 16b en el ensamblaje optimizado 10 se unen después a través de sus regiones de unión 14a, 14b, de una forma cooperativa, a sus epítomos respectivos en los receptores 15a, 15b de la diana 17. Por lo tanto, los dominios de unión 14a, 14b, que individualmente pueden tener una interacción débil con una superficie diana dada, forman una composición de auto-optimización, dando como resultado una eficacia de unión y dirección enormemente aumentadas.

Como se ha indicado anteriormente, el ensamblaje de OMMC 10 puede alojar diversas moléculas efectoras 30. Las moléculas efectoras 30 incluyen, por ejemplo, fluidos (por ejemplo, un fluorocarburo líquido o gas o un fluido supercalentado) útiles para procedimientos ultrasónicos, compuestos fluorescentes útiles para procedimientos ópticos biomédicos, agentes paramagnéticos útiles para procedimientos de formación de imágenes de resonancia magnética, radionúclidos para aplicaciones de medicina nuclear tales como I-123, I-131, Tc-99m, Re-186, Re-188, SM-152, Ho-155, Bi-202 y Lu-157, y agentes de opacificación de rayos X para procedimientos de rayos X o tomografía computarizada. Los expertos en la materia conocen bien ejemplos de cada una de estas moléculas efectoras y sus dosis eficaces y usos, como se describen en, por ejemplo, Fritzsche et al., Eur. Radiol. 2, 2-13 (1992); Rubaltelli, Photodiagnostic and Phototherapeutic Techniques in Medicine, en Documento Editoriale, G. Jon and C. Perria (Eds.), Milano, 1995, 101-107; Andreoni et al., Tumour Photosensitization by Chemotherapeutic Drugs, Biología, 1993, N° 3, 43-6; Knoefel, I.E.P.T. Sección 76, Vol. 1, Pergamon Press, Oxford y Nueva York, 1971, Capítulo 2: Organic Iodine Compounds as X-ray Contrast Media; Rumack et al., Diagnostic Ultrasound, Vol. 1, Mosby Year Book, St. Louis, Capítulo 3, Contrast Agents in Diagnostic Ultrasound, 30-42 (1992); Forsberg et al., Ultrasonics 1998, Clinical Applications of Ultrasound Contrast Agents, febrero, 36(1-5): 695-701; Goldberg et al., Ultrasound Med. Biol. 1994, 20(4): 319-33, Ultrasound Contrast Agents: A Review; deJong y Ten Cate, Ultrasonics 1996 Jun, 34(2-5): 587-90, New Ultrasound Contrast Agents and Technological Innovations; Goldberg, Clin. Diag. Ultrasound 1993, 28: 35-45, Ultrasound Contrast Agents; Dalla Palma y Bertolotto, Eur. Radiol., 1999, Supl. 3: S338-42, Introduction to Ultrasound Contrast Agents: Physics Overview; Ophir and Parker, Ultrasound Med. Biol. 1989, 15(4): 319-33, Contrast Agents in Diagnostic Ultrasound; Klibanov et al., MAGMA 1999 Ag., 8(3): 177-184, Targeting and Ultrasound Imaging of Microbubble-Based Contrast Agents; Makdisi y Versland, Targeted Diag. Ther. 1991, 4: 151-162, Asialoglycoproteins as Radiodiagnostic Agents for Detection of Hepatic Masses and Evaluation of Liver Function; documento WO 9004943; Patente de Estados Unidos N° 5.312.617; Tilcock et al., Radiology 1989, 171: 77-80, Liposomal Gd-DTPA: Preparation and Characterization of Relaxivity.

La dosis de moléculas efectoras depende del tipo de formación de imágenes o terapia que se realice (nuclear, óptica, resonancia magnética, ultrasonido, óptica, acústica o contraste de rayos X). En general, las dosis necesarias para estos procedimientos varían. Por ejemplo, para la formación de imágenes nucleares, dependiendo del tipo de emisión, sólo son necesarios unos pocos microgramos. Los agentes de formación de imágenes ópticas requieren de decenas a cientos de miligramos para una dosis humana. La formación de imágenes por ultrasonido requiere de aproximadamente $0,2 \text{ a } 10 \times 10^9$ microburbujas/ml, con una dosis típica de aproximadamente 1 ml (estabilizada con unos pocos miligramos de compuesto) de las formulaciones descritas; en una realización, se usaron 250 µl. La formación de imágenes de resonancia magnética requiere típicamente dosis de 50 a 1000 miligramos en solución de quelatos metálicos. La formación de imágenes de contraste de rayos X requiere varios gramos de material en solución para la opacificación. En una realización, se realiza una formación de imágenes de contraste de rayos X dirigida del hígado, captándose las moléculas efectoras por las células hepáticas.

La molécula efectora 30 puede unirse, directa o indirectamente, al ensamblaje 10 o estar contenida dentro del ensamblaje 10. Por ejemplo, un agente ecogénico y/o agente de MRI puede ser un fluido contenido en el hueco del ensamblaje 10. Un radionúclido, agente óptico y/o citotóxico puede estar en cualquier parte en el ensamblaje 10 (en el hueco o en el compuesto de unión 16a, 16b). Un agente quimioterápico en el ensamblaje 10 puede liberarse por ultrasonificación para inducir una terapia, como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.770.222 y 5.733.572, y en el documento WO 684386. Un agente paramagnético puede estar en el ensamblaje 10 en la región de los enlazadores 18a, 18b o los epítomos 14a, 14b, de modo que esté en contacto con el medio acuoso. Una molécula efectora 30 puede ser un agente ecogénico tal como una microburbuja que contiene uno o más fluidos, un fluoróforo o cromóforo capaz de emitir o absorber radiación electromagnética en el intervalo de aproximadamente 300-1200 nm, una molécula radiactiva capaz de emitir radiación alfa, beta o gamma, un agente paramagnético, agente de opacificación de rayos X y/o agente quimioterápico.

En una realización, el agente 30 es un agente ecogénico, fluoróforo o cromóforo capaz de absorber o emitir luz en el intervalo de 300 a 1200 nm, un agente radiofarmacéutico tal como ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA) o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), quelatos de isótopos emisores de beta y gamma tales como Lu, Sm, In, Ru, Tc; agentes citotóxicos incluyendo fluorouracilo, fluorouridina, etc., y/o antibióticos sulfa incluyendo N'-(w-tiazolil)sulfanilamida, sulfmetoxazol, sulfisoxazol y sulfisomidina.

En otra realización, el agente 30 es un gas perfluoropropano o perfluorobutano ecogénico insoluble en agua, o es uno o más de hexafluoruro de azufre, tetrafluorometano, hexafluoroetano, octafluoropropano, decafluorobutano, dodecafluoropentano y perfluorohexano. Los agentes ecogénicos incluyen mezclas de estos gases con un gas común, o mezcla de gases tales como nitrógeno, oxígeno, helio, neón, argón, xenón y dióxido de carbono. Pueden usarse fluidos supercalentados o azeótropos de fluorocarburos y perfluorocarburos. El agente 30 puede ser un indicador óptico, tal como fluoresceínas, rodaminas, cianinas, indocianinas (por ejemplo, verde de indocianina), escuaraínas, fenotiazinas, porfirinas y compuestos azo.

En otra realización más, el agente 30 puede ser una molécula bioactiva, tal como selectinas E, P y L, miméticos de selectina, ácido hialurónico, heparina, CD44, ICAM 1. En este caso, los sitios de unión por afinidad 15a, 15b en la diana 17 pertenecen generalmente a la clase de receptores de carbohidrato que se encuentran, por ejemplo, en células endoteliales vasculares, leucocitos o plaquetas.

La estructura 13 del ensamblaje de OMMC 10 puede construirse por métodos conocidos por un experto en la materia incluyendo micelas, liposomas, emulsiones, micropartículas, microburbujas, vesículas unidas por membranas uni- o multilaminares, nano- y micropartículas, nano- y microagregados, nano- y microenvolturas. En una realización, una estructura unilaminar rodea un núcleo relleno de fluido, tal como una emulsión de gas/líquido (burbuja). En otra realización, la estructura laminar 13 es un híbrido que contiene cierta cantidad de sustancia cerosa o polímero que se mezcla con los componentes de unión 16a, 16b para formar las regiones de anclaje 12a, 12b. Los métodos de formación incluyen el uso de un microfluidizador de ultrasonidos, el uso de un molino coloidal, y ultramezcla como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.510.118; 5.543.133; y 5.552.133.

El tamaño del ensamblaje 10 puede variarse de acuerdo con el tipo de aplicación contemplada. El tamaño del ensamblaje 10 puede ser, en una realización, inferior a 5 micrómetros. En otra realización, el tamaño del ensamblaje puede variar de 1 nm a 10^4 nm, y puede controlarse por métodos conocidos, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.001.335.

Las composiciones de la invención tienen una amplia utilidad clínica. Los usos incluyen la formación de imágenes de diagnóstico de tumores, de inflamación (tanto infecciosa como no infecciosa) y de vasos sanguíneos alterados; el examen endoscópico guiado por láser de sitios de lesión; la formación de imágenes de diagnóstico usando ultrasonidos, resonancia magnética, procedimientos de formación de imágenes ópticas y radiográficas, y terapia fotodinámica y quimioterapia de tumores y de infección. Otros usos potenciales para la unión específica dirigida son la formación de imágenes vasculares del endotelio, la formación de imágenes de tejido neovascularizado e inflamado, la formación de imágenes de cambios en la circulación en o alrededor de tejido necrótico, la detección de metástasis debido a la expresión heterogénea de moléculas diana y el alivio de la inflamación por angiogénesis después de la revascularización de tejido infartado después de la eliminación de una estenosis.

El ensamblaje de OMMC 10 puede formularse en composiciones de diagnóstico o terapéuticas para su administración enteral, parenteral u oral. Estas composiciones fisiológicamente aceptables contienen una cantidad eficaz de un ensamblaje de OMMC 10, junto con vehículos y/o excipientes fisiológicos convencionales apropiados para el tipo de administración contemplado. Como ejemplo, la administración parenteral puede contener ventajosamente una solución o suspensión acuosa estéril de ensamblajes 10 que tenga una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 10 mM (de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} partículas/ml). Las formulaciones parenterales pueden tener una concentración de ensamblaje 10 de aproximadamente 100 μ M a aproximadamente 2 mM. Dichas soluciones también pueden contener tampones, emulsionantes, tensioactivos y, opcionalmente, electrolitos tales como cloruro sódico farmacéuticamente aceptables. Como otro ejemplo, la administración enteral puede variar ampliamente, como es bien sabido en la técnica. En general, dichas formulaciones son líquidos que incluyen una cantidad eficaz del ensamblaje de OMMC 10 en una solución o suspensión acuosa. La composición enteral puede

incluir opcionalmente tampones, tensioactivos, emulsionantes, agentes tixotrópicos. Las composiciones para administración oral también pueden contener agentes saporíferos y otros ingredientes para mejorar sus cualidades organolépticas.

5 Las composiciones se administran en dosis eficaces para conseguir el objetivo de diagnóstico y/o terapéutico deseado. Dichas dosis pueden variar ampliamente, dependiendo del ensamblaje de OMMC particular 10 empleado, de los órganos o tejidos a examinar, del equipamiento empleado en el procedimiento clínico. El tipo de equipamiento necesario también puede variar ampliamente, dependiendo del tipo de modalidad de formación de imágenes contemplado.

10 Los ejemplos siguientes sirven para ilustrar algunos aspectos de la invención.

Ejemplo 1

15 Preparación de ensamblaje de OMMC que tiene un dominio de unión y una región de unión carboxilato terminal, y que contiene gas (docosanoato ($C_{21}CO_2^-$); octacosanoato ($C_{27}CO_2^-$); y PEG[100]estearato succinilado formulado con n-perfluorobutano).

20 A un vial de 8 dracmas (29,6 ml) se añadió ácido docosanoico (10,0 mg, Sigma, ~99%); ácido octacosanoico (10 mg, Aldrich, ~98%) y 22 mg de PEG[100]estearato succinilado pesados en una balanza de precisión Mettler®. La mezcla se disolvió en aproximadamente 1 ml de diclorometano (destilado Mallinckrodt Ultimar®) usando un calentamiento suave. El diclorometano se eliminó completamente por aplicación de calor con un flujo de nitrógeno (Air Products, calidad de alta pureza). Se puso hidrogenocarbonato sódico en exceso (aproximadamente 100 mg, Aldrich, ~99,7%) en el matraz junto con 10 ml de solución de cloruro sódico al 0,9% usada para irrigación (Baxter, USP).

25 La punta de la sonda de insonación, Heat Systems Sonicator® Ultrasonic Processor XL (Heat Systems, Inc., Farmingdale, NY) Modelo XL 2020, se colocó en una caja acústica, usando un pequeño conector Jack de precisión, a medio camino en el líquido del vial. Se aplicó un nivel de intensidad de 5 durante 2 minutos y 30 segundos. La muestra, a aproximadamente 70°C, se sacó de la caja acústica para enfriar el contenido del vial bajo un flujo de agua corriente hasta una temperatura por debajo de aproximadamente 50°C, según se midió mediante un termómetro FLUKE® 52 K/J equipado con un termopar K. La punta del cuerno de insonación se volvió a colocar justo bajo la superficie del líquido. Se estableció un flujo de gas (de 30 a 50 ml/min) desde una botella de gas comprimido hacia el fondo del vial usando un microtubo (PVDF o equivalente) a un ajuste de potencia de 5 durante 45 segundos, y después se aumentó a un ajuste de potencia de 7 durante 10 segundos. El vial que contenía una suspensión blanca espesa de microenvolturas de gas se tapó y se dejó enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente.

35 Después de la centrifugación a 1.000 x g (2.000 rpm) durante 1 minuto, la fase líquida (parte inferior), que contenía material de matriz en exceso, se sustituyó completamente con una solución de cloruro sódico al 0,9% saturada con decafluorobutano. Un procedimiento de resuspensión seguido de centrifugación se repitió dos veces adicionales. Un cilindro de jeringa de plástico de 30 ml equipado con una válvula de dos vías se llenó con decafluorobutano (97%, Pfalz & Bauer, Inc.). La muestra se suspendió minuciosamente y se vertió en el cilindro de jeringa. Se encajó un tapón en la parte superior del cilindro de jeringa. La muestra se dejó reposar durante diez minutos. Los 5 ml inferiores se drenaron en un vial de jeringa de 10 ml lleno con decafluorobutano y se selló. Se tomó una muestra para análisis Coulter® y se refrigeró tanto como fue posible.

45 Ejemplo 2

Preparación de ensamblaje de OMMC con un dominio de unión y una región de unión galactosamida terminal, y que contiene gas (docosanoato ($C_{21}CO_2^-$); octacosanoato ($C_{27}CO_2^-$); y octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-galactosil amida formulado con n-perfluorobutano).

50 A un vial de 8 dracmas (29,6 ml) se añadió ácido docosanoico (10,0 mg, Sigma, ~99%); ácido octacosanoico (10 mg, Aldrich, ~98%) y 22 mg de octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-galactosil amida (preparado por la reacción de PEG[100]estearato succinilado, DCC y D-galactosamina (Aldrich)) pesados en una balanza de precisión Mettler®. La mezcla se disolvió en aproximadamente 1 ml de diclorometano (destilado Mallinckrodt Ultimar®) usando un calentamiento suave. El diclorometano se eliminó completamente por aplicación de calor con un flujo de nitrógeno (Air Products, calidad de alta pureza). Se puso hidrogenocarbonato sódico en exceso (~100 mg, Aldrich, ~99,7%) en el matraz junto con 10 ml de solución de cloruro sódico al 0,9% usada para irrigación (Baxter, USP).

60 La punta de la sonda de insonación, Heat Systems Sonicator® Ultrasonic Processor XL (Heat Systems, Inc., Farmingdale, NY) Modelo XL 2020, se colocó en una caja acústica, usando un pequeño conector Jack de precisión, a medio camino en el líquido del vial. Se aplicó un nivel de intensidad de 5 durante 2 minutos y 30 segundos. La muestra, a aproximadamente 70°C, se sacó de la caja acústica para enfriar el contenido del vial bajo un flujo de agua corriente hasta una temperatura por debajo de aproximadamente 50°C, según se midió mediante un termómetro FLUKE® 52 K/J equipado con un termopar K. La punta del cuerno de insonación se volvió a colocar justo bajo la superficie del líquido. Se estableció un flujo de gas (de 30 a 50 ml/min) desde una botella de gas comprimido hacia el fondo del vial usando un

microtubo (PVDF o equivalente) a un ajuste de potencia de 5 durante 45 segundos, y después se aumentó a un ajuste de potencia de 7 durante 10 segundos. El vial de suspensión blanca espesa de microenvolturas de gas se tapó y se dejó enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente.

- 5 Después de la centrifugación a 1.000 x g (2.000 rpm) durante 1 minuto, la fase líquida (parte inferior), que contenía material de matriz en exceso, se sustituyó completamente con una solución de cloruro sódico al 0,9% saturada con decafluorobutano. Un procedimiento de resuspensión seguido de centrifugación se repitió dos veces adicionales. Un cilindro de jeringa de plástico de 30 cc equipado con una válvula de dos vías se llenó con decafluorobutano (97%, Pfalz & Bauer, Inc.). La muestra se suspendió minuciosamente y se vertió en el cilindro de jeringa. Se encajó un tapón en la parte superior del cilindro de jeringa. La muestra se dejó reposar durante diez minutos. Los 5 ml inferiores se drenaron en un vial de jeringa de 10 ml lleno con decafluorobutano y se selló. Se tomó una muestra para análisis Coulter® y se refrigeró tanto como fue posible.

Ejemplo 3

- 15 Preparación de ensamblaje de OMMC con dos dominios de unión (carboxilato terminal, galactosamida terminal) y que contiene gas (docosanoato ($C_{21}CO_2^-$); octacosanoato ($C_{27}CO_2^-$); PEG[100]estearato succinilado y octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-galactosil amida formulado con n-perfluorobutano).

- 20 A un vial de 8 dracmas (29,6 ml) se añadió ácido docosanoico (10,0 mg, Sigma, ~99%); ácido octacosanoico (10 mg, Aldrich, ~98%), 11 mg de octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-galactosil amida (preparado por la reacción de PEG[100]estearato succinilado, DCC y D-galactosamina (Aldrich)), y 11 mg de PEG[100]estearato succinilado pesados en una balanza de precisión Mettler®. La mezcla se disolvió en aproximadamente 1 ml de diclorometano (destilado Mallinckrodt Ultimar®) usando un calentamiento suave. El diclorometano se eliminó completamente por aplicación de calor con un flujo de nitrógeno (Air Products, calidad de alta pureza). Se puso hidrogenocarbonato sódico en exceso (~100 mg, Aldrich, ~99,7%) en el matraz junto con 10 ml de solución de cloruro sódico al 0,9% usada para irrigación (Baxter, USP). La punta de la sonda de insonación, Heat Systems Sonicator® Ultrasonic Processor XL (Heat Systems, Inc., Farmingdale, NY) Modelo XL 2020, se colocó en una caja acústica, usando un pequeño conector Jack de precisión, a medio camino en el líquido del vial. Se aplicó un nivel de intensidad de 5 durante 2 minutos y 30 segundos. La muestra, a aproximadamente 70°C, se sacó de la caja acústica para enfriar el contenido del vial bajo un flujo de agua corriente hasta una temperatura por debajo de aproximadamente 50°C, según se midió mediante un termómetro FLUKE® 52 K/J equipado con un termopar K.

- 35 La punta del cuerno de insonación se volvió a colocar justo bajo la superficie del líquido. Se estableció un flujo de gas (de 30 a 50 ml/min) desde una botella de gas comprimido hacia el fondo del vial usando un microtubo (PVDF o equivalente) a un ajuste de potencia de 5 durante 45 segundos, y después se aumentó a un ajuste de potencia de 7 durante 10 segundos. El vial de suspensión blanca espesa de microenvolturas de gas se tapó y se dejó enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente. La fase líquida (parte inferior), que contenía material de matriz en exceso, se sustituyó completamente con una solución de cloruro sódico al 0,9% saturada con decafluorobutano usada para irrigación (Baxter, USP). La punta de la sonda de insonación, Heat Systems Sonicator® Ultrasonic Processor XL (Heat Systems, Inc., Farmingdale, NY) Modelo XL 2020, se colocó en una caja acústica, usando un pequeño conector Jack de precisión, a medio camino en el líquido del vial. Se aplicó un nivel de intensidad de 5 durante 2 minutos y 30 segundos. La muestra, a aproximadamente 70°C, se sacó de la caja acústica para enfriar el contenido del vial bajo un flujo de agua corriente hasta una temperatura por debajo de aproximadamente 50°C, según se midió mediante un termómetro FLUKE® 52 K/J equipado con un termopar K. La punta del cuerno de insonación se volvió a colocar justo bajo la superficie del líquido. Se estableció un flujo de gas (de 30 a 50 ml/min) desde una botella de gas comprimido hacia el fondo del vial usando un microtubo (PVDF o equivalente) a un ajuste de potencia de 5 durante 45 segundos, y después se aumentó a un ajuste de potencia de 7 durante 10 segundos. El vial de suspensión blanca espesa de microenvolturas de gas se tapó y se dejó enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente. La fase líquida (parte inferior), que contenía material de matriz en exceso, se sustituyó completamente con una solución de cloruro sódico al 0,9% saturada con decafluorobutano después de centrifugación a 1.000 x g (2.000 rpm) durante 1 minuto. El procedimiento de resuspensión seguido de centrifugación se repitió dos veces adicionales.

- 55 Un cilindro de jeringa de plástico de 30 ml equipado con una válvula de dos vías se llenó con decafluorobutano (97%, Pfalz & Bauer, Inc.). La muestra se suspendió minuciosamente y se vertió en el cilindro de jeringa. Se encajó un tapón en la parte superior del cilindro de jeringa. La muestra se dejó reposar durante diez minutos. Los 5 ml inferiores se drenaron en un vial de jeringa de 10 ml lleno con decafluorobutano y se selló. Se tomó una muestra para análisis Coulter® y se mantuvo refrigerada tanto como fue posible.

Ejemplo 4

Unión de ensamblajes de OMMC

- 65 Los ensamblajes preparados en los Ejemplos 1, 2 y 3 se incubaron durante un periodo de 30 minutos con agitación en presencia de una monocapa semiconfluente de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC), (ATCC CRL-

1730). Las células se pusieron en pocillos adyacentes en presencia de medios con y sin heparina presente. Los medios se retiraron y las células se lavaron.

Después de la incubación de 30 minutos, las células se examinaron microscópicamente (200X) con contraste de fases para determinar la unión de los ensamblajes. Se observó escasa unión con ensamblajes que contenían solamente un dominio de unión de carboxilato cargado (anión sulfato solo) (no se muestran los datos). Se produjo cierta unión con ensamblajes que contenían microenvolturas terminadas con N-acil-manósido o -galactósido superficial (no se muestran los datos). Como se muestra en la FIG. 4, la unión se aumentó enormemente, y había una cobertura superficial excelente de células activadas, con ensamblajes que contenían la combinación de microenvolturas compuestas de N-acil-manósido o N-acil-galactósido y sulfato.

En todos los casos, la unión se bloqueó sustancialmente por la presencia de oligosacáridos de heparina o ácido hialurónico. Esto se debe probablemente a que los oligosacáridos de heparina o ácido hialurónico libres en solución bloquean la unión de los ensamblajes por competición por sitios de afinidad complementarios en la membrana celular o la matriz extracelular.

Ejemplo 5

Preparación de microenvolturas rellenas de gas compuestas por docosanoato ($C_{21}CO_2^-$); octacosanoato ($C_{27}CO_2^-$); y octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-galactosil amida y PEG[100]estearato sulfatado formulado con n-perfluorobutano.

A un vial de 8 dracmas (29,6 ml) se añadió ácido docosanoico (10,0 mg, Sigma, ~99%); ácido octacosanoico (10 mg, Aldrich, ~98%) y 10 mg de cada uno de octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-galactosil amida (preparado por la reacción de PEG[100]estearato succinilado, DCC y D-galactosamina (Aldrich)) y PEG[100]estearato sulfatado (preparado por la reacción de PEG[100]estearato, DCC y ácido sulfúrico) pesados en una balanza de precisión Mettler®. La mezcla se disolvió en aproximadamente 1 ml de acetona (destilada Mallinckrodt Ultimar®) usando un calentamiento suave. La acetona se eliminó completamente por aplicación de calor con un flujo de nitrógeno (Air Products, calidad de alta pureza). Se puso hidrogenocarbonato sódico en exceso (~100 mg, Aldrich, ~99,7%) en el matraz junto con 10 ml de solución de cloruro sódico al 0,9% usada para irrigación (Baxter, USP). La punta de la sonda de insonación, Heat Systems Sonicator® Ultrasonic Processor XL (Heat Systems, Inc., Farmingdale, NY) Modelo XL 2020, se colocó en una caja acústica, usando un pequeño conector Jack de precisión, a medio camino en el líquido del vial. Se aplicó un nivel de intensidad de 5 durante 2 minutos y 30 segundos. La muestra, a aproximadamente 70°C, se sacó de la caja acústica para enfriar el contenido del vial bajo un flujo de agua corriente hasta una temperatura por debajo de aproximadamente 50°C, según se midió mediante un termómetro FLUKE® 52 K/J equipado con un termopar K. La punta del cuerno de insonación se volvió a colocar justo bajo la superficie del líquido. Se estableció un flujo de gas (de 30 a 50 ml/min) desde una botella de gas comprimido hacia el fondo del vial usando un microtubo (PVDF o equivalente) a un ajuste de potencia de 5 durante 45 segundos, y después se aumentó a un ajuste de potencia de 7 durante 10 segundos. El vial de suspensión blanca espesa de microenvolturas de gas se tapó y se dejó enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente.

Después de la centrifugación a 1.000 x g (2.000 rpm) durante 1 minuto, la fase líquida (parte inferior), que contenía material de matriz en exceso, se sustituyó completamente con una solución de cloruro sódico al 0,9% saturada con decafluorobutano. Un cilindro de jeringa de plástico de 30 cc equipado con una válvula de dos vías se llenó con decafluorobutano (97%, Pfalz & Bauer, Inc.). La muestra se suspendió minuciosamente y se vertió en el cilindro de jeringa. Se encajó un tapón en la parte superior del cilindro de jeringa. La muestra se dejó reposar durante veinte minutos. Los 5 ml inferiores se drenaron en un vial de jeringa de 10 ml lleno con decafluorobutano y se selló. La muestra se mantuvo refrigerada tanto como fue posible.

Ejemplo 6

Preparación de microenvolturas rellenas de gas compuestas por docosanoato ($C_{21}CO_2^-$); octacosanoato ($C_{27}CO_2^-$); y octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-manosil amida formulado con n-perfluorobutano.

A un vial de 8 dracmas (29,6 ml) se añadió ácido docosanoico (10,0 mg, Sigma, ~99%); ácido octacosanoico (10 mg, Aldrich, ~98%) y 20 mg de octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-manosil amida pesados en una balanza de precisión Mettler®. Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. La muestra resultante se mantuvo refrigerada tanto como fue posible.

Ejemplo 7

Preparación de microenvolturas rellenas de gas compuestas por docosanoato ($C_{21}CO_2^-$); octacosanoato ($C_{27}CO_2^-$); y octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-manosil amida y PEG[100]estearato sulfatado formulado con n-perfluorobutano.

5 A un vial de 8 dracmas (29,6 ml) se añadió ácido docosanoico (10,0 mg, Sigma, ~99%); ácido octacosanoico (10 mg, Aldrich, ~98%) y 10 mg de cada uno de octahexadecanoil[poli(etilenglicol) 5.000]succinámico-manosil amida (preparado por la reacción de PEG[100]estearato succinilado, DCC y D-manosamina (Aldrich)), y PEG[100]estearato sulfatado (preparado por la reacción de PEG[100]estearato, DCC y ácido sulfúrico) pesados en una balanza de precisión Mettler®. Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. La muestra resultante se mantuvo refrigerada tanto como fue posible.

Ejemplo 8

10 Preparación de microenvolturas rellenas de gas compuestas por docosanoato ($C_{21}CO_2^-$); octacosanoato ($C_{27}CO_2^-$); y PEG[100]estearato sulfatado formulado con n-perfluorobutano.

15 A un vial de 8 dracmas (29,6 ml) se añadió ácido docosanoico (10,0 mg, Sigma, ~99%); ácido octacosanoico (10 mg, Aldrich, ~98%) y 20 mg de PEG[100]estearato sulfatado pesados en una balanza de precisión Mettler®. Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. La muestra resultante se mantuvo refrigerada tanto como fue posible.

Ejemplo 9

Unión de las microenvolturas rellenas de gas a células endoteliales activadas (HUVEC)

20 Las microenvolturas (burbujas) preparadas en los Ejemplos 5, 6, 7 y 8 se incubaron durante un periodo de 30 minutos con agitación en presencia de una monocapa de células endoteliales humanas (HUVEC, células endoteliales de cordón umbilical humano, ATCC CRL-1730). Las tres muestras generadas como se ha descrito en los Ejemplos 5-8 se incubaron en pocillos adyacentes en presencia de medios con y sin heparina presente.

25 Después de retirar los medios, del lavado y del examen microscópico (400X) con contraste de fases, se observó escasa unión con únicamente microenvolturas cargadas (anión sulfato solo). Se produjo cierta unión con superficie con microenvolturas terminadas con N-acil-manósido o -galactósido. Se observó una cobertura superficial excelente, enormemente aumentada, de burbujas que se unían a células activadas con la combinación de microenvolturas compuestas de N-acil-manósido o -galactósido y sulfatadas. La unión en todos los casos se bloqueaba completamente por la presencia de heparina.

30

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado multifuncional móvil organizado (OMMC) que comprende:

(A) una estructura laminar que define un hueco, siendo la estructura laminar $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_e\text{-X}$, en la que:

(1) e varía de 16 a 32; y

(2) X se selecciona de carboxilato, sulfonato, sulfato, fosfato y fosfonato; y

(B) un primer compuesto de unión y un segundo compuesto de unión, estando cada uno de ellos anclado a la estructura laminar, siendo el primer compuesto de unión capaz de unirse a un primer sitio de afinidad de una diana, y siendo el segundo compuesto de unión capaz de unirse a un segundo sitio de afinidad de una diana, en el que el primer y segundo compuestos de unión son móviles y se autoajustan el uno respecto al otro para formar un conjunto de OMMC en el que los compuestos de unión son capaces de unirse cooperativamente a la diana, en el que cada compuesto de unión comprende independientemente:

(1) una región de anclaje incorporada en el OMMC, seleccionándose la región de anclaje de $\text{CH}_3\text{(CH}_2\text{)}_a\text{-W}$, $\text{CH}_3\text{(CH}_2\text{)}_a\text{-O-(CH}_2\text{)}_b\text{-W}$, $\text{CH}_3\text{(CH}_2\text{)}_a\text{-S-(CH}_2\text{)}_b\text{-W}$, $\text{CF}_3\text{(CH}_2\text{)}_a\text{-W}$, $\text{CF}_3\text{(CF}_2\text{)}_a\text{-W}$, $\text{CF}_3\text{(CF}_2\text{)}_a\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-W}$, $\text{CF}_3\text{(CF}_2\text{)}_a\text{-O-(CH}_2\text{)}_b\text{-W}$ y $\text{CH}_3\text{(CH}_2\text{)}_a\text{-S-S-(CH}_2\text{)}_b\text{-W}$, en la que:

(a) a y b varían de 16 a 32;

(b) W se selecciona de $-\text{O}-$, $-\text{CO}-$, $-\text{CO}_2-$, $-\text{OCO}-$, $\text{O}_2\text{CO}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NH}-$, $\text{NHCO}-$, $-\text{NHCS}-$, $-\text{NHSO}_2-$, $-\text{PO}_2\text{H}-$, $-\text{OPO}_2\text{H}-$, $-\text{PO}_2-$, y $-\text{OPO}_2-$; y

(2) una región de unión seleccionada de aminoácidos, péptidos, peptidomiméticos, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, ácido siálico, ácido carmínico y compuestos aniónicos de $-(\text{CH}_2)_d\text{-CO}_2^-$, $-(\text{CH}_2)_d\text{-SO}_3^-$, $-(\text{CH}_2)_d\text{-OSO}_3^-$, $-(\text{CH}_2)_d\text{-PO}_3^{=}$, $-(\text{CH}_2)_d\text{-OPO}_3^{=}$, $-\text{Ar-SO}_3^-$, DTPA, EDTA, DOTA y EGTA, en los que d varía de 1 a 10; y

(3) un enlazador que conecta la región de unión a la región de anclaje, seleccionándose el enlazador de polisorbatos, poliglicérols, polipéptidos, polinucleótidos, polisacáridos, polivinilpirrolidonas, alcoholes polivinílicos, polietilenglicoles, poliglicolato, polilactato y copolímeros derivados de cualquiera de los grupos anteriores.

2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el primer compuesto de unión o el segundo compuesto de unión tiene un valor de constante de disociación (K_d) de aproximadamente 100 nM o superior.

3. El conjugado de la reivindicación 1, en el que cada uno del primer y segundo compuestos de unión tiene un valor de constante de disociación (K_d) de aproximadamente 100 nM o superior.

4. El conjugado de la reivindicación 1, que comprende además:

una molécula efectora; (a) unida a la estructura laminar; o (b) contenida dentro del hueco definido en la estructura laminar.

5. El conjugado de la reivindicación 4, en el que la molécula efectora se selecciona de un agente citotóxico, un agente paramagnético, un cromóforo o fluoróforo capaz de emitir luz en el intervalo de 300-1200 nM, un antibiótico sulfa, un agente radiofarmacéutico, una molécula radiactiva capaz de emitir radiación alfa, beta o gamma, un radionúclido, un agente quimioterápico, ácido hialurónico, heparina, un agente de opacificación de rayos X y un agente ecogénico.

6. El conjugado de la reivindicación 4, en el que la molécula efectora es un agente citotóxico seleccionado de fluorouracilo y fluorouridina.

7. El conjugado de la reivindicación 4, en el que la molécula efectora es un agente paramagnético seleccionado de Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-DTPA-*bis*(metoxietil)amida y Mn-EDTA.

8. El conjugado de la reivindicación 4, en el que la molécula efectora es un agente radiofarmacéutico que comprende un quelato de un isótopo emisor de beta o un quelato de un isótopo emisor de gamma.

9. El conjugado de la reivindicación 8, en el que la molécula efectora es un agente radiofarmacéutico que comprende Lu, Sm, In, Ru o Tc.

10. El conjugado de la reivindicación 4, en el que la molécula efectora es un agente radiofarmacéutico seleccionado de ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA) o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA).

11. El conjugado de cualquier reivindicación anterior, en el que la estructura laminar es una micela, un liposoma, una micropartícula o una nanopartícula.

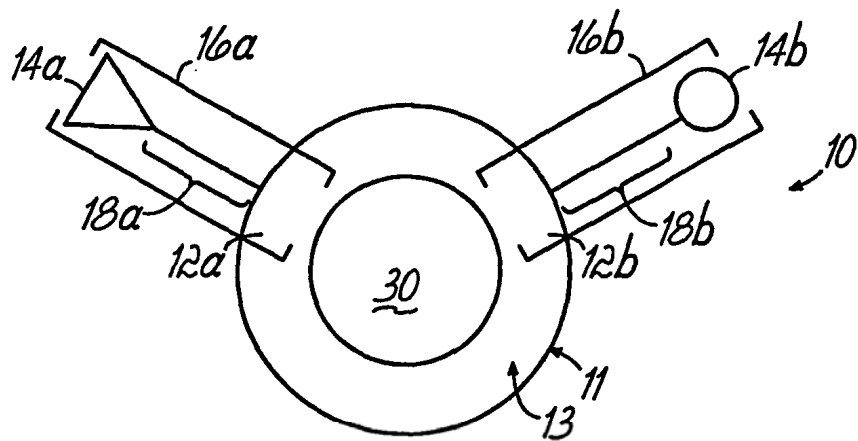


FIG. 1

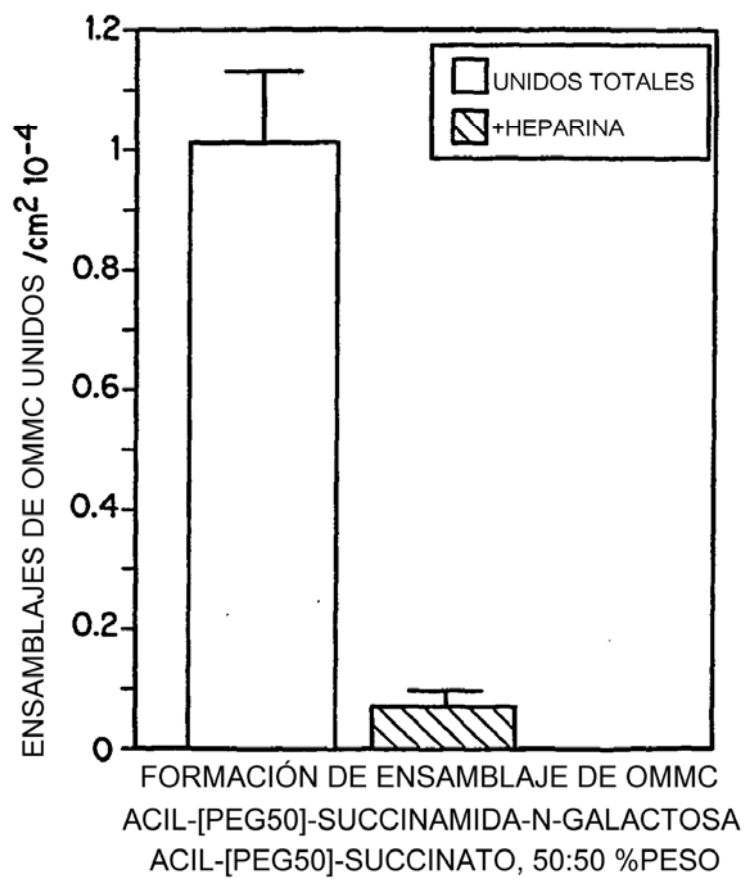


FIG. 4

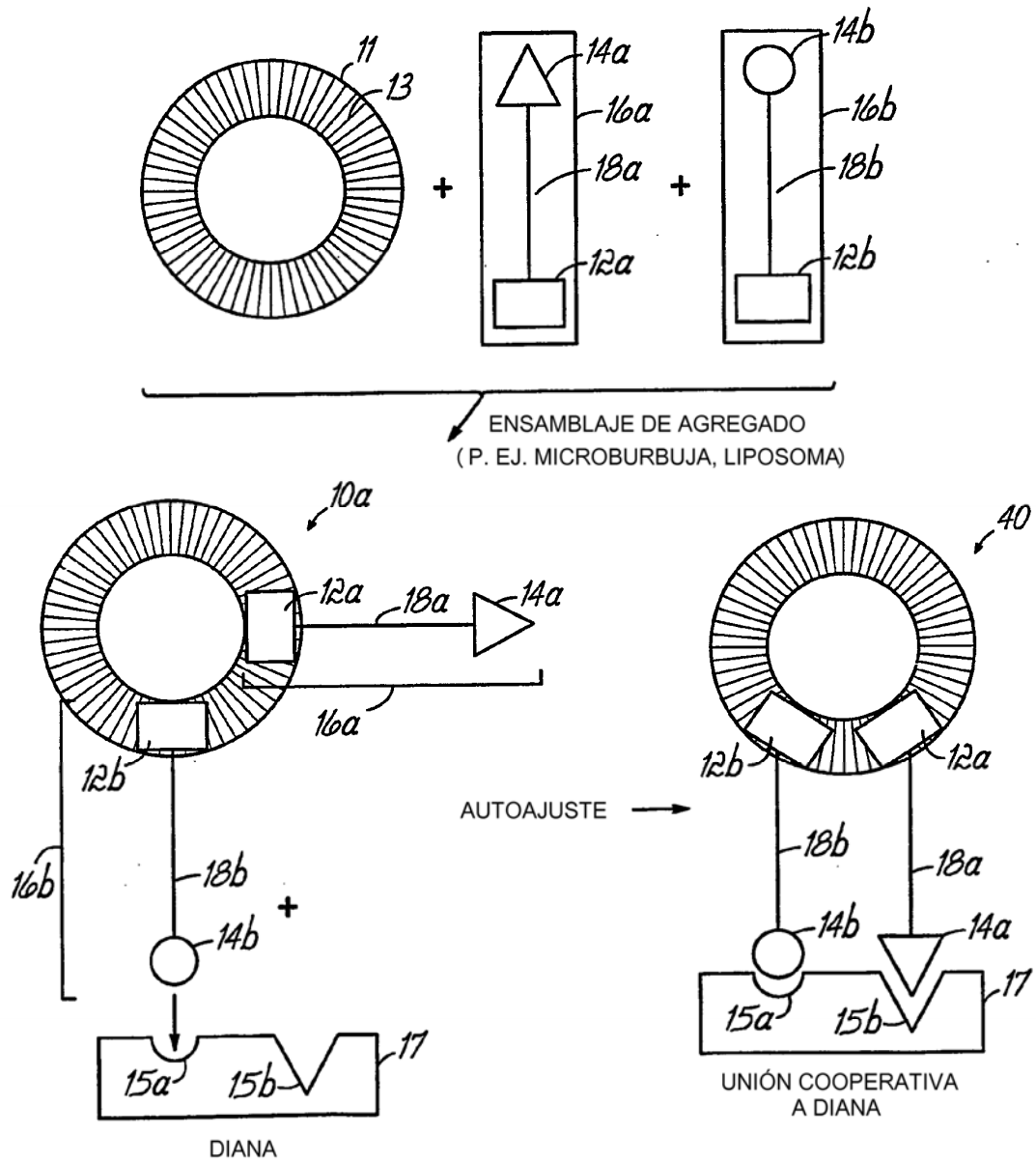


FIG. 2

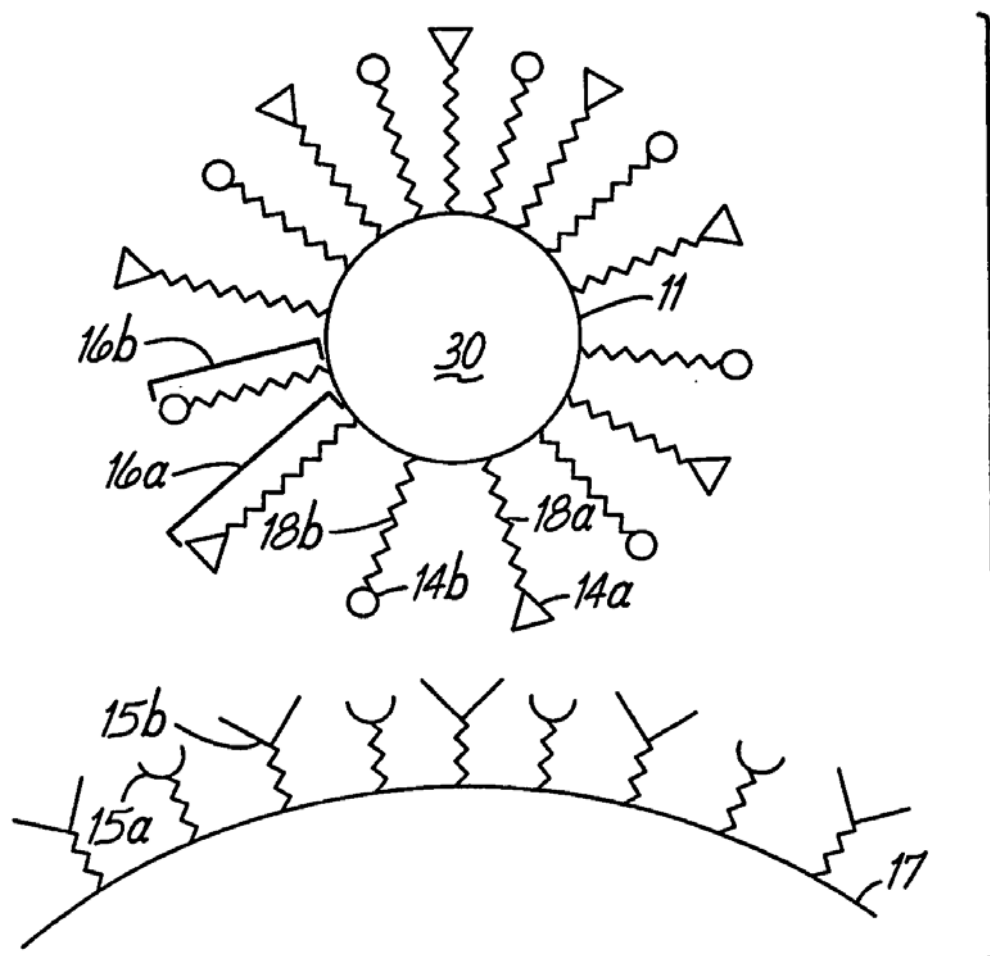


FIG. 3