

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 732**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61K 49/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2004 E 04806409 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 1701745**

54 Título: **Montaje de microvesícula rellena de gas para imagenología de contraste**

30 Prioridad:

22.12.2003 EP 03029534

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.03.2015

73 Titular/es:

**BRACCO SUISSE SA (100.0%)
Centro Galleria, Via Cantonale 2
6928 Manno , CH**

72 Inventor/es:

**SCHNEIDER, MICHEL;
BUSSAT, PHILIPPE;
YAN, FENG y
SENETE, ANNE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 531 732 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

Montaje de microvesícula rellena de gas para imagenología de contraste

5 La presente invención se refiere a un montaje que comprende como un primer componente una microvesícula rellena de gas y como un segundo componente una entidad estructural que es capaz de asociarse a la superficie externa de la microvesícula, modificando de esta manera las propiedades fisicoquímicas de la misma. Opcionalmente, dicho segundo componente puede comprender un ligando de direccionamiento, un agente bioactivo, un agente diagnóstico o cualquier combinación de los mismos. La invención se refiere además a formulaciones que
10 comprende dicho montaje, al uso de dichas formulaciones, a un método para preparar dicho montaje y formulaciones y a un kit diagnóstico que comprende dicho montaje. El montaje de la invención se puede usar como un componente activo en formulaciones diagnóstica y/o terapéuticamente activas, en particular para aumentar la imagenología en el campo de ecografía de contraste, incluyendo ecografía dirigida y/o administración de fármacos mediada por ultrasonidos y otras técnicas de imagenología tal como imagenología de resonancia molecular (IRM) o
15 imagenología nuclear.

Antecedentes de la invención

20 El rápido desarrollo de agentes de contraste de ultrasonidos en los últimos años ha generado un número de diferentes formulaciones, que son útiles en ecografía de órganos y tejidos del cuerpo humano o animal. Estos agentes se diseñan para ser usados principalmente como inyectables intravenosos o intrarteriales junto con el uso de equipo ecográfico médico que emplea por ejemplo, formación de imágenes en modo B (basado en la distribución espacial de propiedades tisulares de retrodispersión) o procesamiento de señal Doppler (basado en el procesamiento de onda continua o Doppler pulsada de ecos ultrasónicos para determinar los parámetros de flujo de
25 sangre o líquidos).

Una clase de formulaciones inyectables útiles como agente de contraste para ecografía incluye suspensiones de burbujas de gas que tienen un diámetro de pocos micrómetros dispersadas en un medio acuoso.

30 El uso de suspensiones de burbujas de gas en líquido soporte, como reflectores eficaces de ultrasonido se conoce bien en la técnica. El desarrollo de suspensiones de microburbujas como agentes de contraste para el aumento de ecografía siguió a las primeras observaciones de que inyecciones intravenosas rápidas de soluciones acuosas pueden producir que los gases disueltos salgan de la solución formando burbujas. Debido a su diferencia sustancial en la impedancia acústica relativa a la sangre, se encontró que estas burbujas de gas intravasculares eran
35 excelentes reflectores de ultrasonido. La inyección de suspensiones de burbujas de gas en un líquido soporte en el torrente sanguíneo de un organismo vivo refuerza firmemente la ecografía ultrasónica, aumentando de esta manera la visualización de órganos internos. Puesto que la imagenología de órganos y tejidos asentados en profundidad puede ser crucial en establecer un diagnóstico médico, se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de suspensiones estables de burbujas de gas muy concentradas que al mismo tiempo fueran sencillas de preparar y
40 administrar, contuvieran un mínimo de especies inactivas y fueran capaces de almacenamiento largo y administración sencilla.

La simple dispersión de burbujas de gas libres en el medio acuoso es, sin embargo, de interés práctico limitado, ya que estas burbujas en general no son lo suficientemente estables para ser útiles como agentes de contraste de
45 ecografía.

Se ha mostrado interés, en consecuencia, en métodos de estabilizar burbujas de gas para ecografía y otros estudios ultrasónicos, por ejemplo, usando emulsionantes, aceites, espesantes o azúcares, o atrapando o encapsulando el gas o un precursor del mismo en una variedad de sistemas. Estas burbujas de gas estabilizadas generalmente se
50 denominan en la técnica como "microvesículas", y se pueden dividir en dos categorías principales.

Una primera categoría de burbujas estabilizadas o microvesículas generalmente se denomina en la técnica como "microburbujas" e incluye suspensiones acuosas en las que las burbujas de gas se unen en la interfase gas/líquido por una envoltura muy fina (película) que implica un material anfifílico estabilizante dispuesto en la interfase de gas a
55 líquido. Las suspensiones de microburbujas típicamente se preparan poniendo en contacto materiales anfifílicos en polvo, por ejemplo, liposomas preformados liofilizados o soluciones de fosfolípidos liofilizadas o secadas por rociado, con aire u otro gas y después con un soporte acuoso, mientras se agita para generar una suspensión de microburbujas que después se puede administrar, preferiblemente poco después de su preparación.

60 Se divulgan ejemplos de una suspensión acuosa de microburbujas de gas y la preparación de la misma, por ejemplo, en los documento US 5.271.928, US 5.445.813, US 5.413.774, US 5.556.610, 5.597.549, US 5.827.504 y WO 04/069284.

Una segunda categoría de microvesículas generalmente se denomina en la técnica como "microglobos" o
65 "microcápsulas" e incluye suspensiones en las que las burbujas de gas están rodeadas por una envoltura de

material sólido de un lípido o de polímeros naturales o sintéticos. Se divulgan ejemplos de microglobos y de la preparación de los mismos, por ejemplo, en los documentos US 5.711.933 y US 6.333.021.

5 También se conocen microvesículas que tienen una carga neta global (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 97/29783; la envoltura externa de estas microvesículas contiene compuestos iónicos que son capaces de conferir la carga global deseada a la microvesícula final.

10 Además de estas formulaciones de microvesículas rellenas de gas, más recientemente se ha mostrado interés también hacia formulaciones modificadas de microvesículas rellenas de gas, bien para mejorar el efecto diagnóstico y/o para fines terapéuticos.

15 Por ejemplo, las microvesículas se pueden asociar (por ejemplo, por inclusión en su envoltura limitante) con componentes específicos (conocidos como "ligandos de direccionamiento") que son capaces de unirse a una diana determinada en el cuerpo de un paciente, por ejemplo, a un sitio patogénico específico. Estas formulaciones generalmente se conocen en la técnica como "microvesículas dirigidas". Se divulgan ejemplos de microvesículas dirigidas, de ligandos de direccionamiento y de la preparación de las mismas, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 98/18051.

20 Otro ejemplo de formulaciones modificadas son esas donde un agente terapéutico se asocia con la microvesícula. Cuando la formulación que comprende la microvesícula alcanza el sitio patogénico, el fármaco se puede liberar ventajosamente, por ejemplo, aplicando una energía acústica controlada capaz de romper la vesícula, liberando localmente de esta manera el agente terapéutico. Esta técnica generalmente se conoce en el campo como "liberación de fármaco mediada por ultrasonido". Se divulgan ejemplos de formulaciones de microvesículas que comprenden un agente terapéutico, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 94/28873.

25 Desarrollos adicionales en el campo han causado la preparación de montajes en donde la microvesícula se asocia con un segundo componente, que lleva un agente terapéutico o compuesto de direccionamiento deseado.

30 Por ejemplo, el documento WO 99/39738, divulga un montaje que comprende una microvesícula rellena de gas y un liposoma relleno de líquido asociado con la misma, donde el liposoma comprende una sustancia terapéuticamente activa en el mismo. El liposoma se asocia a la microvesícula por simple mezcla con microvesículas o a través de un enlace entre un par conjugado, cada uno de la microvesícula y liposoma está provisto con un componente que lleva uno de las dos de las respectivas fracciones complementarias de dicho par (por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina).

35 El documento WO 03/015831 divulga una formulación que comprende microvesículas rellenas de gas ("microesferas" en la solicitud) asociadas a liposomas, denominadas como compuestos microesfera-liposoma. Los liposomas del compuesto pueden incluir un fármaco y/o una fracción de direccionamiento. Las microvesículas y liposomas que forman el compuesto están hechos de un mismo material de partida; el compuesto se obtiene preparando una solución acuosa que comprende una mezcla de lípidos, introduciendo dicha solución en un vial sellado que comprende el gas deseado y por último agitando la solución. El compuesto así obtenido es por tanto un mezcla sencilla de microvesículas y liposomas de la misma naturaleza química. En particular, no se divulga interacción química o física específica entre microvesículas y liposomas en dicho documento.

45 Además, la solicitud de patente internacional WO 99/53963 divulga una preparación combinada que comprende una primera composición que comprende microvesículas rellenas de gas dispersadas en un medio acuoso y estabilizada por un material y una segunda composición que es una emulsión de aceite en agua que comprende un material que estabiliza la emulsión. Los materiales de superficie que estabilizan las microvesículas y la fase oleaginosa dispersada tienen afinidad entre sí. En una forma de realización, dicha afinidad se obtiene usando materiales de superficie con cargas opuestas, de modo que interaccionan y se unen electrostáticamente entre sí. Alternativamente, la asociación de los respectivos materiales de superficie puede comprender compuestos capaces de interaccionar a través de unión química o biológica. El aceite de la emulsión es una sustancia que es capaz de generar una presión de gas o vapor *in vivo* y se denomina como el "componente difusible". La asociación de gotitas de dicha sustancia emulsionada con la microvesícula es capaz de determinar un crecimiento controlable de la fase gas dispersada en la
50 microvesícula, mediante difusión hacia dentro hacia ella de moléculas de gas o vapor de dicha sustancia.
55

Compendio de la invención

60 El solicitante ha encontrado ahora un montaje novedoso, para uso en formulaciones farmacéuticamente activas, que comprende una microvesícula rellena de gas que se asocia a un segundo componente a través de una interacción sustancialmente electrostática, dicho segundo componente opcionalmente comprende un ligando de direccionamiento, un agente bioactivo, un agente diagnóstico o cualquier combinación de los mismos.

65 Un aspecto de la presente invención se refiere a un montaje que comprende una microvesícula rellena de gas que tiene una primera carga neta global y un componente asociado a dicha microvesícula en donde dicho componente

tiene una segunda carga neta global opuesta en signo a dicha primera carga neta, dicho componente asociado comprende un agente tensioactivo biocompatible y tiene un diámetro de 100 nm o menos.

5 Según una forma de realización preferida, dicho componente asociado comprende un ligando de direccionamiento, un agente bioactivo, un agente diagnóstico o cualquier combinación de los mismos.

Preferiblemente, dicho agente tensioactivo es un agente emulsionante, un agente dispersante o cualquier combinación de los mismos, siendo particularmente preferido un material anfifílico.

10 En lo sucesivo de esta especificación, el segundo componente del montaje se denominará como componente asociado a microvesícula ("CAM").

Según una forma de realización de la invención dicho agente de contraste de ultrasonido está en la forma de una suspensión de una pluralidad de dichos montajes dispersados en un soporte acuoso farmacéuticamente aceptable.

15 Según una forma de realización alternativa de la invención dicho agente de contraste de ultrasonido está en la forma de una composición liofilizada.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar un montaje como se ha descrito anteriormente, que comprende mezclar una preparación que comprende microvesículas rellenas de gas o un precursor de las mismas con una preparación que comprende dicho segundo componente o un precursor del mismo.

25 Para los fines de la presente solicitud el término "precursor de microvesículas rellenas de un gas" incluye en su significado cualquier sustancia intermedia, composición, formulación o estructura que sea capaz de formar una suspensión de microvesículas rellenas de gas incluyendo, por ejemplo, formulaciones liofilizadas que se pueden reconstituir con un soporte acuoso para formar dicha suspensión de microvesículas, o microemulsiones que pueden experimentar un proceso de liofilización para obtener un producto liofilizado que después se puede reconstituir con un soporte acuoso para formar dicha suspensión.

30 Similarmente, el término "precursor del segundo componente", incluye cualquier sustancia intermedia, composición, formulación o estructura que sea capaz de formar dicho segundo componente, incluyendo, por ejemplo, composiciones liofilizadas reconstituibles en una suspensión acuosa que comprende dicho CAM.

35 Según una forma de realización de la presente invención, el montaje de la invención se puede obtener:

- 1) preparando una primera suspensión acuosa que comprende una microvesícula rellena de gas;
- 2) preparando una segunda suspensión acuosa que comprende un componente que se va a asociar con dicha microvesícula rellena de gas;
- 3) mezclando dichas dos suspensiones, para obtener una suspensión acuosa que comprende dicho montaje.

40 Opcionalmente se puede incluir un paso de lavado, después de la preparación de la primera y/o la segunda suspensión. También se puede realizar un paso de lavado opcional de la suspensión final. El término "paso de lavado" incluye en su significado cualquier método o proceso dirigido a separar y/o al menos eliminar parcialmente el exceso de materiales no asociados, componentes, partículas y similares de una suspensión de un compuesto deseado (por ejemplo, microvesículas, CAM o montaje). Los métodos de separación adecuados incluyen, por ejemplo, decantación, centrifugación, ultracentrifugación o microfiltración.

45 Según una forma de realización alternativa, el montaje de la invención se puede obtener:

- 50 1) preparando una primera suspensión acuosa que comprende una microvesícula rellena de gas;
- 2) liofilizando dicha suspensión, para obtener un primer producto liofilizado;
- 3) preparando una segunda suspensión acuosa que comprende un componente que se va a asociar con dicha microvesícula rellena de gas;
- 4) liofilizando dicha suspensión para obtener un segundo producto liofilizado;
- 55 5) reconstituyendo dicho primer y dicho segundo producto liofilizado con un soporte acuoso fisiológicamente aceptables en presencia de un gas, para obtener una suspensión acuosa que comprende el montaje.

60 Opcionalmente se puede incluir un paso de lavado, después de la preparación de la primera y/o la segunda suspensión. También se puede realizar un paso de lavado opcional de la suspensión final.

Según una forma de realización preferida, el último paso 5) del proceso de preparación comprende los pasos de a) reconstituir el segundo producto liofilizado con un soporte acuoso fisiológicamente aceptable para obtener una suspensión que comprende el componente que se va a asociar con la microvesícula rellena de gas y b) reconstituir el primer producto liofilizado con dicha suspensión en presencia de un gas.

65 Según una forma de realización preferida adicional, dicho montaje se obtiene como composición liofilizada:

- 1) preparando una emulsión acuosa que comprende un solvente orgánico inmiscible con agua, un fosfolípido y un agente lioprotector;
- 2) preparando una suspensión acuosa que comprende un componente que se va a asociar con una microvesícula rellena de gas;
- 3) mezclando dicha suspensión acuosa y dicha emulsión acuosa; y
- 4) liofilizando la mezcla para eliminar el agua y el solvente orgánico, para obtener un producto liofilizado que comprende dicho montaje.

El producto liofilizado obtenido se puede reconstituir en una suspensión acuosa que comprende un montaje de la invención agitando dicho producto liofilizado en presencia de un gas y un soporte acuoso.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para ecografía diagnóstica que comprende administrar una cantidad que aumenta el contraste de una suspensión acuosa de un montaje como se ha definido anteriormente, que opcionalmente comprende un ligando de direccionamiento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método terapéutico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una suspensión acuosa de un montaje como se ha definido anteriormente que comprende un agente bioactivo.

Un aspecto aún adicional de la invención se refiere a un kit farmacéutico que contiene los componentes de dicho montaje en cualquiera de las siguientes formas: a) como dos suspensiones separadas de microvesículas y CAM; b) como preparaciones liofilizadas separadas de los dos componentes, opcionalmente junto con un soporte acuoso para la reconstitución; o c) como una preparación liofilizada del montaje, junto con un soporte acuoso para la reconstitución.

Una ventaja de un montaje según la invención es que la interacción electrostática entre la microvesícula y el CAM se puede obtener usando componentes convencionales típicamente empleados para formar la envoltura de las microvesículas, sin la necesidad de introducir componentes o fracciones adicionales en dicha envoltura, que de otra manera pueden alterar la estabilidad las microvesículas.

El montaje obtenido puede modificar o modular ventajosamente el comportamiento de las microvesículas rellenas de gas una vez administradas en el cuerpo de un paciente (tal como, por ejemplo, la velocidad de depuración de la circulación del torrente sanguíneo). Por ejemplo, los montajes que comprenden microvesículas cargadas positivamente y CAM cargados negativamente se pueden usar para administrar una preparación de microvesículas cargadas positivamente que sin embargo mostrará un comportamiento similar a microvesículas cargadas negativamente una vez dentro del cuerpo. Alternativamente, los montajes que comprenden microvesículas cargadas negativamente y CAM cargados positivamente se pueden usar para administrar una preparación de microvesículas cargadas negativamente que sin embargo mostrará un comportamiento similar a microvesículas cargadas positivamente una vez dentro del cuerpo. Además es posible asociar un compuesto de direccionamiento o un agente farmacéuticamente activo deseado a la microvesícula sin alterar su estabilidad (en particular la estabilidad de la capa limitante que rodea el gas), ya que dicho compuesto de direccionamiento o agente farmacéuticamente activo están de hecho asociados al segundo componente del montaje, cuya estabilidad no está sustancialmente afectada por la presencia de dicho compuesto o agente.

Una ventaja adicional de la presente invención es la extrema flexibilidad en la preparación de diferentes montajes para diferentes fines. En realidad, una única preparación básica de microvesículas cargadas se puede asociar con diferentes preparaciones de CAM de carga opuesta, si es necesario más de una al mismo tiempo, dependiendo de las necesidades diagnósticas/terapéuticas específicas. Por ejemplo, es posible asociar a la preparación de microvesículas una primera preparación de CAM que tiene un ligando de direccionamiento (por ejemplo, para la unión del montaje a un sitio patogénico específico) y una segunda preparación de CAM que incluye un agente bioactivo (que se puede liberar en el sitio patogénico específico una vez que el montaje se ha unido al mismo) y/o un agente diagnóstico (que aumentará la imagenología del sitio diana).

Además, el solicitante ha observado que un montaje de la invención puede mostrar una resistencia a la presión aumentada con respecto a la microvesícula sola.

Figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra la composición de diferentes montajes formados por microvesículas y CAM que comprenden los mismos materiales pero en diferentes cantidades.

Las figuras 2 y 3 muestran el comportamiento *in vivo* de microvesículas cargadas y de los correspondientes montajes con CAM de carga opuesta con respecto a la microvesícula.

Descripción detallada de la invención

Un montaje según la invención típicamente comprende un primer componente (también identificado como el componente “soporte”) en forma de una microvesícula rellena de gas que tiene una carga neta global y un segundo componente asociado con dicho componente soporte (CAM) que tiene un diámetro de menos de 10 nm, que tiene una carga neta global de signo opuesto con respecto al primer componente y que comprende al menos un agente tensioactivo, en particular un agente emulsionante y/o un agente dispersante, más preferiblemente un compuesto anfifílico.

Preferiblemente, el CAM contiene un ligando de direccionamiento deseado, un agente bioactivo, un agente diagnóstico o cualquier combinación de los mismos.

El componente asociado a la microvesícula (CAM) está preferiblemente en la forma de una estructura supramolecular estable formada por la asociación de una pluralidad de moléculas de uno o más agentes tensioactivos. Preferiblemente, dicha estructura supramolecular comprende al menos un agente tensioactivo que tiene una carga neta, más preferiblemente un agente tensioactivo iónico. Dicha estructura supramolecular estable puede estar determinada, por ejemplo, por una interacción hidrofóbica entre las partes hidrofóbicas de dichas moléculas. Según una forma de realización particularmente preferida, el CAM está en la forma de una micela. Alternativamente, dicho CAM puede estar formado por una única molécula de un tensioactivo iónico polimérico, opcionalmente funcionalizado para incluir una fracción de direccionamiento, bioactiva y/o diagnóstica adecuada.

El montaje de la invención es útil para preparar una formulación farmacéuticamente activa para uso en métodos diagnósticos y/o terapéuticos.

El término “formulación farmacéuticamente activa” incluye en su significado cualquier formulación, o precursor de la misma, incluyendo formulaciones diagnósticamente, bioactivas y/o terapéuticamente activas, capaces de ejercer un efecto farmacéutico (por ejemplo, efecto diagnóstico, bioactivo y/o terapéutico) cuando se administran en una cantidad eficaz a un paciente en necesidad de ello. Similarmente, el término “farmacéuticamente activo” cuando se refiere a un compuesto, un agente o kit incluye en su significado compuestos, agentes o kits diagnósticos, bioactivos y/o terapéuticos.

El término “ligando de direccionamiento” incluye en su significado cualquier compuesto, fracción o residuo que tiene, o que es capaz de fomentar, una actividad de direccionamiento del montaje de la invención hacia cualquier sitio biológico o patológico en un organismo vivo. Las dianas a las que el ligando de direccionamiento se puede asociar incluyen tejidos tal como, por ejemplo, tejido miocárdico (incluyendo células miocárdicas y cardiomiocitos), tejidos membranosos (incluyendo endotelio y epitelio), láminas, tejido conjuntivo (incluyendo tejido intersticial) o tumores; coágulos de sangre; y receptores tales como, por ejemplo, receptores de superficie celular para hormonas peptídicas, neurotransmisores, antígenos, fragmentos del complemento, e inmunoglobulinas y receptores citoplásmicos para hormonas esteroideas.

El término “agente bioactivo” incluye en su significado cualquier sustancia, composición o partícula que se puede 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 responsable de ejercer un efecto biológico in vitro y/o in vivo. Los ejemplos de agentes bioactivos son fármacos, productos farmacéuticos, proteínas, péptidos naturales o sintéticos, incluyendo oligopéptidos y polipéptidos, vitaminas, esteroides y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos. Un método o tratamiento terapéutico de un paciente típicamente incluye el uso de un agente bioactivo.

El término “agente diagnóstico” incluye en su significado cualquier compuesto, composición o partícula que se puede usar en relación con métodos diagnósticos, incluyendo imagenología de una región interna de un paciente y/o diagnosticar la presencia o ausencia de una enfermedad en un paciente. Los agentes diagnósticos ejemplares incluyen, por ejemplo, agentes de contraste para uso en relación con resonancia magnética nuclear, rayos X, en particular, tomografía computarizada, imagenología óptica, imagenología nuclear o imagenología molecular de un paciente incluyendo, por ejemplo, nanopartículas de magnetita.

“Biocompatible” o “fisiológicamente aceptable” se refiere a cualquier compuesto, material o formulación que se puede administrar, en una cantidad seleccionada, a un paciente sin afectar negativamente o modificar sustancialmente el funcionamiento sano o normal del organismo (por ejemplo, sin determinar ningún estado de toxicidad inaceptable, causar cualquier respuesta extrema o incontrolable o determinar ninguna afección patológica anormal o estado de enfermedad).

El término “agente tensioactivo” se refiere a cualquier compuesto que sea capaz de estabilizar mezclas de materiales de otra manera generalmente inmiscibles, tal como mezclas de dos líquidos inmiscibles (por ejemplo, agua y aceite), mezclas de líquidos con gases (por ejemplo, microburbujas de gas en agua) o mezclas de líquidos con partículas insolubles (por ejemplo nanopartículas metálicas en agua). Estos compuestos también se denominan generalmente en la técnica como “agentes emulsionantes” o “agentes dispersantes”. Preferiblemente dicho compuesto es un “compuesto anfifílico”, es decir, un compuesto que tiene una molécula con una cabeza polar

hidrofílica (por ejemplo, un grupo polar o iónico) y una cola orgánica hidrofóbica (por ejemplo, una cadena hidrocarbonada). Los ejemplos del agente tensioactivo, en particular de agentes emulsionantes y/o dispersantes, son: ácidos orgánicos de (C_2 - C_{10}), ácidos grasos orgánicos que comprenden una cadena alifática de (C_{12} - C_{24}), preferiblemente de (C_{14} - C_{22}), las sales farmacéuticamente aceptables (alcalinas) de los mismos y los ésteres respectivos con polioxietileno, tal como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido oleico, dodecanoato de sodio, oxalato de sodio o tartrato de sodio o estearato de ácido graso y polioxietileno; sales poliónicas (alcalinas), tal como citrato de sodio, poliácido de sodio, fosfato de sodio; aminas orgánicas, amidas, sales (haluros) de amina cuaternaria, preferiblemente que contienen una cadena hidrocarbonada de (C_8 - C_{22}), incluyendo derivados polioxetilados de los mismos, tal como etanolamina, trietanolamina, alquilaminas, alcanolamidas, cloruro de trimetilalquilamina, alquilaminas polioxetiladas, alcanolamidas polioxetiladas; aminoácidos; fosfolípidos, tal como diésteres de ácido graso de fosfatidilcolina, etilfosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o de esfingomielina; ésteres de mono u oligosacáridos con ácidos grasos orgánicos de (C_{12} - C_{24}), preferiblemente (C_{14} - C_{22}), tal como laurato de sorbitano; tensioactivos poliméricos, es decir, copolímeros en bloque que incluyen partes hidrofóbicas e hidrofílicas, tal como copolímeros en bloque de óxido de etileno/óxido de propileno; sulfonatos orgánicos tal como alquil(C_{12} - C_{24}), preferiblemente alquil(C_{14} - C_{22}) sulfonato de álcali (por ejemplo, sodio); ácidos perfluoroorgánicos, tal como ácido perfluorooctanoico; y mezclas de los mismos. Debido a sus dimensiones nanométricas, el CAM también se denominará como el nanocomponente del montaje, en oposición a las microvesículas que tienen dimensiones micrométricas. Las microvesículas típicamente tienen dimensiones de al menos 0,5 μm , preferiblemente de 0,8 μm y hasta por ejemplo 20 μm , más preferiblemente desde aproximadamente 1 a 8 μm ; el respectivo diámetro medio en número de las microvesículas (D_N), medido por ejemplo, por medio de un contador Coulter, es preferiblemente de al menos 0,8 μm , más preferiblemente de al menos 1 μm (hasta aproximadamente, por ejemplo 8 μm) y mucho más preferiblemente desde aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 5 μm .

En general, dependiendo del respectivo método de preparación, las microvesículas y los CAM se obtienen como una población de partículas que tienen una distribución más o menos estrecha de dimensiones. Por tanto, para comparar diferentes poblaciones de microvesículas o CAM, generalmente se usan valores medios de dicha distribución. Como saben los expertos en la materia, las dimensiones de micro/nano partículas y su respectiva distribución de tamaño se pueden caracterizar por un número de parámetros, siendo los más frecuentemente usados el diámetro medio en número D_N , el diámetro mediana en número D_{N50} , el diámetro medio en volumen D_V y el diámetro mediana en volumen D_{V50} . Mientras que los diámetros en número proporcionan una indicación de la dimensión en número medio de las partículas, el diámetro en volumen proporciona información sobre cómo el volumen total de las partículas se distribuye entre la población entera. Como la presencia de muy pocas partículas de gran volumen en una población de partículas de otra manera de pequeño volumen puede producir que el correspondiente valor de D_V se desplace hacia valores altos, algunas veces es más conveniente usar el valor de D_{V50} para evaluar la distribución de una población de partículas. D_{V50} es un valor calculado que indica que la mitad del total del volumen interno de las partículas está presente en partículas que tienen un diámetro menor que D_{V50} ; esto permite reducir los efectos de partículas de gran volumen accidentalmente formadas en la evaluación de la distribución de tamaños. Claramente, las partículas de un solo tamaño muestran valores de D_N , D_{N50} , D_V y D_{V50} idénticos. Por otra parte, un ensanchamiento creciente de la distribución de las partículas producirá una mayor diferencia entre estos varios valores con una variación correspondiente de la proporción respectiva de los mismos (por ejemplo, aumento de la proporción D_V/D_N). Por ejemplo, las poblaciones de partículas que contienen principalmente partículas pequeñas (por ejemplo, partículas con diámetro de aproximadamente 2 μm) con sin embargo un pequeño porcentaje de partículas grandes (por ejemplo, partículas con un diámetro por encima de 8 μm) muestran valores de D_V o D_{V50} mayores comparados con el valor de D_N , con proporciones D_V/D_N o D_{V50}/D_N correspondientemente mayores.

La interacción electrostática entre los dos componentes del montaje básicamente se obtiene usando un primer compuesto molecular (comprendido en la envoltura de las microvesículas) que tiene una primera carga neta y un segundo compuesto molecular (comprendido en la estructura del CAM) que tiene una segunda carga neta, que es opuesta en signo a la primera. Las microvesículas que tienen una primera carga neta global y el CAM que tiene una segunda carga neta global, opuesta en signo a la primera, se asocian después entre sí mediante una interacción electrostática para obtener un montaje según la invención.

La microvesícula rellena de gas que forma el primer componente de un montaje según la presente invención puede ser cualquier microvesícula conocida en la técnica que tiene una carga neta global. Los ejemplos preferidos de microvesículas son microburbujas y microglobos (o microcápsulas).

Microburbujas

Un primer ejemplo de una microvesícula rellena de gas se denominará de aquí en adelante una "microburbuja rellena de gas"

Las microburbujas rellenas de gas útiles para preparar un montaje según la presente invención generalmente son burbujas de gas dispersadas en una suspensión acuosa que están estabilizadas por una envoltura (muy fina) que comprende un compuesto anfílico (formador de película), dispuesta en la interfase del gas al líquido. Dicha envoltura estabilizante, algunas veces denominada una "envoltura evanescente" en la técnica, tiene en general un

espesor de menos de 5 nm, típicamente de aproximadamente 2-3 nm, por tanto con frecuencia representa una capa sustancialmente monomolecular. Al menos una parte del material anfífilo comprendido en la envoltura está compuesto de moléculas cargadas, de modo que confieren la carga neta global deseada a la envoltura de las microburbujas.

5 El compuesto anfífilo incluido en la envoltura de las microvesículas puede ser un compuesto biocompatible sintético o natural y puede incluir, por ejemplo, un lípido formador de película, en particular un fosfolípido. Los ejemplos de compuestos anfífilos incluyen, por ejemplo, fosfolípidos; lisolípidos; ácidos grasos, tal como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico o ácido oleico; polímeros que tienen lípidos, tal como quitina, ácido hialurónico, polivinilpirrolidona o polietilenglicol (PEG), también denominados "lípidos pegilados"; mono-, di-, oligo- o polisacáridos sulfonados que tienen lípidos; colesterol, sulfato de colesterol o hemisuccinato de colesterol; hemisuccinato de tocoferol; lípidos con ácidos grasos unidos por éter o éster; lípidos polimerizados; fosfato de diacetilo; foafato de dicetilo; estearilamina; ceramidas; ésteres de ácido grasos y polioxietileno (tal como estearatos de ácido grasos y polioxietileno); alcoholes grasos de polioxietileno, éteres de alcoholes grasos y polioxietileno, ésteres de ácidos grasos y sorbitano polioxietilados, ricinoleato de glicerol y polietilenglicol, esteroides de soja etoxilados, aceite de ricino etoxilado o copolímeros en bloque de óxido de etileno (OE) y óxido de propileno (OP); ésteres de ácidos alifáticos de esteroides incluyendo de butirato de colesterol, isobutirato de colesterol, palmitato de colesterol, estearato de colesterol, acetato de lanosterol, palmitato de ergosterol, o n-butirato de fitoesterol; ésteres de esteroides de azúcares ácidos incluyendo glucorónidos de colesterol, glucorónidos de lanosterol, glucorónido de 7-deshidrocolesterol, glucorónido de ergosterol, gluconato de colesterol, gluconato de lanosterol, o gluconato de ergosterol; ésteres de azúcares ácidos y alcoholes incluyendo glucorónido de laurilo, glucorónido de estearilo, glucorónido de miristoilo, gluconato de laurilo, gluconato de miristoilo o gluconato de estearilo; ésteres de azúcares con ácidos alifáticos incluyendo laurato de sacarosa, laurato de fructosa, palmitato de sacarosa, estearato de sacarosa, ácido glucurónico, ácido glucónico o ácido poliurónico; saponinas incluyendo sarsasapogenina, esmilagenina, hederagenina, ácido oleanólico, o digitoxigenina; glicerol o ésteres de glicerol incluyendo tripalmitato de glicerol, diestearato de glicerol, triestearato de glicerol, dimiristato de glicerol, trimiristato de glicerol, dilaurato de glicerol, trilaurato de glicerol, dipalmitato de glicerol; alcoholes de cadena larga incluyendo alcohol n-decílico, alcohol laurílico, alcohol miristílico, alcohol cetílico, o alcohol n-octadecílico; 6-(5-colesten-3 β -iloxi)-1-tio- β -D-galactopiranosido; digalactosildiglicérido; 6-(5-colesten-3 β -iloxi)hexil-6-amino-6-desoxi-1-tio- β -D-galactopiranosido; 6-(5-colesten-3 β -iloxi)hexil-6-amino-6-desoxi-1-tio- β -D-manopiranosido; ácido 12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanoico; ácido N-[12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanoil]-2-aminopalmítico; N-succinil-dioleilfosfatidiletanolamina; 1,2-dioleil-sn-glicerol; 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerol; 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol; 1-hexadecil-2-palmitoilglicerofosfoetanolamina o palmitoilhomocisteína; sales de alquilamonio que comprenden al menos una cadena de alquilo de (C₁₀-C₂₀), preferiblemente (C₁₄-C₁₈), tal como, por ejemplo, cloruro de estearilamonio, cloruro de hexadecilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); sales de amonio terciario o cuaternario que comprenden una o preferiblemente dos cadenas de acilo de (C₁₀-C₂₀), preferiblemente (C₁₄-C₁₈), unidas al átomo de N a través de un puente de alquilo de (C₃-C₆), tal como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP), 1,2-oleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (DSDAP); y mezclas y combinaciones de los mismos.

Dependiendo de la combinación de componentes y del proceso de producción de las microburbujas, los compuestos ejemplares enumerados anteriormente se pueden emplear como compuesto principal para formar la envoltura de la microvesícula o como simples aditivos, estando por tanto presentes solo en cantidades minoritarias.

45 Según una forma de realización preferida, al menos uno de los compuestos que forman la envoltura de la microvesícula es un fosfolípido, opcionalmente en mezcla con cualquiera de los otros materiales formadores de película citados anteriormente. Según la presente descripción, el término fosfolípido se pretende que abarque cualquier compuesto fosfolípido anfífilo, cuyas moléculas son capaces de formar una película estabilizante de material (típicamente en forma de una capa monomolecular) en la interfase limitante gas-agua en la suspensión final de microburbujas. Según esto, estos materiales también se denominan en la técnica "fosfolípidos formadores de película".

55 Los compuestos fosfolípidos anfífilos típicamente contienen al menos un grupo fosfato y al menos uno, preferiblemente dos, grupo hidrocarbonado de larga cadena lipofílico.

60 Los ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen ésteres de glicerol con uno o preferiblemente dos (iguales o diferentes) residuos de ácidos grasos y con ácido fosfórico, en donde el residuo de ácido fosfórico está a su vez unido a un grupo hidrofílico, tal como colina (fosfatidilcolinas - PC), serina (fosfatidilserinas - PS), glicerol (fosfatidilgliceroles - PG), etanolamina (fosfatidiletanolaminas - PE), inositol (fosfatidilinositol), y grupos similares. Los ésteres de fosfolípidos con solo un residuo de ácido graso generalmente se denominan en la técnica como las formas "liso" del fosfolípido. Los residuos de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos en general son ácidos alifáticos de cadena larga, que típicamente contienen de 12 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 14 a 22; la cadena alifática puede contener una o más insaturaciones o está preferiblemente completamente saturada. Los ejemplos de ácidos grasos adecuados incluidos en los fosfolípidos son, por ejemplo, ácido laurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido oleico, ácido linoleico, y ácido linoléico.

Preferiblemente, se emplean ácidos grasos saturados tal como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido araquídico.

5 Los ejemplos adicionales de fosfolípidos son ácidos fosfatídicos, es decir, los diésteres de glicerol-ácido fosfórico con ácidos grasos; esfingolípidos tal como esfingomielinas, es decir, esos análogos de fosfatidilcolina donde el residuo de diéster de glicerol con ácidos grasos se sustituye por una cadena de ceramida; cardiolipinas, es decir, los ésteres de 1,3-difosfatidilglicerol con un ácido graso; glicolípidos tal como gangliósidos GM1 (o GM2) o cerebrósidos; glucolípidos; sulfátidos y glucoesfingolípidos.

10 Como se usa en el presente documento, el término fosfolípidos incluye productos naturales, semisintéticos o sintéticamente preparados que se pueden emplear singularmente o como mezclas.

Los ejemplos de fosfolípidos naturales son lecitinas naturales (derivados de fosfatidilcolina (PC)) tal como, típicamente, lecitinas de soja o yema de huevo.

15 Los ejemplos de fosfolípidos semisintéticos son los derivados parcial o completamente hidrogenados de las lecitinas naturales. Los fosfolípidos preferidos son diésteres de ácidos grasos de fosfatidilcolina, etilfosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o esfingomielina.

20 Los ejemplos preferidos de fosfolípidos son, por ejemplo, dilaurilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diaraquidoilfosfatidilcolina (DAPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), 1,2 Diestearoil-sn-glicero-3-Etilfosfocolina (Etil-DSPC), dipentadecanoilfosfatidilcolina (DPDPC), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina (PSPC), 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina (SPPC), 1-palmitoil-2-oleilfosfatidilcolina (POPC), 1-oleil-2-palmitoilfosfatidilcolina (OPPC), dilaurilfosfatidilglicerol (DLPG) y sus sales de metales alcalinos, diaraquidoilfosfatidilglicerol (DAPG) y sus sales de metales alcalinos, dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y sus sales de metales alcalinos, diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y sus sales de metales alcalinos, dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG) y sus sales de metales alcalinos, ácido dimiristoil fosfatídico (DMPA) y sus sales de metales alcalinos, ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA) y sus sales de metales alcalinos, ácido diestearoil fosfatídico (DSPA), ácido diaraquidoilfosfatídico (DAPA) y sus sales de metales alcalinos, dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoil fosfatidil-etanolamina (DSPE), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), diaraquidoilfosfatidiletanolamina (DAPE), dilinoleilfosfatidiletanolamina (DLPE), dimiristoil fosfatidilserina (DMPS), diaraquidoil fosfatidilserina (DAPS), dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS), diestearoilfosfatidilserina (DSPS), dioleoilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoil esfingomielina (DPSP), y diestearoilfosfatidilserina (DSSP).

El término fosfolípido incluye además fosfolípidos modificados, por ejemplo, fosfolípidos donde el grupo hidrofílico está a su vez unido a otro grupo hidrofílico. Los ejemplos de los fosfolípidos modificados son fosfatidiletanolaminas modificadas con polietilenglicol (PEG), es decir, fosfatidiletanolaminas donde la fracción etanolamina hidrofílica está unida a una molécula de PEG de peso molecular variable, por ejemplo de 300 a 5000 dalton), tal como DPPE-PEG o DSPE-PEG, es decir, DPPE (o DSPE) que tiene un polímero PEG unido a la misma. Por ejemplo DPPE-PEG2000 se refiere a DPPE que tiene unida a la misma un polímero PEG que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2000.

45 Fosfolípidos particularmente preferidos son DAPC, DSPC, DPPA, DSPA, DMPS, DPPS, DSPS y etil-DSPC. Los más preferidos son DAPC o DSPC.

También se pueden usar mezclas de fosfolípidos, tal como, mezclas de DPPC, DSPC y/o DAPC con DSPS, DPPS, DSPA, DPPA, DSPG, DPPG, etil-DSPC y/o etil-DPPC.

50 En algunas formas de realización el fosfolípido es el componente principal de la envoltura estabilizante de microburbujas, representando al menos el 50% (p/p) de la cantidad total de componentes que forman la envoltura de las microburbujas rellenas de gas. En algunas formas de realización preferidas, sustancialmente la totalidad de la envoltura (es decir, al menos el 90% y hasta el 100% en peso) puede estar formado de fosfolípidos.

55 Los fosfolípidos se pueden usar convenientemente en mezcla con cualquiera de los compuestos anfífilos enumerados anteriormente. Por tanto, por ejemplo, lípidos tales como colesterol, ergosterol, fitosterol, sitosterol, lanosterol, tocoferol, galato de propilo o palmitato de ascorbilo, ácidos grasos tal como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico y derivados de los mismos o hidroxitolueno butilado y/o otros compuestos no fosfolípidos se pueden añadir opcionalmente a uno o más de los fosfolípidos anteriores en proporciones que varían desde cero al 50% en peso, preferiblemente hasta el 25%. Particularmente preferido es ácido palmítico.

65 Para conferir la carga neta global deseada a la microburbuja, la envoltura debe comprender al menos un componente que lleva una carga neta global, en particular un material anfífilo cargado, preferiblemente un lípido o un fosfolípido.

Los ejemplos de fosfolípidos que llevan una carga negativa global son derivados, en particular diésteres de ácidos grasos, de fosfatidilserina, tal como DMPS, DPPS, DSPS; de ácido fosfatídico, tal como DMPA, DPPA, DSPA; de fosfatidilglicerol tal como DMPG, DPPG y DSPG. También se pueden usar fosfolípidos modificados, en particular, fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, tal como DMPE-PEG2000, DMPE-PEG3000, DMPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DPPE-PEG2000, DPPE-PEG3000, DPPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG3000, DSPE-PEG4000, DSPE-PEG5000, DAPE-PEG2000, DAPE-PEG3000, DAPE-PEG4000 o DAPE-PEG5000 como moléculas cargadas negativamente. Además la forma liso de los fosfolípidos citados anteriormente, tal como derivados de lisofosfatidilserina (por ejemplo, liso-DMPS, -DPPS o -DSPS), derivados de ácido lisofosfatídico (por ejemplo, liso-DMPA, -DPPA o -DSPA) y derivados de lisofosfatidilglicerol (por ejemplo, liso-DMPG, -DPPG o -DSPG), se pueden usar ventajosamente como compuesto cargado negativamente. Los ejemplos de lípidos cargados negativamente son sales de ácidos biliares tal como sales de ácido cólico, sales de ácido desoxicólico; y sales de ácidos grasos de (C₁₂-C₂₄), preferiblemente (C₁₄-C₂₂) tal como, por ejemplo, sal de ácido palmítico, sal de ácido esteárico, sal de 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerol o sal de 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol.

Preferiblemente, el compuesto cargado negativamente se selecciona entre DPPA, DPPS, DSPG, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG5000 o mezclas de los mismos.

El componente cargado negativamente típicamente se asocia con un contraión positivo correspondiente, que puede ser mono- (por ejemplo un metal alcalino o amonio), di- (por ejemplo, un metal alcalinotérreo) o trivalente (por ejemplo, aluminio). Preferiblemente el contraión se selecciona entre cationes de metal alcalino, tal como Li⁺, Na⁺ o K⁺, más preferiblemente Na⁺.

Los ejemplos de fosfolípidos que tienen una carga positiva global son derivados de etilfosfatidilcolina, en particular ésteres de etilfosfatidilcolina con ácidos grasos, tal como 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (etil-DSPC o DSEPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (etil-DPPC o DPEPC). El contraión negativo es preferiblemente un ión de halógeno, en particular cloro o bromo. Los ejemplos de lípidos cargados positivamente son sales de alquilamonio con un contraión halógeno (por ejemplo, cloro o bromo) que comprenden al menos una cadena de alquilo de (C₁₀-C₂₀), preferiblemente de (C₁₄-C₁₈), tal como, por ejemplo, cloruro de estearilamonio, cloruro de hexadecilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Los ejemplos adicionales de lípidos cargados positivamente son sales de amonio terciario o cuaternario con un contraión halógeno (por ejemplo, cloro o bromo) que comprenden una o preferiblemente dos cadenas de acilo de (C₁₀-C₂₀), preferiblemente de (C₁₄-C₁₈), unidas al átomo de N a través de un puente de alquileo de (C₃-C₆), tal como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP), 1,2-oleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (DSDAP).

DSEPC, DPEPC y/o DSTAP se emplean preferiblemente como compuesto cargados positivamente en la envoltura de la microvesícula.

El componente cargado positivamente típicamente se asocia con un correspondiente contraión negativo que puede ser mono- (por ejemplo, halógeno), di- (por ejemplo, sulfato) o trivalente (por ejemplo, fosfato). Preferiblemente, el contraión se selecciona entre iones de halógeno, tal como F⁻ (flúor), Cl⁻ (cloro) o Br⁻ (bromo).

Para permitir una interacción electrostática eficaz con el CAM, la cantidad total de compuestos cargados en la envoltura de la microvesícula debe ser de al menos el 1% en moles con respecto a la cantidad total de material que forma dicha envoltura, preferiblemente al menos el 5% y mucho más preferiblemente de al menos el 10%. En algunas combinaciones preferidas de microvesículas y CAM, se ha observado que una cantidad de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 40%, de compuestos cargados en la envoltura de las microvesículas permite unir cantidades relativamente mayores de CAM a dichas microvesículas. Aunque en algunas formas de realización la totalidad de la envoltura de la microvesícula puede estar formada por compuestos cargados, se ha observado que puede ser ventajoso añadir al menos cantidades mínimas de compuestos neutros a la formulación que forma dicha envoltura. Preferiblemente, la cantidad total de componente cargado puede por tanto ser igual a o menor que aproximadamente el 95% en moles con respecto a la cantidad total de componentes que forman la envoltura de la microvesícula, más preferiblemente igual a o menor que el 90%, hasta cantidades particularmente preferidas iguales a o menores que el 80%.

Se pueden emplear satisfactoriamente mezclas de fosfolípidos neutros y cargados y/o lípidos cargados para formar las microvesículas de un montaje de la presente invención. Preferiblemente, se emplean mezclas de dos o más lípidos o fosfolípidos, al menos uno con una carga neutra y al menos uno con una carga neta global. Más preferiblemente, se emplean mezclas de dos o más lípidos o fosfolípidos, al menos uno con carga neutra y al menos uno con carga positiva, para obtener microvesículas con una carga positiva global. La cantidad de lípido o fosfolípido cargado puede variar desde aproximadamente el 95% hasta aproximadamente el 1% en moles, con respecto a la cantidad total de lípido y fosfolípido, preferiblemente desde el 80% hasta el 20% en moles.

Las mezclas preferidas de fosfolípidos neutros y lípidos o fosfolípidos cargados son, por ejemplo, DPPG/DSPC, DSTAP/DAPC, DPPS/DSPC, DPPS/DAPC, DSPA/DAPC, DSPA/DSPC y DSPG/DSPC.

Otros excipientes o aditivos pueden estar presentes bien en la formulación seca o se pueden añadir junto con el soporte acuoso usado para la reconstitución, sin estar necesariamente implicados (o solo parcialmente implicados) en la formación de la envoltura estabilizante de la microvesícula. Estos incluyen reguladores de pH, ajustadores de osmolalidad, potenciadores de viscosidad, emulsionantes, agentes de carga, etc. y se pueden usar en cantidades convencionales. Por ejemplo, se pueden usar compuestos como polioxipropilenglicol y polioxietilenglicol así como copolímeros de los mismos. Los ejemplos de potenciadores de viscosidad o estabilizantes son compuestos seleccionados de poli y oligosacáridos lineales y entrecruzados, azúcares, polímeros hidrofílicos como polietilenglicol.

Como la preparación de microvesículas rellenas de gas puede implicar un paso de liofilización o secado por rociado, puede ser ventajoso incluir en la formulación uno o más agentes con efecto crioprotector y/o lioprotector y/o uno o más agentes de carga, por ejemplo un aminoácido tal como glicina; un hidrato de carbono, por ejemplo, un azúcar tal como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa, glucosa, lactosa o una ciclodextrina, o un polisacárido tal como dextrano; o un poliglicol tal como polietilenglicol.

Las microburbujas utilizables en un montaje según la invención se pueden producir según cualquier método conocido en la técnica. Típicamente, el método de fabricación implica la preparación de un material en polvo seco que comprende un material anfifílico como se ha indicado anteriormente, preferiblemente por liofilización (secado por congelación) de una suspensión acuosa u orgánica que comprende dicho material.

Por ejemplo, como se describe en el documento WO 91/15244 los compuestos anfifílicos formadores de película se pueden convertir primero en una forma lamelar por cualquier método de formación de liposomas. Por ejemplo, una solución acuosa que comprende los lípidos formadores de película y opcionalmente otros aditivos (por ejemplo, potenciadores de viscosidad, tensioactivos no formadores de película, electrolitos, etc.) se puede someter a homogenización mecánica de alta velocidad o a sonicación en frecuencias acústicas o ultrasónicas, y después liofilizar para formar un polvo suelto que después se almacena en presencia de un gas. Se pueden realizar pasos opcionales de lavado, como se divulga, por ejemplo en el documento US 5.597.549, antes de la liofilización.

Según una forma de realización alternativa (descrita, por ejemplo, en el documento anteriormente citado US 5.597.549) un compuesto formador de película y un estabilizante hidrofílico (por ejemplo, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, ácido glicólico, ácido málico o maltol) se puede disolver en un solvente orgánico (por ejemplo, butanol terciario, 2-metil-2-butanol o $C_2Cl_4F_2$) y la solución se puede liofilizar para formar un polvo seco.

Alternativamente, como se divulga en el anteriormente citado documento WO 04/069284, un fosfolípido (seleccionado entre los citados anteriormente e incluyendo al menos uno de los fosfolípidos cargados identificados anteriormente) y un agente lioprotector (tal como los enumerados previamente, en particular, hidratos de carbono, polioles, poliglicoles y mezclas de los mismos) se pueden dispersar en una emulsión de agua con un solvente orgánico inmiscible con agua (por ejemplo, alcanos lineales o ramificados, alquenos, cicloalcanos, hidrocarburos aromáticos, éteres de alquilo, cetonas, hidrocarburos halogenados, hidrocarburos perfluorados o mezclas de los mismos). La emulsión así obtenida, que contiene microgotitas de solvente rodeadas y estabilizadas por el material fosfolípido (y opcionalmente por otros compuestos anfifílicos formadores de película), se liofiliza después según técnicas convencionales para obtener un material liofilizado, que se almacena (por ejemplo, en un vial en presencia de un gas adecuado) y que se puede reconstituir con un soporte acuoso para dar por último una suspensión de microburbujas rellenas de gas.

Un proceso adicional para preparar microburbujas rellenas de gas comprende generar una dispersión de microburbujas de gas sometiendo un medio acuoso que comprende un fosfolípido (y opcionalmente otros compuestos anfifílicos formadores de película y/o aditivos) a una alta energía de agitación controlada (por ejemplo, por medio de un mezclador de rotor estator) en presencia de un gas deseado y someter la dispersión obtenida a liofilización para dar un producto reconstituible seco. Se da un ejemplo de este proceso, por ejemplo, en el documento WO 97/29782, adjuntado aquí por referencia.

También se pueden usar técnicas de secado por rociado (como se divulga, por ejemplo, en el documento US 5.605.673) para obtener el polvo seco que contiene la microvesículas del montaje de la invención.

El producto seco o liofilizado obtenido con cualquiera de las técnicas anteriores generalmente estará en forma de un polvo o una torta, y se puede almacenar (por ejemplo en un vial) en contacto con el gas deseado. El producto es fácilmente reconstituible en un soporte líquido acuoso adecuado, que sea fisiológicamente aceptable, estéril e inyectable, para formar las microvesículas rellenas de gas. Los soportes líquidos adecuados son agua, soluciones acuosas tal como solución salina (que puede estar ventajosamente equilibrada de modo que el producto final para inyección no sea hipotónico), o soluciones de una o más sustancias ajustadoras de tonicidad tal como sales o azúcares, polioles, glicoles u otros materiales polioles no iónicos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, glicerol, polietilenglicoles, propilenglicoles y similares).

Microglobos

- Otras microvesículas rellenas de gas adecuadas para un montaje según la invención se denominan en la técnica "microglobos". En general, estas microvesículas rellenas de gas tienen una envoltura material, cuyo espesor es mayor que el espesor de envoltura de película estabilizante de las microburbujas. Dependiendo del material que forma dicha envoltura (que puede ser, por ejemplo, polimérico, proteináceo, de un lípido insoluble en agua o de cualquier combinación de los mismos), dicho espesor es en general de al menos 50 nm, típicamente de al menos 100 nm, hasta unos pocos cientos de nanómetros (por ejemplo, 300 nm).
- Los microglobos también se diferencian generalmente de las microburbujas en términos de respuesta acústica a ultrasonificación. Mientras que el comportamiento ultrasónico de las microburbujas está de hecho cercano al comportamiento de burbujas de gas "libres", los microglobos (probablemente debido a una mayor rigidez de la envoltura) en general responden menos (en términos de intensidad de la señal de eco reflejada) cuando se irradian a bajos niveles de energía de presión acústica (por ejemplo, a un índice mecánico de aproximadamente 0,1).
- Los ejemplos de microglobos que son útiles para preparar un montaje según la invención son preferiblemente microglobos que tienen una envoltura polimérica, que preferiblemente comprenden un polímero biodegradable, o una envoltura basada en lípidos insolubles en agua biodegradables, tal como, por ejemplo, los descritos en los documentos US 5.711.933 y US 6.333.021. Los microglobos que tienen una envoltura proteinácea, es decir, hecha de proteínas naturales (albúmina, hemoglobina) tal como los descritos en los documentos US-A-4.276.885 o EP-A-0 324 938, también se pueden emplear.
- Los polímeros que forman la envoltura de los microglobos inyectables son preferiblemente polímeros hidrofílicos, biodegradables fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de tales polímeros, que pueden ser naturales o sintéticos, son polisacáridos sustancialmente insolubles (por ejemplo, quitosano o quitina), policianoacrilatos, polilactidas y poliglicolidas y sus copolímeros, copolímeros de lactidas y lactonas, tal como γ -caprolactona o δ -valerolactona, copolímeros de óxido de etileno y lactidas, polietileniminas, polipéptidos y proteínas tal como gelatina, colágeno, globulinas o albúminas. Otros polímeros adecuados mencionados en el documento anteriormente citado US 5.711.933 incluyen poli-(orto)ésteres, ácido poliláctico y poliglicólico y sus copolímeros (por ejemplo, DEXON®, Davis & Geck, Montreal, Canadá); poli(DL-lactida-co- γ -caprolactona), poli(DL-lactida-co- δ -valerolactona), poli(DL-lactida-co- γ -butirolactona), polialquilcianoacrilatos; poliamidas, polihidroxibutirato; polidioxanona; poli- β -aminocetonas; polifosfacenos; y polianhídridos. También se pueden usar poliaminoácidos tal como ácidos poliglútamico y poliaspártico, así como sus derivados, tal como ésteres parciales con alcoholes inferiores o glicoles. También se pueden usar copolímeros con otros aminoácidos tal como metionina, leucina, valina, prolina, glicina, alanina, etc. También se pueden usar derivados de ácido poliglútamico o poliaspártico con biodegradabilidad controlada (tal como los descritos en los documentos WO87/03891, US 4.888.398 o EP 130935). Estos polímeros (y copolímeros con otros aminoácidos) tienen fórmulas del siguiente tipo: $-(NH-CHA-CO)_w-(NH-CHX-CO)_y-$ donde X designa la cadena lateral de un residuo de aminoácidos (por ejemplo, metilo, isopropilo, isobutilo, o bencilo); A es un grupo de fórmula $-(CH_2)_nCOOR^1R^2-OCOR$, $-(CH_2)_nCOO-CHR^1COOR$, $-(CH_2)_nCO(NH-CHX-CO)_mNH-CH(COOH)-(CH_2)_pCOOH$, o los respectivos anhídridos de los mismos, en donde R^1 y R^2 representan H o alquilo inferior, y R representa alquilo o arilo; o R y R^1 están unidos por un miembro enlazador sustituido o sin sustituir para proporcionar anillos de 5 o 6 miembros; n, m y p son números enteros inferiores, que no superan 5; y w e y son números enteros seleccionados para tener pesos moleculares no por debajo de 5000.
- Los polímeros no biodegradables (por ejemplo, para hacer microglobos que se van a usar en el aparato digestivo) se pueden seleccionar de la mayoría de polímeros insolubles en agua, fisiológicamente aceptables, biorresistentes incluyendo poliolefinas (poliestireno), resinas acrílicas (poliacrilatos, poliacrilonitrilo), poliésteres (policarbonato), poliuretanos, poliurea y sus copolímeros. ABS (acril-butadieno-estireno) es un copolímero preferido.
- Los lípidos insolubles en agua biodegradables útiles para formar un microglobo para un montaje según la invención comprenden, por ejemplo, mono-, di- o triglicéridos insolubles en agua sólidos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides tal como colesterol, ceras y mezclas de los mismos. Los mono-, di- y triglicéridos incluyen principalmente los compuestos mono-, di- y trilaurina así como los correspondientes derivados de -miristina, -palmitina, -estearina, -araquidina y -behenina. Mono-, di- y tri-miristina, -palmitina, -estearina y triglicéridos mezcla tal como dipalmitoilmonooleil glicérido son particularmente útiles; tripalmitina y triestearina son preferidas. Los ácidos grasos incluyen ácidos grasos (preferiblemente saturados) sólidos (a temperatura ambiente, aproximadamente 18-25°C) que tienen 12 átomos de carbono o más, incluyendo, por ejemplo, ácidos laurico, araquídico, behénico, palmítico, esteárico, sebáico, mirístico, cerotínico, melísico y erucico y los ésteres de ácidos de 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 glicéridos y/o ácidos grasos y se seleccionan de colesterol, fitosterol, lanosterol, ergosterol, etc. y ésteres de los esteroides con los ácidos grasos anteriormente mencionados; sin embargo, el colesterol es preferido.
- Los lípidos biodegradables preferidos son triglicéridos tal como tripalmitina, triestearina o mezclas de los triglicéridos anteriormente mencionados.

Opcionalmente, hasta el 75% en peso de un polímero biodegradable, tal como los enumerados previamente, se puede mezclar con el lípido insoluble en agua biodegradable que forma la envoltura del microglobo.

5 Ventajosamente, también se pueden usar polímeros iónicos (es decir, polímeros que tienen fracciones iónicas en su estructura), preferiblemente polímeros iónicos biodegradables, para formar la envoltura estabilizante de los microglobos, confiando de esta manera la carga neta global deseada a la misma. Los polímeros iónicos se pueden usar como componentes principales de la envoltura estabilizante o se pueden mezclar en varias cantidades (por ejemplo del 2 al 80% en peso) con polímeros no iónicos. Los polímeros iónicos adecuados son, por ejemplo, 10 polímeros que comprenden un átomo de nitrógeno cuaternarizado, tal como aminas cuaternarizadas o polímeros que comprenden fracciones carboxílico, sulfato, sulfonato o fosfonato. Los ejemplos de polímeros iónicos adecuados incluyen, sin limitación, Polietilenimina, poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli{bis(2-cloroetil)eter-alt-1,3-bis[3-(dimetilamino)propil]urea} cuaternizada (Polyquaternium®-2), poli(tribromuro de 4-vinilpiridinio), etoxilato de hidroxietilcelulosa cuaternizada (Polyquaternium®-4, poli(cloruro de p-xileno tetrahidrotiofenio), poli(L-lisina), quitina, dietileneaminoetil dextrano, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), poli(estireno-alt-ácido maleico), 15 poli(aminoácidos), ácido algínico, poli(ácido uridílico), ácido hialurónico, es decir, poli(ácido β -glucurónico-alt- β -N-acetilglucosamida), poli(ácido galacturónico), poli(acetato de vinilo-co-ácido crotonico), ADN, poli(dianhídrido de 3,3',4,4'- benzenotetracarboxílico-co-4,4'-oxidianilina), poli(isopreno-injerto- éter monometílico del ácido maleico), copolímero de ácido glutámico con glutamato de alquilo, heparina, poli(sulfonato de estireno), poli(ácido isoftálico) 20 sulfonado, poli(sulfonato de vinilo, sal de potasio), poli(sulfato de vinilo, sal de potasio), sulfato de condroitina A, sulfato de dextrano, fucoidano, ácido polifosfórico, polifosfato de sodio, povinilfosfonato de sodio, bromhidrato de poli-L-lisina, quitosano, sulfato de quitosano, alginato de sodio, ácido algínico y ligninsulfonato.

También se pueden incorporar aditivos convencionales en la envoltura de los microglobos, para modificar las propiedades físicas de los mismos, tal como dispersibilidad, elasticidad y permeabilidad al agua. En particular, se 25 pueden añadir cantidades eficaces de materiales anfífilicos a la emulsión preparada para la fabricación de dichos microglobos, para aumentar la estabilidad de los mismos. Dichos materiales se pueden seleccionar ventajosamente de entre esos compuestos anfífilicos, tal como lípidos, fosfolípidos y fosfolípidos modificados, enumerados en lo anterior de esta especificación.

30 El material anfífilico añadido puede ser ventajosamente un compuesto que tiene una carga neta global. Los lípidos cargados, fosfolípidos y fosfolípidos modificados preferidos son los previamente enumerados.

35 Para permitir una interacción electrostática eficaz con el CAM, la cantidad total de aditivo cargado en la envoltura del microglobo debe ser al menos el 1% en moles con respecto a la cantidad total de material que forma dicha envoltura. La cantidad total del componente cargado sin embargo, es preferiblemente menor de aproximadamente el 70% en moles con respecto a la cantidad total del material que forma la envoltura del microglobo. Preferiblemente la cantidad de compuesto cargado es desde aproximadamente el 2% al 40%.

40 Otros excipientes o aditivos, en particular usados para la preparación de microglobos, se pueden incorporar en la envoltura tal como agentes redispersantes o potenciadores de viscosidad.

Los microglobos que contienen polímero biodegradable se pueden preparar, por ejemplo, según el proceso divulgado en el documento US 5.711.933 que comprende (a) emulsionar una fase orgánica hidrofóbica en una fase acuosa de modo que se obtengan gotitas de dicha fase hidrofóbica como una emulsión de aceite en agua en dicha fase acuosa; (b) añadir a dicha emulsión una solución de al menos un polímero en un solvente volátil insoluble en la fase acuosa, de modo que dicho polímero forme una capa alrededor de dichas gotitas; (c) evaporar dicho solvente volátil de modo que el polímero se deposita por precipitación de interfase alrededor de las gotitas que después forman bolas con un núcleo de dicha fase hidrofóbica encapsulado por una membrana de dicho polímero, dichas 45 bolas están en suspensión en dicha fase acuosa; (d) eliminar dicha fase hidrofóbica encapsulada por evaporación sometiendo dicha suspensión a presión reducida; y (e) sustituir dicha fase hidrofóbica evaporada con un gas adecuado.

Los microglobos que contienen un lípido biodegradable se pueden preparar, por ejemplo, según el proceso divulgado en el documento US 6.333.021 por dispersión de una mezcla de uno o más constituyentes sólidos de la envoltura de la microcápsula disueltos en un solvente orgánico en una fase soporte acuosa, de modo que se produzca una emulsión de aceite en agua. La fase acuosa de la emulsión puede contener una cantidad eficaz de materiales anfífilicos que se usan para estabilizar la emulsión.

60 Una cierta cantidad de agente redispersante y/o de un agente crioprotector o lioprotector, tales como los indicados previamente, se añade después a la emulsión de gotitas diminutas de la solución orgánica en la fase acuosa, antes de congelar a una temperatura por debajo de -30°C . Cualquier agente redispersante conveniente se puede usar; los agentes redispersantes seleccionados de azúcares, albúmina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol (PEG) y copolímero en bloque de óxido de etileno-óxido de propileno (por ejemplo, Pluronic® o Synperonic®) o mezclas de los mismos son preferidos. Los agentes redispersantes que se añaden para prevenir la aglomeración de partículas son particularmente útiles cuando las microcápsulas están en forma de polvos no 65

coalescentes, secos e instantáneamente dispersables. La emulsión congelada se somete después a presión reducida para efectuar la liofilización, es decir, la eliminación por sublimación del solvente orgánico de las gotitas y del agua de la fase soporte, y el producto liofilizado se pone después en contacto con el gas deseado.

5 Gas biocompatible

Cualquier gas biocompatible, gas precursor o mezcla de los mismos se puede emplear para rellenar las microvesículas anteriores, el gas se selecciona dependiendo de la modalidad elegida.

10 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 kriptón; un gas radioactivo tal como Xe^{133} o Kr^{81} ; un gas noble hiperpolarizado tal como helio hiperpolarizado, xenón hiperpolarizado o neón hiperpolarizado; un hidrocarburo de bajo peso molecular (por ejemplo que contiene 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 como propeno, buteno o isobuteno, o un alquino tal como acetileno; un éter; una cetona; un éster; gases halogenados, preferiblemente gases fluorados, tal como hidrocarburos de bajo peso molecular halogenados, fluorados o perfluorados (por ejemplo que contiene hasta 7 átomos de carbono); o una mezcla de cualquiera de los anteriores. Donde se usa un hidrocarburo halogenado, preferiblemente al menos alguno, más preferiblemente todos, los átomos de halógeno en dicho compuesto son átomos de flúor.

20 Los gases fluorados son preferidos, en particular gases perfluorados, especialmente en el campo de la ecografía. Los gases fluorados incluyen materiales que contienen al menos un átomo de flúor tal como, por ejemplo, hidrocarburos fluorados (compuestos orgánicos que contienen uno o más átomos de carbono y flúor); hexafluoruro de azufre; cetonas fluoradas, preferiblemente perfluoradas, tal como perfluoroacetona; y éteres fluorados, preferiblemente perfluorados, tal como éter perfluorodietílico. Los compuestos preferidos son gases perfluorados, tal como SF_6 o perfluorocarbonos (hidrocarburos perfluorados), es decir, hidrocarburos donde todos los átomos de hidrógeno están sustituidos por átomos de flúor, que se sabe que forman suspensiones de microburbujas particularmente estables, como se divulga, por ejemplo, en el documento EP 0554 213.

30 El término perfluorocarbono incluye perfluorocarbonos saturados, insaturados y cíclicos. Los ejemplos de perfluorocarbonos biocompatibles, fisiológicamente aceptables son: perfluoroalcanos, tal como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropanos, perfluorobutanos (por ejemplo, perfluoro-n-butano, optionalmente en mezcla con otros isómeros tal como perfluoro-isobutano), perfluoropentanos, perfluorohexanos o perfluoroheptanos; perfluoroalquenos, tal como perfluoropropeno, perfluorobutenos (por ejemplo, perfluorobut-2eno) o perfluorobutadieno; perfluoroalquinos (por ejemplo, perfluorobut-2-ino); y perfluorocicloalcanos (por ejemplo, perfluorociclobutano, perfluorometilciclobutano, perfluorodimetilciclobutanos, perfluorotrimetilciclobutanos, perfluorociclopentano, perfluorometilciclopentano, perfluorodimetilciclopentanos, perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano y perfluorocicloheptano). Los perfluorocarbonos saturados preferidos tienen la fórmula C_nF_{n+2} , donde n es desde 1 a 12, preferiblemente de 2 a 10, más preferiblemente de 3 a 8 e incluso más preferiblemente de 3 a 6. Los perfluorocarbonos adecuados 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} .

40 Los gases particularmente preferidos son SF_6 o perfluorocarbonos seleccionados de CF_4 , C_2F_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} o mezclas de los mismos; SF_6 , C_3F_8 o C_4F_{10} son particularmente preferidos.

45 Puede ser ventajoso usar una mezcla de cualquiera de los gases anteriores en cualquier proporción. Por ejemplo, la mezcla puede comprender un gas convencional, tal como nitrógeno, aire o dióxido de carbono y un gas que forma una suspensión de microburbujas estable, tal como hexafluoruro de azufre o un perfluorocarbono como se ha indicado anteriormente. Se pueden encontrar ejemplos de mezclas de gases adecuadas, por ejemplo, en el documento WO 94/09829.

Las siguientes combinaciones son particularmente preferidas:

55 una mezcla de gases (A) y (B) en la que el gas (B) es un gas fluorado, preferiblemente seleccionado de SF_6 , CF_4 , C_2F_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} , C_5F_{12} , o mezclas de los mismos, y (A) se selecciona de aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono o mezclas de los mismos. La cantidad de gas (B) puede representar desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 95% v/v de la mezcla total, preferiblemente desde aproximadamente el 5% al 80%.

60 En ciertas circunstancias puede ser deseable incluir un precursor para una sustancia gaseosa (es decir, un material que sea capaz de convertirse en un gas in vivo). Preferiblemente el precursor gaseoso y el gas derivado del mismo son fisiológicamente aceptables. El precursor gaseoso puede estar activado por pH, activado por luz, activado por temperatura, etc. Por ejemplo, se pueden usar ciertos perfluorocarbonos como precursores gaseosos activados por temperatura. Estos perfluorocarbonos, tal como perfluoropentano o perfluorohexano, tienen una temperatura de transición de fase líquido/gas por encima de la temperatura ambiente (o la temperatura a la que los agentes se

65

producen y/o almacenan) pero por debajo de la temperatura corporal; por tanto, experimentan una transición de fase líquido/gas y se convierten a un gas en el cuerpo humano.

5 Para ecografía ultrasónica, el gas biocompatible o mezcla de gases preferiblemente se selecciona de aire, nitrógeno, dióxido de carbono, helio, kriptón, xenón, argón, metano, hidrocarburos halogenados (incluyendo gases fluorados tal como perfluorocarbonos y hexafluoruro de azufre) o mezclas de los mismos. Ventajosamente, se pueden usar perfluorocarbonos (en particular C_4F_{10} o C_3F_8) o SF_6 , opcionalmente en mezcla con aire o nitrógeno.

10 Para el uso del montaje en IRM las microvesículas preferiblemente contendrán un gas noble hiperpolarizado tal como neón hiperpolarizado, helio hiperpolarizado, xenón hiperpolarizado, o mezclas de los mismos, opcionalmente en mezcla con aire, CO_2 , oxígeno, nitrógeno, helio, xenón, o cualquiera de los hidrocarburos halogenados como se han definido anteriormente.

15 Para uso en gammagrafía, la microvesícula de un montaje según la invención preferiblemente contendrá gases radioactivos tal como Xe^{133} o Kr^{81} o mezclas de los mismos, opcionalmente en mezcla con aire, CO_2 , oxígeno, nitrógeno, helio, kriptón o cualquiera de los hidrocarburos halogenados como se han definido anteriormente.

Componente asociado a microvesículas (CAM)

20 El segundo componente del montaje asociado a la microvesícula (CAM) puede ser cualquier entidad estructural que comprende un agente tensioactivo biocompatible que tiene una carga neta global. En particular, dicha entidad estructural es preferiblemente una estructura supramolecular formada por la asociación de una pluralidad de moléculas, preferiblemente anfífilas. En algunas formas de realización, dicho compuesto cargado se mezcla con otros agentes tensioactivos y/o aditivos que son neutros. El CAM comprende además un ligando de
25 direccionamiento, agente bioactivo y/o agente diagnóstico deseado, dependiendo de la aplicación específica del montaje. Los materiales tensioactivos biocompatibles adecuados para preparar un CAM para un montaje según la invención se pueden seleccionar entre los compuestos previamente enumerados, tal como ácidos orgánicos de (C_2 - C_{10}), ácidos grasos orgánicos que comprenden una cadena alifática de (C_{12} - C_{24}), preferiblemente de (C_{14} - C_{22}), las sales farmacéuticamente aceptables (alcalinas) de los mismos y los ésteres respectivos con polioxietileno, tal como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido oleico, dodecanoato de sodio, oxalato de sodio o tartrato de sodio o estearato de ácido graso y polioxietileno; sales poliónicas (alcalinas), tal como citrato de sodio, poliacrilato de sodio, fosfato de sodio; aminas orgánicas, amidas, sales (haluros) de amina cuaternaria, preferiblemente que contienen un cadena hidrocarbonada de (C_8 - C_{22}), incluyendo derivados polioxietilados de los mismos, tal como etanolamina, trietanolamina, alquilaminas, alcanolamidas, cloruro de trimetilalquilamina, alquilaminas polioxietiladas, alcanolamidas polioxietiladas; aminoácidos; fosfolípidos, tal como diésteres de ácido graso de fosfatidilcolina, etilfosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o de esfingomielina; ésteres de mono u oligosacáridos con ácidos grasos orgánicos de (C_{12} - C_{24}), preferiblemente (C_{14} - C_{22}), tal como laurato de sorbitano; tensioactivos poliméricos, es decir, copolímeros en bloque que incluyen partes hidrofóbicas e hidrofílicas, tal como copolímeros en bloque de óxido de etileno/óxido de propileno; sulfonatos orgánicos tal como alquil(C_{12} - C_{24}), preferiblemente alquil(C_{14} - C_{22}) sulfonato de álcali (por ejemplo, sodio); ácidos perfluoroorgánicos, tal como ácido perfluorooctanoico; y mezclas de los mismos. Los compuestos preferidos son esos materiales anfífilos neutros o cargados previamente enumerados entre los componentes adecuados de microburbujas, incluyendo lípidos, fosfolípidos y fosfolípidos modificados. Un CAM preferido está en forma de una micela.

45 La preparación del CAM se puede obtener según técnicas convencionales, por ejemplo, dispersando los componentes relevantes que forman el CAM en un soporte acuoso y opcionalmente lavando la suspensión obtenida para eliminar el material en exceso.

50 Dicho segundo componente es preferiblemente un nanocomponente, es decir, su dimensión relativa es de aproximadamente 100 nm o menos, preferiblemente de aproximadamente 80 nm o menos y más preferiblemente de aproximadamente 50 nm o menos. Las dimensiones del CAM, en particular su diámetro medio en número, se pueden determinar según técnicas convencionales, tal como, por ejemplo, espectroscopía de correlación fotónica. Por ejemplo, se puede usar un ZetaSizer 3000 Has (Malvern Instruments GmbH). Particularmente, cuando el CAM
55 incorpora un ligando de direccionamiento, agente bioactivo y/o agente diagnóstico deseado en su estructura, sus dimensiones son preferiblemente de al menos 0,1 nm, más preferiblemente de al menos 1 nm.

60 Preferiblemente el CAM tiene una dimensión media que es al menos 10 veces menos o más pequeña que la dimensión media de las microvesículas a las que el CAM se asocia, más preferiblemente al menos 50 veces menos o más pequeña. Dicha dimensión media es en general no menor de 1000 veces, preferiblemente no menor de 500 veces.

65 Como se puede apreciar, debido a las dimensiones relativamente más pequeñas del CAM con respecto a la microvesícula rellena de gas, es posible asociar un cantidad relativamente grande de CAM a las microvesículas, aumentando de esta manera la eficacia del montaje en términos de un mayor número de fracciones de direccionamiento unidas y/o de la cantidad de agente terapéutico o diagnóstico liberable incorporado en las mismas.

Además, dichas dimensiones relativamente pequeñas del CAM permiten obtener montajes con dimensiones comparables a las dimensiones de las microvesículas. De hecho se prefiere que el diámetro medio en número de un montaje según la invención no sea mayor de aproximadamente el 30% del diámetro medio de la microvesícula medida antes del montaje, más preferiblemente no mayor del 20% y mucho más preferiblemente no mayor del 10%.

En algunas formas de realización de la invención, el material cargado puede formar la sustancial totalidad del CAM, es decir, el 90% en moles o más. En algunas otras formas de realización, es preferible que las moléculas cargadas que forman la estructura de dicho CAM no representen la totalidad de los compuestos que forman dicha estructura, estando mezclados por tanto con una cierta cantidad de compuestos neutros. Dichas moléculas cargadas pueden representar, por tanto, menos de aproximadamente el 90% en moles de la cantidad total del material que forma dicho CAM. Por otra parte, el solicitante ha observado que la cantidad de moléculas cargadas en el CAM preferiblemente debe ser al menos el 0,5% en moles con respecto a la cantidad total de material que forma dicha envoltura, para permitir una interacción eficaz con la microvesícula cargada. Preferiblemente, dicha cantidad es de al menos el 1%, más preferiblemente de al menos el 2% en moles. En algunas formas de realización preferidas de la invención, la cantidad de moléculas cargadas que forman la estructura del CAM es preferiblemente de aproximadamente el 50% o menor, más preferiblemente de aproximadamente el 20% o menor.

Micelas

Como se ha mencionado previamente, un componente preferido que se va a asociar con una microvesícula en un montaje de la invención es una micela. El término "micela" como se usa en el presente documento incluye tanto micelas como micelas mezcladas, donde el término micelas mezcladas se refiere a una estructura micelar formada por una mezcla de dos o más compuestos diferentes, al menos uno de los cuales es un compuesto anfifílico capaz de formar una estructura micelar. El término micelas mezcladas, por tanto, incluye en su significado también micelas formadas por al menos un compuesto, preferiblemente un compuesto anfifílico, que en general es incapaz de formar una estructura micelar cuando se dispersa como tal en un soporte acuoso, pero que es capaz de formar dicha estructura cuando se usa en combinación con cantidades adecuadas de un compuesto anfifílico formador de micelas. Los ejemplos de micelas mezcladas son micelas formadas por fosfolípidos sin modificar (que en general no son capaces de formar micelas cuando se dispersan como el único material en un soporte acuoso) y por un compuesto formador de micelas (por ejemplo, fosfolípido modificado por PEG o una sal de ácido graso). Como se sabe en la técnica, las micelas están formadas por moléculas anfifílicas dispersadas en agua cuando la concentración de estas moléculas supera un valor predeterminado conocido como CMC (concentración micelar crítica). A concentraciones por debajo de la CMC, las moléculas en general están dispersadas en la solución acuosa como moléculas individuales. Por encima de la CMC, las moléculas anfifílicas tienden a organizarse en estructuras supramoleculares, en equilibrio con las moléculas libres en la solución, dichas estructuras se caracterizan por el hecho de que la cola hidrofóbica (lípido) de la molécula se dispone hacia la parte interna de la estructura mientras que el grupo de cabeza hidrofílico (polar o iónico) de la molécula se dispone en la parte externa de la estructura. La CMC de una molécula anfifílica se puede determinar experimentalmente usando métodos estándar en la técnica. Por ejemplo, la CMC de un tensioactivo se puede determinar representando una propiedad como una función de la concentración del tensioactivo. La propiedad habitualmente varía linealmente con el aumento de la concentración del tensioactivo hasta la CMC, y después de esta concentración, la curva (o la propiedad) se vuelve no lineal. Las propiedades adecuadas que se pueden usar para la determinación de la CMC incluyen el índice de refracción, dispersión de luz, tensión de superficie, conductividad eléctrica, presión osmótica, y similares. Para el fin de la invención, los materiales formadores de micelas preferidos son los que tienen una CMC relativamente baja, por ejemplo de aproximadamente 10 mM o menos.

Las micelas típicamente tienen una dimensión comprendida desde aproximadamente 0,1 nm hasta aproximadamente 100 nm, preferiblemente desde aproximadamente 1 nm hasta aproximadamente 50 nm. El diámetro medio en número (D_N) es de aproximadamente 50 nm o menos, preferiblemente de aproximadamente 20 nm o menos y mucho más preferiblemente de 10 nm o menos, hasta por ejemplo, 1 nm, preferiblemente aproximadamente 2 nm.

Se puede encontrar una revisión de micelas, sistemas micelares y métodos de preparación de los mismos, por ejemplo, en libro de referencia: "Surfactants and Polymers in Drug Delivery", por M. Malmsten, Cap. 2, pp. 19-50, Marcel Dekker Inc. Ed., 2002).

Los materiales adecuados útiles para formar micelas que se van a asociar con microvesículas en un montaje de la invención se pueden seleccionar entre los materiales de lípidos y fosfolípidos previamente enumerados.

Los ejemplos de compuestos formadores de micelas son fosfolípidos modificados con PEG, incluyendo en particular fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG tal como DMPE-PEG2000, DMPE-PEG3000, DMPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DPPE-PEG2000, DPPE-PEG3000, DPPE-PEG4000, DPPE-PEG5000, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG3000, DSPE-PEG4000, DSPE-PEG5000, DAPE-PEG2000, DAPE-PEG3000, DAPE-PEG4000 o DAPE-PEG5000; sales de alquilamonio que comprenden al menos una cadena de alquilo de (C_{10} - C_{20}), preferiblemente de (C_{14} - C_{18}), tal como, por ejemplo, cloruro de estearilamonio, cloruro de hexadecilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); sales de amonio terciario o

cuaternario que comprenden una o preferiblemente dos cadenas de acilo de (C_{10} - C_{20}), preferiblemente (C_{14} - C_{18}), unidas al átomo de N a través de un puente de alquileo de (C_3 - C_6), tal como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP), 1,2-oleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (DSDAP); sales de ácido graso, preferiblemente alcalinas, en particular sales de sodio, tal como palmitato de sodio, estearato de sodio, oleato de sodio, linoleato de sodio, dodecanoato de sodio, sal sódica de 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerato o sal sódica de 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol.

También se pueden usar polímeros que incluyen partes hidrofóbicas e hidrofílicas en los mismos (también conocidos como "tensioactivos poliméricos") para preparar suspensiones micelares. Los ejemplos de tensioactivos poliméricos adecuados incluyen, sin limitación, de polietilenoóxidos (PEO), tal como de n-alkuil(C_8 - C_{16}) PEO monoéter, n-alkuil(C_8 - C_{10}) fenil PEO, tetrametilbutilfenil PEO, polisorbatos de PEO, estos PEO están vendidos bajo nombres comerciales de Brij®, Lubrol®, Triton®, Nonidet® o Tween®; copolímeros en bloque tal como copolímeros en bloque de óxido de etileno/óxido de propileno (por ejemplo, Pluronic® o Synperonic®), que tienen preferiblemente un MW desde aproximadamente 3000 a 20000 dalton, preferiblemente de 5000 a 150000 dalton; derivados de azúcar tal como alquil(C_6 - C_{10})- β -D-glucopiranosido, alquil(C_8 - C_{12})- β -D-maltósido; sulfonato de alquil(C_8 - C_{16})-dimetilamoniopropano; y ácidos biliares y derivados de los mismos, tal como colato de sodio o desoxicolato de sodio.

Los lípidos adicionales que se pueden usar para preparar una micela que se va a incluir en un montaje de la invención incluyen, por ejemplo, fosfolípidos sin modificar, tal como los previamente mencionados diésteres de ácidos grasos de fosfatidilcolina, etilfosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o esfingomiolina. Como estos fosfolípidos sin modificar en general son incapaces de formar estructuras micelares cuando se dispersan en un soporte acuoso (ya que estos compuestos tienden más bien a asociarse como liposomas cuando se dispersan en una solución acuosa), dichos fosfolípidos sin modificar preferiblemente se usan en mezcla con cualquiera de los compuestos formadores de micelas previamente mencionados. En particular, su cantidad debe ser preferiblemente menor de aproximadamente el 80%, más preferiblemente de aproximadamente el 70% o menos del peso total de la mezcla de componentes que forman la estructura micelar. Según una forma de realización preferida, el componente micelar está formado de una mezcla que comprende desde aproximadamente el 30% al 70%, preferiblemente desde aproximadamente el 40% al 60% en peso de fosfolípidos sin modificar. El resto de la mezcla puede ser cualquiera de los tensioactivos formadores de micelas anteriormente mencionados.

La carga neta global deseada se confiere a la micela por cualquiera de los compuestos positiva o negativamente cargados enumerados previamente, en particular lípidos o fosfolípidos, incluyendo fosfolípidos modificados.

Por tanto, los ejemplos de fosfolípidos adecuados para conferir una carga negativa global a la micela son derivados de fosfatidilserina, tal como DMPS, DPPS, DSPS; derivados de ácido fosfatídico, tal como DMPA, DPPA, DSPA; derivados de fosfatidilglicerol tal como DMPG, DPPG y DSPG. También se pueden usar fosfolípidos modificados, en particular, fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, tal como DMPE-PEG750, -PEG1000, -PEG2000, -PEG3000 o -PEG5000; DPPE-PEG750, -PEG1000, -PEG2000, PEG3000 o PEG5000; DSPE-PEG750, -PEG1000, -PEG2000, PEG3000 o PEG5000; DAPE-PEG750, -PEG1000, -PEG2000, PEG3000 o PEG5000; y las respectivas formas liso- de los fosfolípidos citados anteriormente, tal como derivados de lisofosfatidilserina (por ejemplo, liso-DMPS, -DPPS o -DSPS), derivados de ácido lisofosfatídico (por ejemplo, liso-DMPA, -DPPA o -DSPA) y derivados de lisofosfatidilglicerol (por ejemplo, liso-DMPG, -DPPG o -DSPG). Los ejemplos de lípidos cargados negativamente son sales de ácidos biliares tal como sales de ácido cólico, sales de ácido desoxicólico, sales de ácido glicocólico; y sales de ácidos grasos tal como, sal de ácido palmítico, sal de ácido esteárico, sal de 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerol o sal de 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol.

Preferiblemente, el compuesto negativamente cargado se selecciona entre DPPA, DPPS, DSPG, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG5000 o mezclas de los mismos.

El componente cargado negativamente típicamente se asocia con un contraión positivo correspondiente, que puede ser mono- (por ejemplo un metal alcalino), di- (por ejemplo, un metal alcalinotérreo) o trivalente (por ejemplo, aluminio). Preferiblemente el contraión se selecciona entre cationes de metal alcalino, tal como Li^+ , Na^+ o K^+ , más preferiblemente Na^+ .

Los ejemplos de fosfolípidos adecuados para conferir una carga positiva global a la micela son ésteres de fosfatidilcolinas, tal como 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (etil-DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (etil-DPPC). El contraión negativo es preferiblemente un ión de halógeno, en particular cloro o bromo. Los ejemplos de lípidos cargados positivamente son sales de alquilamonio que comprenden al menos una cadena de alquilo de (C_{10} - C_{20}), preferiblemente de (C_{14} - C_{18}), o amonio terciario o cuaternario que comprenden una o preferiblemente dos cadenas de acilo de (C_{10} - C_{20}), preferiblemente de (C_{14} - C_{18}), unidas al átomo de N a través de un puente de alquileo de (C_3 - C_6), tal como las previamente enumeradas.

Etil-DPPC, etil-DSPC, DSTAP o mezclas de los mismos se emplean preferiblemente como compuestos cargados positivamente.

El componente cargado positivamente típicamente se asocia con un correspondiente contraión negativo que puede ser mono- (por ejemplo, halógeno), di- (por ejemplo, sulfato) o trivalente (por ejemplo, fosfato). Preferiblemente, el contraión se selecciona entre iones de halógeno, tal como F⁻ (flúor), Cl⁻ (cloro) o Br⁻ (bromo).

Además, se pueden usar ventajosamente polímeros iónicos como los previamente enumerados entre los materiales que forman microglobos para formar una micela que tiene una carga neta (positiva o negativa) global.

Como anteriormente, las moléculas cargadas se pueden, en algunas formas de realización, mezclar con un compuesto anfifílico neutro, tal como los previamente enumerados (incluyendo fosfolípidos neutros), para formar la estructura micelar deseada. Los compuestos neutros preferidos para mezclar con los compuestos cargados enumerados anteriormente son tensioactivos poliméricos, tal como copolímeros en bloque de óxido de etileno-óxido de propileno, por ejemplo, Pluronic F68, Pluronic F108, Pluronic F-127 (Sigma Aldrich, Missouri, EE UU); éter de alquilo polioxietilado tal como Brij® 78 (Sigma Aldrich, Missouri, EE UU); éster de ácido graso y polioxietileno tal como Myrj® 53 o Myrj® 59 (Sigma Aldrich, Missouri, EE UU); éster de ácido graso y polioxietilensorbitano tal como Tween® 60 (Sigma Aldrich, Missouri, EE UU); polietilenglicol tert-octilfenil éter tal como Triton®X-100 (Sigma Aldrich, Missouri, EE UU); dodecilsulfato de sodio (SDS). Según una forma de realización de la invención, las micelas están formadas por mezclas de un compuesto anfifílico cargado con un fosfolípido neutro y uno o más de los compuestos neutros anteriormente enumerados.

En algunas formas de realización preferidas de la invención, la cantidad de tensioactivo cargado puede formar la sustancial totalidad de la micela (es decir, al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90% y más preferiblemente aproximadamente el 100% del peso total del material formador de micelas). En algunas otras formas de realización preferidas, en particular cuando al menos un compuesto que forma la micela es un fosfolípido sin modificar, la cantidad total de tensioactivo cargado que forma la micela es preferiblemente desde aproximadamente el 1% al 80%, más preferiblemente desde aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 50%.

Las micelas se pueden preparar como se sabe en la técnica dispersando los compuestos anteriores en un soporte líquido acuoso y opcionalmente agitando la mezcla. Los ejemplos de soportes líquidos adecuados son agua, solución salina (cloruro de sodio al 0,9%), solución salina tamponada con fosfato (10 mM, pH 7,4), tampón HEPES (20 mM, pH 7,4), glucosa al 5% p/p en agua. Por ejemplo, los compuestos anteriores se pueden dispersar en una concentración desde aproximadamente 1 a 100 mg/ml en un líquido acuoso y disolver por medio de agitación o sonicación.

Las micelas se pueden almacenar después como una dispersión acuosa (por ejemplo, en el soporte acuoso usado para su preparación) antes de mezclarlas con una suspensión que contiene microvesículas o (como se explica en detalle a continuación en la especificación) a una emulsión acuosa-orgánica de la que se preparan las microvesículas. Alternativamente, la suspensión de micelas se puede liofilizar según técnicas convencionales, para eliminar el líquido y almacenar el producto seco final para los usos posteriores.

Liposomas

Otra estructura supramolecular que se puede asociar como un CAM a una microvesícula en un montaje según la invención es un liposoma, en particular liposomas de vesícula unilamelar pequeña (SUV).

El término liposoma incluye sustancialmente agregaciones esféricas de compuestos anfifílicos, incluyendo compuestos lípidos, típicamente en forma de una o más capas concéntricas. Típicamente se forman en suspensiones acuosas y contienen al menos una bicapa de un compuesto anfifílico. Las cabezas hidrofílicas de los compuestos anfifílicos que forman la capa externa de la bicapa se dirigen hacia el exterior de la estructura esférica, mientras que las cabezas hidrofílicas de los compuestos anfifílicos que forman la capa interna de la bicapa se dirigen hacia el interior de dicha estructura esférica. El interior de la estructura esférica de los liposomas en general está lleno con el mismo líquido de la suspensión acuosa, opcionalmente contiene compuestos adicionales que no están presentes (o están presentes a un menor grado) en la suspensión acuosa externa.

Los materiales preferidos para preparar liposomas son fosfolípidos, tal como los enumerados previamente, opcionalmente en mezcla con cualquiera de los compuestos anfifílicos previamente enumerados.

Los liposomas SUV se pueden formar según técnicas convencionales, por ejemplo, procesando apropiadamente suspensiones de MLV (vesículas multilamelares grandes), por ejemplo, por ultrasonificación, extrusión o microfluidificación. Los MLV se pueden obtener, por ejemplo, disolviendo fosfolípidos en un solvente orgánico, evaporando el solvente orgánico al vacío para obtener una película de fosfolípido y por último hidratando la película a una temperatura por encima de la temperatura de transición del fosfolípido. Los MLV obtenidos se pueden por tanto exponer a radiaciones ultrasónicas para obtener los liposomas SUV deseados. Alternativamente, el MLV se puede extruir a través de una pluralidad de membranas (por ejemplo de policarbonato) con tamaño de poro decreciente (por ejemplo, 1,0, 0,8, 0,6, 0,4 y 0,2 µm) y después a través de un extrusor con dimensiones de poro menores (por ejemplo, LIPEX Biomembranes®, Canadá) para obtener el SUV final. Como un proceso de

preparación de SUV alternativo más, MLV se puede homogenizar a alta presión en un microfluidizador (por ejemplo, de Microfluidics Corporation), para reducir el tamaño del liposoma a aproximadamente 100 nm o menos, dependiendo de la cantidad de recirculación de los liposomas en el microfluidizador. Estos y otros métodos de preparación de SUV se divulgan, por ejemplo, en libro de referencia "Liposomes, a practical approach", editado por Roger R.C. New, Oxford University Press, 1989.

Las dimensiones de los liposomas SUV típicamente son desde aproximadamente 25 nm hasta aproximadamente 100 nm, preferiblemente desde aproximadamente 30 nm hasta aproximadamente 100 nm. El diámetro medio en número puede variar desde aproximadamente 30 nm hasta aproximadamente 60 nm, preferiblemente desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 50 nm.

También se da una revisión de liposomas y sus métodos de preparación en el libro de referencia anteriormente citado "Surfactants and Polymers in Drug Delivery", por M. Malmsten, Cap. 4, pp. 87-131, Marcel Dekker Inc. Ed., 2002).

Otras estructuras que se pueden asociar como un CAM a una microvesícula en un montaje de la invención incluyen nanopartículas coloidales, por ejemplo, nanopartículas de oro coloidales. Estas nanopartículas típicamente se obtienen añadiendo un agente dispersante adecuado a una solución acuosa que comprende nanopartículas sólidas sustancialmente insolubles, formando de esta manera una suspensión acuosa de nanopartículas coloidales (es decir, nanopartículas sólidas recubiertas con el agente dispersante). Por ejemplo, se pueden obtener nanopartículas de oro coloidales dispersando nanopartículas de oro (con un diámetro desde aproximadamente 2 a 50 nm) con citrato de sodio en una solución acuosa (véase, por ejemplo, Grabar, "Preparation and Characterization of Au colloid monolayers", Analytical Chemistry, vol. 67, p. 735, 1995). Las nanopartículas de oro coloidales asociadas con microvesículas rellenas de gas se pueden usar para aumentar la profundidad de penetración en un tejido seleccionado cuando se produce que dichas nanopartículas se disgreguen (por ejemplo, inducida por irradiación de ultrasonidos de alta energía controlada). Por tanto, un montaje que comprende nanopartículas de oro coloidales, por ejemplo, se puede asociar con un CAM adicional que comprende un agente bioactivo, para aumentar la profundidad de penetración de dicho agente bioactivo en el tejido seleccionado, aumentando de esta manera la eficacia del tratamiento terapéutico.

Se pueden formar CAM adicionales por nanopartículas poliméricas sólidas. Estas nanopartículas poliméricas sólidas pueden estar formadas por cualquiera de los materiales poliméricos previamente enumerados en relación con la preparación de microglobos rellenos de gas, que por tanto incluyen polímeros biodegradables fisiológicamente aceptables, tal como polisacáridos sustancialmente insolubles en agua (por ejemplo, quitosano o quitina), policianoacrilatos, polilactidas y poliglicolidas y sus copolímeros, copolímeros de lactidas y lactonas, tal como γ -caprolactona o δ -valerolactona, copolímeros de óxido de etileno y lactidas, polietileniminas, polipéptidos y proteínas tal como gelatina, colágeno, globulinas o albúminas. Otros polímeros adecuados son los mencionados en el documento anteriormente citado US 5.711.933 y previamente enumerados. Los polímeros no biodegradables en particular polímeros insolubles en agua, fisiológicamente aceptables y biorresistentes, también se pueden usar, preferiblemente en mezcla con cualquiera de los polímeros biodegradables anteriores. Dicho polímero puede ser, por ejemplo, una poliolefina, tal como poliestireno, una resina acrílica tal como poliácridatos de poliacrilonitrilo, un poliéster tal como policarbonato, poliuretano, poliurea y sus copolímeros. ABS (acril-butadieno-estireno) es un copolímero preferido.

Ligandos de direccionamiento y agentes bioactivos/diagnósticos

El CAM, en particular en forma de micelas, de un montaje según la invención, puede incluir ventajosamente en su estructura compuestos que tienen una actividad de direccionamiento, diagnóstica y/o biológica.

El ligando de direccionamiento incluido en el CAM puede ser sintético, semisintético o natural. Los materiales o sustancias que pueden servir como ligandos de direccionamiento incluyen, por ejemplo, pero no están limitadas a proteínas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas receptoras, moléculas que se unen a receptores, glucoproteínas y lectinas; péptidos, incluyendo oligopéptidos y polipéptidos; peptidomiméticos; sacáridos, incluyendo mono y polisacáridos; vitaminas; esteroides, análogos de esteroides, hormonas, cofactores, agentes bioactivos y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos.

Los ejemplos de dianas y ligandos de direccionamiento adecuados se divulgan, por ejemplo, en la patente en EE UU no. 6.139.819.

El ligando de direccionamiento puede ser un compuesto por sí que se mezcla con los otros componentes de la composición CAM que se va a incluir en la estructura final del CAM o puede ser un compuesto que se une a una molécula anfífilica empleada para la formación del CAM.

En una forma de realización preferida, el ligando de direccionamiento puede estar unido a una molécula anfífilica del CAM a través de un enlace covalente. En tal caso, la fracción reactiva específica que necesita estar presente en la molécula anfífilica dependerá del ligando de direccionamiento particular que se va a acoplar a la misma. Como

ejemplo, si el ligando de direccionamiento se puede unir a una molécula anfifílica a través de un grupo amino, las fracciones reactivas adecuadas para la molécula anfifílica pueden ser grupos isotiocianato (que formarán un enlace tiourea), ésteres reactivos (para formar un enlace amida), grupos aldehído (para la formación de un enlace imina que se va a reducir a un enlace alquilamina), etc.; si el ligando de direccionamiento se puede unir a la molécula anfifílica a través de un grupo tiol, las fracciones reactivas complementarias adecuadas para la molécula anfifílica incluyen derivados haloacetilo o maleimidas (para formar un enlace tioéter); y si el ligando de direccionamiento se puede unir a la molécula anfifílica a través de un grupo carboxílico, las fracciones reactivas adecuadas para la molécula anfifílica podrían ser amidas e hidracidas (para formar enlaces amida o alquilamida). Para unir covalentemente un ligando de direccionamiento deseado, al menos parte del compuesto anfifílico que forma el CAM debe, por tanto, contener una fracción reactiva adecuada y el ligando de direccionamiento que contiene la funcionalidad complementaria se unirá a la misma según técnicas conocidas, por ejemplo, añadiéndolo a una dispersión acuosa que comprende los componentes anfifílicos del CAM. El compuesto anfifílico se puede combinar con el ligando de direccionamiento deseado antes de preparar el CAM, y la combinación así obtenida se puede usar en el proceso de preparación del CAM. Alternativamente, el ligando de direccionamiento se puede unir al respectivo compuesto anfifílico durante el proceso de preparación del CAM o se puede unir directamente al compuesto anfifílico ya en una estructura micelar.

Según una forma de realización alternativa, el ligando de direccionamiento también se puede asociar apropiadamente al CAM a través de interacción física y/o electrostática. Como ejemplo, una fracción funcional que tiene alta afinidad y selectividad por una fracción complementaria se puede introducir en la molécula anfifílica, mientras que la fracción complementaria estará unida al ligando de direccionamiento. Por ejemplo, se puede unir covalentemente una fracción avidina (o estreptavidina) (que tiene afinidad por biotina) a un fosfolípido mientras que la fracción biotina complementaria se puede incorporar en un ligando de direccionamiento adecuado, por ejemplo, un péptido o un anticuerpo. El ligando de direccionamiento marcado con biotina por tanto se asociará al fosfolípido del CAM marcado con avidina por medio de un sistema de acoplamiento avidina-biotina. Alternativamente, tanto el fosfolípido como el ligando de direccionamiento pueden estar provistos de una fracción biotina y posteriormente acoplarse entre sí por medio de avidina (que es un componente bifuncional capaz de unir la dos fracciones de biotina). Los ejemplos de acoplamiento biotina/avidina de fosfolípidos y péptidos también se divulgan en el documento anteriormente citado US 6.139.819. Alternativamente, interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas y otros procesos de asociación pueden asociar o unir el ligando de direccionamiento a las moléculas anfifílicas.

Según una forma de realización alternativa, el ligando de direccionamiento puede ser un compuesto que se mezcla con los componentes que forman el CAM, que se van a incorporar finalmente en la estructura del CAM, tal como, por ejemplo, un lipopéptido como se divulga, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacionales WO 98/18501 o 99/55833.

Alternativamente, se puede producir primero un CAM, que comprende un compuesto que tiene una fracción adecuada capaz de interactuar con una fracción complementaria correspondiente de un ligando de direccionamiento; después de ello, el ligando de direccionamiento deseado se añade a la suspensión de CAM, para unirse a la fracción complementaria correspondiente en el CAM. Como una alternativa adicional, se puede preparar un montaje, que comprende un CAM que incluye un compuesto que tiene una fracción adecuada capaz de interactuar con una fracción complementaria correspondiente de un ligando de direccionamiento; después de ello, el ligando de direccionamiento deseado se añade a la suspensión del montaje, para unirse a la fracción correspondiente en el CAM.

Los ejemplos de dianas específicas adecuadas a las que el montaje se puede dirigir son, por ejemplo, fibrina y el receptor que se une 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. Los péptidos de unión adecuados se divulgan, por ejemplo, en el documento anteriormente citado US 6.139.819. Se divulgan más péptidos de unión adicionales específicos para direccionamiento a fibrina, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 02/055544.

Otros ejemplos de dianas importantes incluyen receptores en placas vulnerables y receptores específicos de tumor, tal como la región del dominio quinasa (KDR) y el complejo VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)/KDR. Los péptidos de unión adecuados para KDR o complejo VEGF/KDR se divulgan, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 03/74005 y WO 03/084574.

Los agentes bioactivos incluyen cualquier compuesto o material capaz de usarse en el tratamiento (incluyendo diagnóstico, prevención, mitigación, alivio del dolor o cura) de cualquier estado patológico en un paciente (incluyendo enfermedad, afección, lesión de enfermedad o lesión). Los ejemplos de agentes bioactivos son los previamente enumerados. Entre estos, se prefieren los fármacos o productos farmacéuticos, en particular esos fármacos que consisten en una molécula orgánica (típicamente una molécula sintética) que es sustancialmente hidrofóbica o que contiene una parte relevante de la misma que es sustancialmente hidrofóbica. Estas moléculas pueden de hecho incorporarse relativamente fácilmente en la estructura de un CAM, en particular de una micela, debido a su afinidad con la parte lipofílica (o hidrofóbica) del material anfifílico que forma el CAM. Por ejemplo, la

molécula orgánica se puede dispersar en el soporte acuoso que contiene el material anfífilo que forma el CAM, en particular la micela, donde se incorporará por afinidad en la parte hidrofóbica del CAM. Alternativamente, también se pueden incorporar fármacos o moléculas orgánicas hidrofílicas en el CAM, en particular cuando este último está en forma de un liposoma. En este caso, dicho compuesto hidrofílico preferiblemente estará contenido en la parte acuosa interna del liposoma.

Los ejemplos de fármacos que se pueden incorporar en o asociar la estructura del CAM son, por ejemplo, los mencionados en el documento anteriormente citado WO 99/53963, que incluyen, por tanto, agente antineoplásicos tal como vincristina, vinblastina, vindesina, busulfán, clorambucilo, espiroplatino, cisplatino, carboplatino, metotrexato, adriamicina, mitomicina, bleomicina, citosina arabinósido, arabinosil adenina, mercaptopurina, mitotano, procarbazona, dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, clorhidrato de doxorubicina, taxol, plicamicina, aminoglutetimida, estramustina, flutamida, leuprolida, acetato de megestrol, tamoxifeno, testolactona, trilostano, amsacrina (m-AMSA), asparraginas (Lasparaginas), etoposido, interferón α -2a y 2b, productos sanguíneos tal como hematóporfirinas o derivados de lo anterior; modificadores de respuesta biológica tal muramilpéptidos; agentes antifúngicos tal como cetoconazol, nistatina, griseofulvina, flucitosina, miconazol o amfotericina B; hormonas o análogos de hormonas tal como hormona de crecimiento, hormona estimulante de melanocitos, estradiol, dipropionato de beclometasona, betametasona, acetato de cortisona, dexametasona, flunisolida, hidrocortisona, metilprednisolona, acetato de parametasona, prednisolona, prednisona, triamcinolona o acetato de fludrocortisona; vitaminas tal como cianocobalamina o retinoides; enzimas tal como fosfatasa alcalina o manganeso superóxido dismutasa; agentes antialérgicos tal como amexanax; agentes anticoagulación tal como warfarina, fenprocumol o heparina; agentes antitrombóticos; fármacos circulatorios tal como propranolol; potenciadores metabólicos tal como glutatión; antituberculosos tal como ácido p-aminosalicílico, isoniazid, sulfato de capreomicina, ciclohexina, etambutol, etionamida, pirazinamida, rifampin o sulfato de estreptomina; antivirales tal como aciclovir, amantadina, azidotimidina, ribavirina o vidarabina; agentes dilatantes de los vasos sanguíneos tal como diltiazem, nifedipina, verapamil, tetranitrato de eritritol, dinitrato de isosorbida, nitroglicerina o tetranitrato de pentaeritritol; antibióticos tal como dapsona, cloranfenicol, neomicina, cefaclor, cefadroxil, cefalexina, cefradina, eritromicina, clindamicina, lincomicina, amoxicilina, ampicilina, bacampicilina, carbenicilina, dicloxacilina, ciclacilina, picloxacilina, hetacilina, meticilina, nafcilina, penicilina o tetraciclina; antiinflamatorios tal como diflunisal, ibuprofeno, indometacina, meclufenamato, ácido mefenámico, naproxeno, fenilbutazona, piroxicam, tolmetina, aspirina o salicilatos; antiprotozoos tal como cloroquina, metronidazol, quinina o antimonato de meglumina; antirreumáticos tal como penicilamina; narcóticos tal como paregórico; opiáceos tal como codeína, morfina u opio; glucósidos cardíacos tal como deslanesido, digitoxina, digoxina, digitalina o digitalis; bloqueantes neuromusculares tal como mesilato de atracurio, trietoduro de galamina, bromuro de hexafluorenio, yoduro de metocurina, bromuro de pancuronio, cloruro de succinilcolina, cloruro de tubocurarina o bromuro de vecuronio; sedantes tal como amobarbital, amobarbital sódico, propobarbital, butobarbital sódico, cloral hidrato, etclorvinol, etinamato, clorhidrato de flurazepam, glutetimida, clorhidrato de metotrimetoprima, metiprilon, clorhidrato de midazolam, paraldehído, pentobarbital, secobarbital sódico, talbutal, temazepam o triazolam; anestésicos locales tal como bupivacaína, clorprocaína, etidocaína, lidocaína, mepivacaína, procaína o tetracaína; anestésicos generales tal como droperidol, etomidato, citrato de fentanilo con droperidol, clorhidrato de ketamina, metohexital sódico o tiopental y sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales de adición ácida tal como el clorhidrato o bromhidrato o sales básicas tal como sales de sodio, calcio o magnesio) o derivados (por ejemplo, acetatos) de los mismos; y radioquímicos, por ejemplo, que comprenden emisores alfa, beta, o gamma tal como, por ejemplo, ^{177}Lu , ^{90}Y o ^{131}I . De particular importancia son los agentes antitrombóticos tal como heparina y agentes con actividad similar a heparina tal como antitrombina III, dalteparina y enoxaparina; inhibidores de agregación de plaquetas tal como ticlopidina, aspirina, dipiridamol, iloprost y abciximab; y enzimas trombolíticas tal como estreptoquinasa y activador del plasminógeno. Otros ejemplos de agente bioactivo incluyen material genético tal como ácidos nucleicos, ARN, y ADN de origen natural o sintético, incluyendo ARN y ADN recombinantes. Como se ha mencionado en la patente anterior, se puede usar ADN que codifica ciertas proteínas en el tratamiento de muchos tipos diferentes de enfermedades. Por ejemplo, se pueden proporcionar factor de necrosis tumoral o interleuquina-2 para tratar cánceres avanzados; se puede proporcionar timidina quinasa para tratar cáncer ovárico o tumores cerebrales; se puede proporcionar interleuquina-2 para tratar neuroblastoma, melanoma maligno o cáncer de riñón; y se puede proporcionar interleuquina-4 para tratar cáncer.

Los agentes diagnósticos que se pueden incorporar en o asociar al CAM en un montaje de la invención son cualquier compuesto, composición o partícula que puede permitir el aumento en imagenología en relación a técnicas diagnósticas incluyendo, resonancia magnética, rayos X, en particular tomografía computarizada, imagenología óptica, imagenología nuclear o imagenología molecular. Los ejemplos de agentes diagnósticos adecuados son, por ejemplo, nanopartículas de magnetita, compuestos yodados, tal como Iomprol®, o complejos iónicos paramagnéticos, tal como complejos de gadolinio hidrofóbico. Por ejemplo, se pueden mezclar nanopartículas de magnetita con un material anfífilo cargado negativamente (y opcionalmente uno neutro), tal como los previamente mencionados, para estabilizar dichas partículas y mantenerlas dispersas en una solución acuosa. El documento US 5.545.395 da algunos ejemplos de preparación de dichas partículas de magnetita estabilizadas, por ejemplo, usando una mezcla de DPPA y Pluronic® para estabilizar dichas partículas. Alternativamente, se pueden mezclar complejos de gadolinio con compuestos formadores de micelas adecuados, por ejemplo, como se divulga en la patente europea EP 804 251 para formar un CAM que contiene gadolinio.

El montaje

Para evaluar las composiciones relativas de los montajes de la invención, el solicitante ha encontrado útil referirse a las cantidades de compuestos cargados en la microvesícula y en el CAM (expresado como "equivalentes de carga") y al potencial ζ de las suspensiones de microvesículas y montajes.

5 El término "equivalente de carga" (EC), indica el número de cargas por mol de dicho compuesto. Por tanto, un mol de un compuesto monoiónico contiene un EC, un mol de un compuesto diiónico contiene dos EC y así sucesivamente.

10 El potencial ζ (potencial zeta), también llamado potencial electrocinético, es el potencial eléctrico en la superficie de una partícula coloidal relativo al potencial en el medio de carga a una distancia larga. Se puede medir según métodos analíticos de microelectroforesis convencionales, por ejemplo, mediante la determinación de la velocidad de las partículas en un campo eléctrico conductor por anemometría láser Doppler. Por ejemplo, se puede usar ventajosamente el ZetaSizer 3000 Has (Malvern Instrument GmbH). En la práctica, el potencial ζ de la suspensión
 15 inicial de microvesículas se determina primero, que puede tener un valor positivo o negativo, dependiendo de si las microvesículas contienen compuestos cargados positiva o negativamente, respectivamente. A continuación, se mide el potencial ζ en la suspensión final que contiene el montaje (es decir, después de los necesarios pasos de lavado para eliminar los CAM posiblemente no unidos). En general, la adición de CAM de signo opuesto con respecto a las microvesículas determina una disminución más o menos pronunciada en el valor absoluto del potencial ζ de la suspensión. En particular, las suspensiones que comprenden microvesículas cargadas positivamente mostrarán una
 20 disminución del potencial ζ tras la adición de una suspensión de CAM cargados negativamente, mientras que las suspensiones que comprenden microvesículas cargadas negativamente mostrarán un aumento relativo del potencial ζ (es decir, una disminución en el valor absoluto) tras la adición de una suspensión de CAM cargados positivamente. Como ha observado el solicitante, los montajes preferidos son esas suspensiones que muestran una disminución sustancial en valor absoluto con respecto al potencial ζ de la suspensión inicial de microvesículas, es decir, una
 25 disminución de al menos el 50%, preferiblemente de al menos el 75% y más preferiblemente de al menos el 90% de dicho valor inicial. Las suspensiones de montajes particularmente preferidas son esas que muestran un potencial ζ sustancialmente neutro (es decir, 0 ± 10 mV, correspondiente a un descenso absoluto de aproximadamente el 100% con respecto al potencial inicial de la suspensión de microvesículas) o un potencial ζ opuesto en signo con respecto al potencial ζ de la suspensión inicial de microvesículas. Como ha observado el solicitante, cuando el potencial ζ de la suspensión del montaje permanece igual en signo con una disminución absoluta de menos del 50% con respecto al potencial ζ de las suspensiones iniciales de microvesículas, esto puede ser una indicación de que se han asociado un número insuficiente de CAM a las microvesículas.

35 Según una forma de realización preferida, la cantidad de CAM cargados en el montaje es tal que confiere un potencial ζ sustancialmente neutro a dicho montaje o un potencial ζ que es opuesto en signo con respecto al potencial ζ de la microvesícula. Como ha observado el solicitante, para obtener dicho potencial ζ neutro u opuesto en signo del montaje, sin embargo, no es necesario que el montaje contenga un exceso de equivalentes de carga del CAM. En realidad, se ha observado que los montajes compuestos de microvesículas positivas y CAM negativos
 40 y que tienen una proporción entre el EC en el CAM y equivalentes de carga opuesta en la microvesícula de aproximadamente 1:5 (es decir, un exceso de aproximadamente 5 veces de cargas positivas en las microvesículas) puede no obstante mostrar un potencial ζ neutro o negativo. Aunque sin querer estar unido a ninguna teoría particular, se puede suponer que las cargas (negativas) comprendidas en los CAM se disponen en la superficie externa del montaje; si el número de CAM asociados a las microvesículas es suficientemente alto, el exceso de cargas opuestas (positivas) en la microvesícula puede resultar, al menos parcialmente, ocultado por dichos CAM. Por tanto, como el potencial ζ medido en una partícula está fuertemente influido por las cargas presentes en el límite externo de dicha partícula, incluso un montaje que tiene un exceso de equivalentes de carga (positivos) que deriva de una microvesícula puede mostrar un potencial ζ negativo, si la cantidad de CAM cargados (negativamente) es
 45 suficiente para ocultar parcialmente las cargas (positivas) de la microvesícula. Todo lo anterior es por supuesto también aplicable a montajes formados por microvesículas cargadas negativamente y CAM cargados positivamente.

50 En general, la proporción entre el EC en las microvesículas y el EC de carga en el CAM en la suspensión final del montaje puede variar desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10. Según una forma de realización preferida, la proporción de EC microvesícula/CAM en el montaje formado es preferiblemente de aproximadamente
 55 3:1 o menos, más preferiblemente de aproximadamente 2:1 o menos y mucho más preferiblemente de aproximadamente 3:2 o menos. Dependiendo de la cantidad de compuestos cargados que forman las microvesículas y los CAM, dicha proporción puede, por supuesto, ser menor, por ejemplo, de aproximadamente 1:1 y hasta por ejemplo, aproximadamente 1:4 o menos.

60 En vista de las dimensiones relativamente pequeñas del CAM, las dimensiones (diámetro medio en número) del montaje típicamente son de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ o menores y en general de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ o más. La dimensión preferida de un montaje según la invención son desde aproximadamente $1 \mu\text{m}$ hasta aproximadamente $8 \mu\text{m}$, más preferiblemente desde aproximadamente $2 \mu\text{m}$ hasta aproximadamente $5 \mu\text{m}$.

65 Según una forma de realización adicional de la invención, se pueden formar montajes multicapa asociando una microvesícula rellena de gas a una pluralidad de capas de componentes, que tienen una carga alterna. Por tanto,

- por ejemplo, es posible asociar a una microvesícula cargada negativamente una primera capa de componentes (por ejemplo, micelas) que tienen una carga positiva; después una segunda capa de componentes (por ejemplo, de nuevo micelas o liposomas) que tienen una carga negativa se puede asociar a este montaje, y así sucesivamente. Mientras que la asociación de la primera capa de componentes a las microvesículas producirá una reducción en el valor absoluto del potencial ζ (con respecto al medido en una suspensión de las microvesículas solas), la asociación adicional de una segunda capa de componentes (que tiene una carga opuesta con respecto al primer componente) producirá que el potencial ζ cambie de nuevo hacia valores más próximos a los de la suspensión de microvesículas solas.
- Según un primer método de preparación, el montaje se puede obtener mezclando una suspensión acuosa que comprende las microvesículas (obtenida según cualquiera de los métodos de producción citados anteriormente) con una suspensión acuosa que comprende el segundo componente del montaje (obtenida según cualquiera de los métodos de producción citados anteriormente).
- Opcionalmente, la mezcla así obtenida se puede someter a uno o más pasos de lavado, para eliminar el exceso de componentes no asociados. El lavado se puede realizar con cualquier técnica de lavado convencional, usando soluciones de lavado adecuadas, tal como agua destilada, solución salina tamponada con fosfato, tampón Tris/glicerol, solución salina o solución de glucosa al 5%. La fase de la mezcla lavada que comprende el montaje de la invención (en general la fase sobrenadante) por tanto se separa y recoge; opcionalmente, la suspensión que contiene el montaje recuperada se diluye finalmente antes del uso, por ejemplo, con cualquiera de los soportes fisiológicamente aceptables citados anteriormente.
- Tras la formación, la suspensión que comprende el montaje de la invención se puede almacenar para una administración posterior o se puede administrar directamente. Si se desea, el soporte líquido de la suspensión se puede eliminar (por ejemplo, por liofilización) para obtener un polvo seco del montaje que se puede almacenar (preferiblemente en presencia de un gas adecuado para formar las microvesículas rellenas de gas tras la reconstitución) durante periodos de tiempo relativamente largos antes de la reconstitución.
- Alternativamente, los dos componentes del montaje se pueden almacenar como composiciones separadas en forma seca (por ejemplo, liofilizada) y reconstituir como una suspensión antes de la administración. Para el almacenamiento, los componentes secos se mantienen preferiblemente en una atmósfera del gas que formará las microvesículas tras la reconstitución con agua. La reconstitución con un soporte líquido acuoso puede tener lugar por separado en las dos composiciones secas que comprenden los respectivos componentes del montaje, obteniéndose de esta manera os suspensiones separadas que se mezclan posteriormente para obtener la suspensión de montaje deseada. Alternativamente, las dos composiciones secas se pueden mezclar y después reconstituir como una única suspensión en un soporte líquido acuoso. En este último caso, los componentes mezclados del montaje se almacenan en presencia del gas que formará las microvesículas tras la reconstitución con el soporte líquido acuoso. Según una forma de realización preferida, la composición de CAM seca se reconstituye primero con un soporte acuoso fisiológicamente aceptable y la suspensión obtenida se usa después para reconstituir la composición de microvesículas seca, para obtener por último una suspensión del montaje.
- Cualquiera de los métodos de preparación anteriores también se puede usar para preparar un montaje multicapa como se ha descrito anteriormente, mezclando primero la microvesículas rellenas de gas cargadas con un primer componente que tiene una carga opuesta y después mezclando el montaje formado con un segundo componente que tiene la misma carga que las microvesículas.
- Para la preparación del montaje a partir de dos preparaciones separadas de microvesículas y CAM, puede ser ventajoso añadir una cantidad en exceso de CAM con respecto a la cantidad relativa de CAM que se desea en el montaje final, en particular porque una cierta cantidad de dichos CAM se puede eliminar durante los pasos de lavado opcionales de la suspensión de los montajes. En general, se prefiere que la cantidad de EC en la composición empleada para la preparación del CAM sea al menos sustancialmente igual al EC en la composición empleada para la preparación de las microvesículas (es decir, proporción de EC de aproximadamente 1:1). Preferiblemente dicha proporción de EC es de aproximadamente 2:1 o mayor, más preferiblemente de al menos aproximadamente 3:1 o mayor, hasta, por ejemplo, 30:1.
- Según una forma de realización preferida, una suspensión acuosa de un CAM (en particular de micelas como se ha definido anteriormente) se añade a una emulsión acuosa/orgánica que comprende un fosfolípido y un agente lioprotector, preparada según el método divulgado en el documento anteriormente citado WO 04/069284. En este caso, los CAM cargados se asociarán con la capa de carga opuesta de material anfífilico que rodea las microgotitas de la emulsión. El CAM se añade generalmente en una cantidad tal que la proporción entre los equivalentes de carga en el CAM y el EC en las microvesículas de la suspensión sea de al menos aproximadamente 1:2 o mayor, preferiblemente 2:3 o mayor y mucho más preferiblemente de al menos 1:1 o mayor, hasta, por ejemplo 10:1. Similarmente, una suspensión acuosa de CAM se puede añadir a una dispersión de microburbujas que se ha obtenido sometiendo un medio acuoso que comprende un fosfolípido (y opcionalmente otros compuestos anfífilicos formadores de película y/o aditivos) a una energía de alta agitación controlada en presencia de un gas deseado, como se ha mencionado previamente.

La liofilización de la mezcla proporciona el montaje deseado como un polvo liofilizado, que se puede almacenar en contacto con el gas deseado y posteriormente reconstituir como una suspensión fisiológica mediante adición de un soporte acuoso.

5 El gas en contacto con los productos liofilizados almacenados (montaje, microvesículas y/o CAM) puede estar presente en el envase de almacenamiento a una presión sustancialmente atmosférica (es decir, aproximadamente 1020 mbar +/- 5%) o a una presión menor que la atmosférica (por ejemplo, 900 mbar o menor) como se divulga en la solicitud de patente europea EP 1228770.

10 Las composiciones inyectables tras la reconstitución del agente de contraste liofilizado deben ser, tanto como sea posible, isotónicas con la sangre. Por tanto, antes de la inyección, también se pueden añadir pequeñas cantidades de agentes isotónicos a las suspensiones que comprenden el montaje de la invención. Los agentes isotónicos son soluciones fisiológicas comúnmente usadas en medicina tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (NaCl al 0,9%), solución de glicerol al 2,6% o solución de dextrosa al 5%. La reconstitución de las suspensiones acuosas generalmente se obtiene por simple disolución del tensioactivo formador de película seco almacenado en gas y agitación suave.

15 El volumen y las concentraciones del líquido de reconstitución deseablemente puede estar equilibrado para hacer las formulaciones listas para usar resultantes sustancialmente isotónicas. Por tanto, el volumen y la concentración del líquido de reconstitución elegido dependerá del tipo y cantidad de estabilizador (y otros agentes de carga) presente en el producto liofilizado).

20 Como apreciarán los expertos en la materia, el montaje según la invención permite una extrema flexibilidad en la preparación de diferentes montajes para diferentes fines. En realidad, la estructura del componente soporte básico empleado para los métodos de diagnóstico por ultrasonido/terapéutico (es decir, las microvesículas) no necesita someterse a ninguna modificación particular, evitando de esta manera posibles desventajas en términos de estabilidad de dicho componente. Tal componente solo necesita tener una carga neta global en su envoltura, resultado que se puede obtener fácilmente usando materiales convencionales normalmente usados para formar dicha envoltura. En realidad, la interacción electrostática entre la microvesícula y el CAM permite una asociación eficaz entre los dos componentes, sin la necesidad de modificar la estructura de la microvesícula. Por otra parte, el segundo componente del montaje, cuya estabilidad es mucho menos sensible a posibles modificaciones de su composición, se puede adaptar fácilmente al fin específico requerido para el montaje, asociando el ligando de direccionamiento y/o compuesto bioactivo deseado a él. Además, debido a las dimensiones relativamente pequeñas del CAM con respecto a la microvesícula, es posible asociar un número relativamente grande de CAM a cada microvesícula, aumentando de esta manera la eficacia del sistema.

25 Además, las microvesículas del montaje se pueden asociar fácilmente con más de un tipo de diferentes nanocomponentes, produciendo de esta manera un montaje "multiuso". En particular, una única preparación de microvesículas cargadas (por ejemplo, cargadas positivamente) se puede usar como soporte que se va a asociar con cualquier tipo deseado de CAM que tiene una carga opuesta (por ejemplo, negativa). Alternativamente, también se puede obtener un montaje multiuso preparando un montaje multicapa como se ha descrito previamente, donde los diferentes componentes de carga opuesta se disponen como capas alternas alrededor de la microvesícula. Los diferentes CAM asociados a la microvesícula se pueden diferenciar en su composición química o estructura supramolecular (por ejemplo, micelas frente a liposomas), así como en el ligando de direccionamiento, agente diagnóstico y/o agente bioactivo contenido en el mismo; ventajosamente, un montaje multiuso contendrá una combinación de cualquiera de estos. Por ejemplo, el componente microvesícula se puede combinar con un primer nanocomponente (por ejemplo, en forma micelar), que comprende en su estructura al menos un ligando de direccionamiento (capaz de unirse a un receptor específico asociado a un estado patológico o enfermedad), y con un segundo nanocomponente (por ejemplo, en forma micelar o como un liposoma), que comprende bien un segundo ligando de direccionamiento o un compuesto bioactivo (por ejemplo, un compuesto terapéutico para tratar dicho estado patológico o enfermedad). Cuando se emplea un montaje que comprende una combinación de un "componente que tiene un ligando de direccionamiento" y de un "componente que tiene un compuesto bioactivo", particularmente cuando se prepara un montaje "multicapa", el componente que tiene el ligando de direccionamiento preferiblemente se asocia por separado como el último componente a la microvesícula rellena de gas, para permitir una actividad de direccionamiento eficaz del montaje. Un ejemplo de un montaje multiuso es, por ejemplo, un montaje que comprende una microvesícula rellena de gas, un primer componente en forma micelar, que comprende un ligando de direccionamiento que se une a un receptor específico de tumor, y un segundo componente que comprende un compuesto radioquímico (unido a un compuesto formador de micelas o incorporado en un liposoma) para el tratamiento terapéutico del tumor.

Por tanto, un montaje de la invención se puede usar para una variedad de métodos diagnósticos y/o terapéuticos.

65 Por ejemplo, un montaje que comprende un CAM con un ligando de direccionamiento adecuado se puede usar para dirigirse a un órgano o tejido específico, del que después se pueden obtener imágenes selectivamente según técnicas de ecografía convencionales, debido a la imagenología aumentada determinada por la microvesículas

rellenas de gas unidas a dicho órgano o tejido. Si se incluye un agente diagnóstico adicional (por ejemplo, para IRM) en el montaje, el uso combinado de técnicas diagnósticas es posible. Además, si se incluye un agente bioactivo en el montaje (por ejemplo, incluido en un liposoma), es posible provocar una liberación mediada por ultrasonido de dicho agente bioactivo en una diana seleccionada (por ejemplo, donde se une un ligando de direccionamiento) aplicando una fuerza acústica controlada capaz de destruir las microvesículas rellenas de gas, como se divulga, por ejemplo, en el documento WO 99/39738.

Por supuesto, un montaje de la invención también puede contener, junto con los componentes que tienen un ligando de direccionamiento o un agente farmacéutico activo, también componentes que están libres de dichos compuestos, que se emplean, por ejemplo, para equilibrar la carga global del montaje.

Como se ha mencionado previamente, también se ha observado que la asociación de un componente, en particular de una pluralidad de micelas, a una microvesícula rellena de gas para formar un montaje según la invención, produce una resistencia aumentada de dichas microvesículas hacia la presión. Por ejemplo, se ha observado que las microvesículas que muestran una P_{C50} (es decir, una presión crítica a la que más del 50% de la población de microvesículas se destruye) de aproximadamente 500 mm Hg, puede aumentar dicho valor de P_{C50} a al menos 600 mm Hg y hasta aproximadamente 800 mm Hg, cuando se asocia con diferentes tipos de micelas para formar un montaje de la invención.

Kit

Otro aspecto de la invención se refiere a kits diagnósticos que comprenden el montaje de la invención o sus respectivos compuestos separados, que opcionalmente comprenden además el soporte líquido acuoso.

Según una primera forma de realización, dicho kit es un kit de dos componentes que comprende el montaje de la invención junto con un soporte líquido acuoso. Dicho kit de dos componentes puede incluir dos envases separados o un envase de cámara dual.

En el primer caso el primer envase es preferiblemente un vial sellado con tabique convencional, en donde el vial que contiene el montaje como un residuo liofilizado (obtenido según cualquiera de los métodos ilustrados anteriormente) en contacto con el gas deseado está sellado con un tabique a través del cual el líquido soporte se puede inyectar para reconstituir la suspensión de los montajes microvesículas/CAM. El líquido soporte está contenido en un segundo envase que preferiblemente toma la forma de una jeringa. La jeringa preferiblemente se rellena con la suspensión reconstituida y se usa posteriormente para administrar el agente de contraste por inyección. En lugar del montaje formado, el primer envase puede contener alternativamente una mezcla de composiciones de CAM y microvesículas liofilizadas separadamente, que formarán el montaje deseado tras la reconstitución con el soporte acuoso. Aunque en general agitar a mano el envase proporciona la energía deseada para reconstituir la suspensión, se pueden proporcionar medios para dirigir o permitir la aplicación de suficiente energía hacia el envase (por ejemplo, un mezclador Vortex), para asegurar la reconstitución adecuada de la suspensión de los montajes. El envase de cámara dual es preferiblemente una jeringa de cámara dual, donde los componentes se mantienen separados, por ejemplo, por medio de un tabique eliminable, y una vez se ha reconstituido el liofilizado por agitación suave, el envase se puede usar directamente para inyectar el agente de contraste. Como antes, se pueden proporcionar medios para dirigir o permitir la aplicación de suficiente energía hacia el envase.

El experto en la materia puede apreciar que otros sistemas de reconstitución de dos cámaras capaces de combinar el polvo seco con la solución acuosa de una manera estéril también están dentro del ámbito de la presente invención. En tales sistemas, es particularmente ventajoso si la fase acuosa se puede interponer entre el gas insoluble en agua y el medio ambiente, para aumentar el periodo de validez del producto.

Según otra forma de realización, un kit según la invención es un kit de al menos dos componentes que comprende una composición de CAM, una composición de microvesículas y, opcionalmente, un soporte acuoso.

Estos preferiblemente se presentan como al menos dos envases separados, el primero contiene la composición de microvesículas liofilizada (por ejemplo, en contacto con un gas deseado) y el segundo contiene la composición de CAM liofilizada deseada (opcionalmente en contacto con un gas deseado o al vacío). Un tercer envase opcional, que contiene el soporte acuoso para la reconstitución se puede incluir ventajosamente en el kit. Si se desea, envases adicionales que contienen composiciones de CAM liofilizadas adicionales se pueden incluir en el kit. Para la administración, la suspensión de CAM se reconstituye primero en el soporte acuoso y la suspensión obtenida se usa después para reconstituir la composición de microvesículas, formando de esta manera la suspensión del montaje deseado.

No se requieren envases, viales o sistemas de conexión específicos; la presente invención puede usar envases, viales y adaptadores convencionales. El único requisito es un buen sello entre el tapón y el envase. La calidad del sello, por tanto, se convierte en asunto de principal interés; cualquier degradación de la integridad del sello podría permitir que sustancias indeseables entraran en el vial. Además de asumir esterilidad, la retención del vacío es esencial para productos tapados a presiones ambiente o reducida para asegurar la reconstitución segura y

apropiada. El material del tapón que forma el sello de gas del envase es preferiblemente un compuesto elastomérico o formulación multicomponente basada en un elastómero tal como poli(isobutileno) o goma de butilo. Convenientemente se puede usar un tapón de goma de butilo de Daiko Seiko Ltd.

5 Ejemplos

Los siguientes materiales se emplean en los ejemplos:

PBS	Solución salina tamponada con fosfato: fosfato de sodio 10 mM, NaCl al 0,9% p/p, pH = 7,4
tampón Tris	Solución salina tamponada con Tris: Tris (hidroximetil)aminometano 10 mM, NaCl al 0,9%, pH = 7,4
tampón HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfónico (20 mM) y NaCl (150 mM), pH = 7,4
tampón Tris glicerol	Tris (hidroximetil)aminometano 1 g/l y glicerol 0,3 M, pH = 7,2
marcador DIO18	3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (Molecular Probes Inc., EE UU)
Gd-DTPA-(SE) ₂	Éster diestearoil del complejo gadolinio-ácido dietilentriaminopentaacético (preparado según G. W. Kabalka et al., Magnetic resonance in Medicine 8 (1988), 89-95)
DSPG	Diestearoilfosfatidilglicerol sal sódica (Genzyme) IUPAC: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]
DAPC	Diaraquidoilfosfatidilcolina (Avanti polar Lipids) IUPAC: 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSTAP	Cloruro de 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (Avanti Polar Lipids)
DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina (Genzyme) IUPAC: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPG	Dipalmitoilfosfatidilglicerol sal sódica (Genzyme) IUPAC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]
DPPA	Sal sódica del ácido dipalmitoilfosfatídico (Genzyme) IUPAC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina (Genzyme) IUPAC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSEPC	Diestearoilfosfatidilcolina (Avanti Polar Lipids) IUPAC: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina
NaDOC	Desoxicolato de sodio (Fluka)
DSPE-PEG2000	Diestearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG2000, sal sódica (Nektar Therapeutics)
Etil-SPC3	etilfosfocolina de soja: mezcla 4:1 (p/p) de etil-DSPC y etil-DPPC
DPPE-cap-biotina	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(cap-biotinilo) sal sódica (Avanti Polar Lipids)
PEG4000	Poli(etilenglicol), MW = 4000 (Fluka)
Pluronic 68	Copolímero en bloque de óxido de etileno/óxido de propileno (Fluka)
C ₄ F ₁₀	Perflurobutano

10 Las dimensiones y concentración de microvesículas se determinan usando un contador Coulter Multisizer (apertura: 30 µm).

Los potenciales ζ de las suspensiones de microvesículas se determinan usando un Malvern Zetasizer 3000Hsa en NaCl 1 M.

15 Las dimensiones de las preparaciones de micelas se determinan usando un Malvern Zetasizer 3000Hsa.

Ejemplo 1

20 Preparación de microglobos cargados positivamente

Se disuelve tripalmitina (60 mg) en ciclohexano (0,6 ml) a 40°C. Esta fase orgánica se mantiene a 40°C hasta su emulsión. Se dispersan 40 mg de etil-SPC3 (fosfolípido catiónico) en 30 ml de agua destilada a 65°C durante 15 minutos y después la dispersión se deja enfriar a 40°C.

25 La fase orgánica se emulsiona en la fase acuosa usando un homogenizador Polytron® PT3000 (10000 rpm, 1 min). La emulsión se diluye después con 5 ml de PVA (200 mg, Mw: 9000 de Aldrich) en agua destilada, después se enfría a 5°C, se congela a -45°C durante 10 minutos y después se liofiliza (0,2 mbar, 24 h).

30 El liofilizado se redispersa en agua destilada (20 ml) en presencia de aire, los microglobos se lavan dos veces por centrifugación (600 g durante 10 min) con solución salina tamponada con fosfato y la suspensión final de microglobos (20 ml). La caracterización de tamaño para esta preparación dio los siguientes resultados: D_{V50} = 2,54 µm; D_N = 1,57 µm.

35 Ejemplo 1a

Preparación de microglobos cargados positivamente marcados con fluorescencia

Se repite el ejemplo 1 añadiendo el 5% en peso (con respecto al peso total de tripalmitina) de sonda fluorescente lipofílica DIO18 en la fase orgánica para marcar fluorescentemente el microglobo. La caracterización de tamaño para esta preparación dio los siguientes resultados: $D_{V50} = 2,38 \mu\text{m}$; $D_N = 1,45 \mu\text{m}$.

Ejemplos 2a-2ePreparación de microburbujas cargadas positivamente que contienen DSTAP

15 mg de una mezcla de DAPC y lípido catiónico DSTAP (véase la proporción relativa en la tabla 1) y 985 mg de PEG4000 se disuelven en tert-butanol (10 ml) a 50°C. La solución se muestraa en viales de 10 ml (50 mg de materia seca por vial) después se liofiliza en un liofilizador Christ Epsilon 2-12DS (-30°C, 0,56 mbar durante 24 h). Después de secado adicional (25°C, 0,1 mbar durante 5 horas), los viales se tapan con un tapón elastomérico y se sellan con precinto de aluminio.

Los liofilizados obtenidos se exponen al gas deseado (50:50 v/v de $\text{C}_4\text{F}_{10}/\text{N}_2$) y después se redispersan en 5 ml de solución tampón PBS obteniéndose de esta manera una suspensión de microburbujas cargadas positivamente. La caracterización de tamaño de las microburbujas resuspendidas se describe en la tabla 1.

Tabla 1: Microburbujas que contienen DSTAP

Ejemplo	Proporción molar DAPC/DSTAP	D_V	D_N
2a	99:1	8,57	3,11
2b	95:5	8,64	1,73
2c	90:10	8,80	1,77
2d	80:20	9,22	1,82
2e	50:50	8,51	1,94

Ejemplos 3a-3cPreparación de microburbujas cargadas negativamente

Se repite la preparación de los ejemplos 2a-2e sustituyendo la mezcla DAPC/DSTAP con la misma cantidad total (15 mg) de una mezcla DPPG/DSPC en diferentes cantidades relativas, como se indica en la tabla 2. La caracterización de tamaño de las microburbujas resuspendidas se describe en la tabla 2.

Tabla 2: Microburbujas que contienen DPPG

Ejemplo	Proporción molar DSPC/DPPG	D_V	D_N
3a	75:25	6,05	1,97
3b	50:50	12,97	1,97
3c	25:75	5,89	1,88

Ejemplo 4Preparación de microburbujas cargadas positivamente

Se dispersa DSTAP (200 mg) en 100 ml de agua que contiene el 5,4% (p/p) de una mezcla de propilenglicol y glicerol (3:10 p/p) a 80°C durante 5 minutos y después se enfría a temperatura ambiente.

La dispersión se transfiere a un reactor en atmósfera de C_4F_{10} y se homogeniza a 20000 rpm (Polytron PT3000) durante 10 minutos, manteniendo la pala mezcladora del rotor estator de modo que las aberturas están ligeramente por encima de la superficie del líquido. Las microburbujas obtenidas se lavan dos veces por centrifugación con agua, después se redispersan en una solución de dextrano al 7,5%.

La suspensión se muestraa en viales de 10 ml (2 ml por vial). Los viales se enfrían a -45°C y se liofilizan durante 24 horas, después se tapan, se sellan y se mantienen a temperatura ambiente. La caracterización de tamaño de las microburbujas resuspendidas en agua destilada fue como sigue: $D_{V50} = 4,04$; $D_N = 1,75$.

Ejemplo 5a-5dPreparación de micelas cargadas negativamente

Se dispersan 50 mg de Gd-DTPA-(SE)₂ (que contiene trazas de ¹⁵³Gd radioactivo) y 10 mg de NaDOC en glucosa acuosa al 5% (10 ml) usando una sonda de sonicación de 3 mm unida a un sonicador Branson 250 (salida: 30% durante 10 min), para obtener una suspensión acuosa de micelas aniónicas. La misma preparación se repite

dispersando diferentes cantidades de diferentes compuestos en el mismo volumen de solución de glucosa acuosa, como se indica en la siguiente tabla 3.

Tabla 3: micelas cargadas negativamente

Ejemplo	Gd-DTPA-(SE) ₂ (mg)	NaDOC (mg)	DPPE-Cap-Biotina (mg)	DPPA (mg)	Pluronic F68 (mg)
5a	50	10	-	-	-
5b	50	10	3,8	-	-
5c	-	-	-	16	16
5d	-	-	2,5	16	16

5

Ejemplo 6a-6f

Preparación de micelas cargadas negativamente que contienen DPPA

10 Se dispersan varias cantidades del fosfolípido aniónico DPPA y el fosfolípido neutro DPPC (como se indica en la tabla 4) junto con 16 mg de Pluronic F68 en 10 ml de PBS, usando una sonda de sonicación de 3 mm (sonicador Branson 250, salida: 30% durante 10 min). Se añade una pequeña cantidad de DPCC-H³ (aproximadamente 2,5 µCi por 10 ml de suspensión final) a la preparación de micelas como marcador radioactivo.

15 Después de la sonicación, la solución se filtra a través de filtros de 0,2 µm (Millipore). Después de enfriar a temperatura ambiente, se mide el tamaño de micela usando Malvern Zetasizer 3000HSA y la radioactividad específica se determina usando 50 µl de solución diluida en 10 ml de coctel LSC Hionic Fluor (Packard Biosciences) y se cuentan en un analizador de centelleo líquido Tricarb 2200A (Packard Biosciences).

20 **Tabla 4: micelas negativas que contienen DPPA**

Ejemplo	DPPC (mg)	DPPA (mg)	Proporción molar DPPA/DPPC	Pluronic F68 (mg)	Cantidad de DPPA (% p/p)
6a	17,62	0	-	16,0	-
6b	17,30	0,16	1:99	16,0	0,48
6c	17,26	0,32	2:98	16,0	0,95
6d	15,86	1,61	10:90	16,0	4,81
6e	8,80	8,00	50:50	16,0	24,39
6f	0,88	15,27	95:5	16,0	47,5

Ejemplo 7a-7b

Preparación de micelas cargadas negativamente que contienen DSPE-PGE

25 Se disuelven 20 mg de DSPE-PEG 2000 en 1 ml de cloroformo/etanol (1/1 v/v) a 60°C en un matraz de fondo redondeado y la mezcla de solvente se evapora al vacío, dejando una película fina en la pared interna del matraz. Esta película se seca adicionalmente durante la noche en una cámara de vacío. La película lipídica se hidrata después con 10 ml de tampón Hepes a 60°C durante 30 min. La solución se filtra después en filtros de 0,2 µm y se deja enfriar a temperatura ambiente antes de la caracterización. La solución filtrada se diluye en agua (proporción de dilución 1:3) y se analiza por Malvern Zetasizer 3000HSA para distribución de tamaño. Los resultados de dos preparaciones diferentes según el procedimiento anterior se resumen en la tabla 5.

30

Tabla 5

Ejemplo	D _v	D _N
7a	15	9,9
7b	10,4	4,4

35

Ejemplo 8

Preparación de micelas cargadas positivamente que contienen etil-SPC3

40 Se dispersan 16 mg de etil-SPC3 y 16 mg de Pluronic F68 en glucosa acuosa al 5% usando una sonda de sonicación de 3 mm unida a un sonicador Branson 250 (salida: 30% durante 10 min), para obtener una suspensión acuosa de micelas catiónicas.

Ejemplos 9a-9e

45

Preparación de micelas cargadas positivamente que contienen DSTAP

Se repite la preparación de los ejemplos 6a-6f sustituyendo DPPA cargado negativamente con DSTAP cargado positivamente. Las cantidades relativas de lípidos y fosfolípidos de las diferentes preparaciones se describen en la tabla 6.

5

Tabla 6: micelas cargadas positivamente que contienen DSTPA

Ejemplo	DPPC (mg)	DSTPA (mg)	Proporción molar DPPC/DSTPA	Pluronic F68 (mg)
9a	17,62	0	-	16,0
9b	17,44	0,17	99:1	16,0
9c	17,26	0,34	98:2	16,0
9d	15,86	1,69	90:10	16,0
9e	8,81	8,43	50:50	16,0

Ejemplo 10a-10b

Preparación de montajes con microglobos catiónicos y micelas aniónicas

10

Se mezcla la suspensión de microglobos del ejemplo 1 (1 ml) con diferentes cantidades en volumen (indicado en la tabla 7) de la preparación de micelas del ejemplo 5a o del ejemplo 5b, respectivamente. Después de 1 hora, la suspensión se lava dos veces con PBS por centrifugación (600 g durante 5 min) y se redispersa en PBS (1,2 ml). La cantidad de micelas unidas (expresada como el porcentaje de la radioactividad medida en la suspensión del montaje con respecto a la radioactividad medida en la preparación inicial de micelas) se determina midiendo la radioactividad de Gd¹⁵³ (cuentas gamma) de la suspensión, usando un instrumento Cobra II Autogamma (Packard Biosciences). Los resultados se dan en la tabla 7.

15

Tabla 7

	µl de micela/ml de microglobos	DV50 (µm)	DN (µm)	% de micelas unidas
Ejemplo 1	-	2,38	1,45	-
Ejemplo 10a (montaje con micelas no biotiniladas del ej. 5a)	2,5	2,69	1,66	100
	10	2,83	1,70	90,9
	25	2,81	1,71	91,4
	100	2,37	1,58	31,1
Ejemplo 10b (montaje con micelas biotiniladas del ej. 5b)	2,5	2,63	1,66	100
	10	2,84	1,70	96,8
	25	2,84	1,73	88,1
	100	2,43	1,62	30,1

20

Como es deducible de la tabla anterior, mientras que la cantidad relativa de micelas unidas (es decir, el porcentaje de micelas unidas con respecto a la cantidad total de micelas añadidas) disminuye al aumentar la cantidad total de micelas (es decir, el volumen de la suspensión de micelas) añadidas a la suspensión de microvesículas, la cantidad absoluta de micelas unidas (dado por el producto de la primera y la última columna en la tabla 7) sin embargo aumenta.

25

Se obtienen resultados sustancialmente similares preparando un montaje con los microglobos del ejemplo 1 y las preparaciones de micelas de los ejemplos 5c o 5d, respectivamente.

Ejemplo 11

Determinación de la actividad de unión de los montajes del ejemplo 10a-10b

35

Para probar la actividad de unión de los montajes de los ejemplos 10a y 10b (10 µl y 100 µl de cada preparación de suspensión de micelas), se prepara una superficie recubierta de neutravidina como sigue:

40

Se añaden tampón carbonato (pH 9,5 - 300 µl) y NeutrAvidin™ (Pierce - 1 mg/ml - 50 µl) a cada pocillo de una placa de doce pocillos (Nunc™). Después de la incubación (durante la noche - 4°C), el pocillo se lava dos veces con PBS que contiene Tween 20 al 0,1% y dos veces con PBS. Se añade seroalbúmina bovina (al 2% en PBS - 350 µl) y después de la incubación (25°C - 1 h), el pocillo se lava dos veces con PBS que contiene Tween 20 al 0,1% y dos veces con PBS.

45

Se añaden una cantidad de 2 · 10⁸ montajes preparados según los ejemplos 10a y 10b a cada pocillo, después el pocillo se llena con PBS, se sella y la placa se da la vuelta. Después de la incubación inversa (2 h - 25°C), el pocillo se lava dos veces con PBS y la superficie se observa mediante un microscopio óptico con una lente de 40x aumentos. Ambos montajes del ejemplo 10b, que contienen micelas biotiniladas, muestran afinidad por la superficie recubierta de neutravidina, la preparación de 100 µl/ml proporciona un mayor espacio cubierto de la superficie con

respecto a la preparación de 10 µl/ml. Las preparaciones no biotiniladas correspondientes del ejemplo 10a no muestran en cambio actividad de unión en la superficie recubierta de neutravidina.

5 Se obtienen resultados sustancialmente similares comparando la actividad de unión de montajes que comprenden microglobos del ejemplo 1 y micelas no biotiniladas del ejemplo 5c con montajes correspondientes que comprenden microglobos del ejemplo 1 y micelas biotiniladas del ejemplo 5d.

Ejemplo 12a-12b

10 Preparación de montajes con microburbujas catiónicas y micelas aniónicas

15 Se mezcla la suspensión de microglobos del ejemplo 2d (1 ml) con diferentes cantidades en volumen (indicado en la siguiente tabla 8) de la preparación de micelas de los ejemplos 5a o 5b, respectivamente. Las suspensiones se agitan suavemente durante 1 hora, después se lavan dos veces por centrifugación (180 g durante 5 min) con tampón Tris glicerol. El infranadante se desecha y el residuo se dispersa en tampón Tris glicerol (1 ml). Se describen el tamaño, concentración y potencial ζ de los montajes obtenidos en la tabal 8

Tabla 8

	micela/susp. de microburbuja (µl/ml)	DV50 (µm)	DN (µm)	potencial ζ (mV)
Ejemplo 2d	-	4,74	1,82	57,1
Ejemplo 12a (con micelas no biotiniladas del ejemplo 5a)	10	6,92	2,75	37,6
	30	8,79	2,81	-19,0
	100	7,81	2,29	-38,0
	300	6,12	1,91	-50,4
Ejemplo 12b (con micelas biotiniladas del ejemplo 5b)	10	6,43	2,53	30,1
	30	7,31	2,37	-28,2
	100	7,22	1,94	-42,4
	300	6,11	1,87	-44,4

20 En ambos casos, aumentar los volúmenes de suspensión de micelas determina una reducción del potencial ζ de la suspensión de montaje respectiva obtenida.

25 Se obtienen resultados sustancialmente similares usando las suspensiones de microburbujas de los ejemplos 2c o 2e, en lugar de la suspensión de microburbujas del ejemplo 2d, o sustituyendo las preparaciones de micelas de los ejemplos 5a y 5b con las de los ejemplos 5c y 5d, respectivamente.

Ejemplo 13

30 Determinación de la actividad de unión de los montajes de los ejemplos 12a-12b

Para probar la actividad de unión de los montajes de los ejemplos 12a y 12b, se prepara una superficie recubierta de neutravidina como se describe en el ejemplo 11 y se prueba con diferentes cantidades (300, 100, 30 y 10 µl) de las preparaciones de los ejemplos 12a y 12b.

35 Se observa una marcada actividad de unión en el microscopio óptico para las preparaciones de 100 µl/ml y 300 µl/ml del ejemplo 12b. Se observa una unión menor para la preparación de 30 µl/ml mientras que la mezcla de 10 µl/ml muestra mala unión. Todos los montajes del ejemplo 12a (que no contiene micelas biotiniladas) no muestran actividad de unión.

40 **Ejemplo 14a-14b**

Preparación de montajes con microburbujas catiónicas y micelas aniónicas

45 El contenido liofilizado de un vial obtenido según el ejemplo 4 se expone a C₄F₁₀ y se redispersa en 2 ml de agua destilada. La suspensión se lava dos veces por centrifugación (180 g durante 10 min) con PBS y se redispersa en 2 ml de PBS.

50 Se añaden 50 µl de una preparación de micelas preparada según el ejemplo 5a o 5b, respectivamente, la mezcla se agita durante la noche en un agitador con rotación en una atmósfera de C₄F₁₀, después se lava dos veces con PBS por centrifugación (180 g durante 10 min) y por último se redispersa en 2 ml de PBS.

La tabla 9 proporciona la caracterización de los montajes de los ejemplos 14a y 14b.

Tabla 9

		DV ₅₀ (μm)	D _N (μm)	Conc. (part./ml)	Rendimiento de micelas (%)
Ejemplo 14a	Microburbujas	4,57	2,75	5,50E+08	-
	Montajes	4,81	2,72	4,04E+08	91,9
Ejemplo 14b	Microburbujas	4,39	2,65	3,48E+08	-
	Montajes	4,45	2,44	3,45E+08	83,8

Como es deducible de la tabla anterior, la sustancial totalidad de las micelas se asocia a microburbujas en los montajes formados, dichos montajes tienen sustancialmente el mismo diámetro medio que las microburbujas iniciales.

5

Ejemplo 15

Preparación de montajes con microburbujas aniónicas y micelas catiónicas

Una suspensión de microburbujas preparada según el ejemplo 3b (1 ml) se mezcla con diferentes cantidades en volumen (indicado en la siguiente tabla 10) de la preparación de micelas del ejemplo 8. La suspensión se agita suavemente durante 1 hora, después se lava dos veces por centrifugación (180 g durante 5 min) con tampón Tris glicerol. El infranadante se desecha y los montajes resultantes se dispersan en tampón Tris glicerol (1 ml). La tabla 10 muestra algunas características de los montajes.

15

Tabla 10

μl de suspensión de micelas por ml de suspensión de microburbujas	D _V (μm)	D _N (μm)	potencial ζ (mV)
0	7,87	1,86	-60,2
10	11,43	4,98	-44,9
100	9,16	2,48	+17,1
300	9,20	2,12	+49,4

Se puede observar que con una cantidad de micelas capaces de determinar una inversión en signo del potencial ζ inicial de la suspensión de microburbujas, las dimensiones medias del montaje se hacen más cercanas a las dimensiones de las microburbujas iniciales.

20

Ejemplo 16

Determinación de la cantidad de micelas unidas como una función de la cantidad de compuestos cargados en las preparaciones de montajes que comprenden microburbujas catiónicas y micelas aniónicas

25

Se preparan diferentes suspensiones de montajes mezclando 300 μl de una solución de micelas preparada según los ejemplos 6a-6f con 1 ml de una suspensión de microburbujas en PBS preparada según los ejemplos 2a-2e en un tubo de vidrio de 5 ml, para un total de 30 preparaciones de montajes. Las suspensiones mezcladas se agitan suavemente durante 30 minutos y después se lavan dos veces por centrifugación (180 g durante 10 min) para eliminar el material sin unir. La cantidad de moléculas lipídicas en micelas unidas a las microburbujas se evalúa dosificando la molécula radioactivamente marcada DPPC-³H incorporada en las micelas.

30

La figura 1 muestra los resultados de las medidas, donde las líneas A a E representan las cantidades de micelas unidas a las microvesículas como función de la cantidad de compuestos cargados en dichas micelas, para montajes que comprenden las respectivas microvesículas preparadas según los ejemplos 2a a 2e.

35

De dicha figura, se puede advertir que sustancialmente no se observan micelas unidas para preparaciones de montajes que incluyen micelas del ejemplo 6a (tensioactivo no cargado). Además, la cantidad de micelas unidas a las microvesículas aumenta con el aumento de la cantidad de compuestos cargados incluidos en la microvesícula. Por último, para esta combinación particular de montajes micelas/microvesículas, se puede observar que cantidades mayores de micelas se unen a las microvesículas cuando la cantidad relativa de compuesto cargado en la micela es desde aproximadamente el 1% al 5% (p/p) del peso total.

40

Ejemplo 17

Determinación de la cantidad de micelas unidas como una función de la cantidad de compuestos cargados en las preparaciones de montajes que comprenden microburbujas aniónicas y micelas catiónicas

Se preparan diferentes suspensiones de montajes mezclando 300 μl de cada una de las soluciones de micelas preparada según los ejemplos 9a-9e con 1 ml de cada una de las suspensiones de microburbujas preparadas según los ejemplos 3a-3c en un tubo de vidrio de 5 ml, respectivamente, para un total de 15 preparaciones de montajes. Las suspensiones mezcladas se agitan suavemente durante 30 minutos y después se lavan dos veces por

50

centrifugación (180 g durante 10 min) para eliminar el material sin unir. La cantidad de moléculas lipídicas en micelas unidas a las microburbujas se evalúa dosificando la molécula radioactivamente marcada DPPC-³H incorporada en las micelas.

5 Se observan resultados similares que para las preparaciones de montajes del ejemplo 16, es decir, que al aumentar la cantidad de compuestos cargados incluidos en la microvesícula es posible aumentar la cantidad de micelas unidas a las microvesículas y que, en particular para montajes donde las microvesículas contienen una menor cantidad de compuestos cargados, se une una mayor cantidad de micelas a las microvesículas cuando la cantidad relativa de compuesto cargado en la micela es desde aproximadamente el 1% al 5% (p/p).

10

Ejemplo 18

Determinación de la cantidad de micelas unidas como una función de la cantidad de micelas añadidas a suspensiones de microburbujas que incluyen diferentes cantidades de compuestos cargados

15

Se combinan diferentes cantidades (50, 100, 250 y 500 µl) de preparaciones de micelas preparadas según el ejemplo 7a o 7b con 1 ml de las preparaciones de microburbujas preparadas según los ejemplos 2b, 2d y 2e para un total de 12 preparaciones de montajes (en particular 2b y 2d se combinan con 7a, mientras que 2d se combina con 7b). Las mezclas se agitan suavemente durante 30 minutos y se lavan dos veces por centrifugación (180 g/10 min) en agua para eliminar el material sin unir.

20

Las suspensiones resultantes se caracterizan por contador Coulter para la medida de distribución de tamaño y por Malvern Zetasizer para el potencial ζ. Una parte de las muestras se liofiliza a 0,2 mbar durante 24 horas y el liofilizado se analiza por HPLC para determinar la cantidad de DSPE-PEG en los montajes (µg de PE-PEG/ml de burbujas). Los resultados se resumen en la siguiente tabla 11, que ilustra la cantidad inicial de DSPE-PEG incluida en la mezcla para formar el montaje, la cantidad final de DSPE-PEG en el montaje (correspondiente a la cantidad de micelas unidas), la proporción (expresada como equivalente de cargas) entre cargas positivas y negativas en el montaje final y el respectivo potencial ζ de la suspensión final.

25

30

Tabla 11: Microburbujas catiónicas y micelas aniónicas

	Mezcla inicial		Mezcla final	
	DSPE-PEG (nmoles)	DSPE-PEG (nmoles)	Proporción de EC	potencial ζ (mV)
Ejemplos 2d y 7a	35,87	1,35	0,18	35,8
	71,75	2,34	0,43	15,6
	179,37	2,28	0,46	10,9
	358,75	2,26	0,59	-13,3
Ejemplos 2d y 7a	35,87	3,30	0,14	26,2
	71,75	3,69	0,18	20,8
	179,37	3,36	0,21	12,4
	358,75	4,77	0,22	-10,0
Ejemplos 2e y 7b	35,87	3,81	0,07	39,3
	71,75	5,24	0,10	31,5
	179,37	8,04	0,15	18,3
	358,75	9,79	0,20	9,6

De la tabla anterior, se puede observar que, en general, cuanto mayor es la cantidad de compuestos cargados en la microvesícula, mayor la cantidad de micelas unidas en el montaje final. Además, con respecto a la misma preparación de microburbujas, cuanto mayor es la cantidad de DSPE-PEG unido, mayor es la proporción de EC y menor el respectivo valor del potencial ζ.

35

Ejemplo 19

Montaje de microvesículas catiónicas con micelas aniónicas y mezcla comparativa de microvesículas aniónicas y micelas catiónicas

40

Se pesan 20 mg de DSPE-PEG 2000 y se disuelven en cloroformo/metanol (1/1 v/v) a 60°C en un matraz de fondo redondeado y la mezcla de solventes se evapora al vacío, depositándose una película fina en la pared interna del matraz. Esta película se seca además durante la noche en una cámara de vacío.

45

La película lipídica se hidrata con 10 ml de glucosa al 5% a 60°C durante 30 minutos, la solución se filtra en filtros de 0,2 µm y después se enfría a temperatura ambiente antes de la caracterización.

La preparación se repite dos veces.

50

Se preparan microburbujas como se describe en el ejemplo 2e (cargadas positivamente) y 3b (cargadas negativamente), usando una mezcla 50/50 (p/p) de DAPC y DSTAP o una mezcla 50/50 (p/p) de DSPC y DPGG. Los viales se exponen a C₄F₁₀/N₂ 50/50 (p/p) antes de la reconstitución.

5 Se diluyen 2,5 ml de solución de micelas con 2,5 ml de glucosa al 5%. Las microburbujas liofilizadas se reconstituyen usando la solución diluida de micelas, se agita en el Vortex durante 2 minutos y después se mezcla suavemente durante 30 minutos.

10 La suspensión obtenida se lava dos veces con glucosa al 5% (por centrifugación, 180 g/10 min) y el sobrenadante se redispersa en 2,5 ml de glucosa al 5%. Se mide el potencial ζ de cada suspensión usando un Malvern Zetasizer 3000Hsa (50 μ l/10 ml de NaCl 1 M). Se determina la cantidad de DSPE-PEG2000 en cada suspensión usando HPLC. Los resultados se dan en la siguiente tabla 12.

Tabla 12: mezcla de micelas aniónicas con microburbujas aniónicas o catiónicas

Suspensión de micelas aniónicas con:	potencial ζ (mV)	DSPE-PEG2000 (μ g/ml)
Microburbujas aniónicas	-41,3 \pm 2,7	0,8
Microburbujas catiónicas	-18,3 \pm 2,5	129,0

15 De la tabla anterior, se puede observar que sustancialmente no se obtiene unión de micelas aniónicas en microburbujas aniónicas, es decir, solo se encuentran cantidades despreciables de DSPE-PEG en la mezcla final, mientras que el potencial ζ permanece sustancialmente negativo.

20 **Ejemplo 20**

Montaje microglobos catiónicos - oro coloidal

25 Una suspensión de microglobos catiónicos preparada según el ejemplo 1 se mezcla con una solución coloidal de partículas de oro estabilizada con citrato de sodio (Polysciences - 60 nm) en varias proporciones (expresadas como número de partículas de oro/número de microglobos, véase la tabla 13). Después de 2 horas, las partículas flotantes se separan y redispersan en agua destilada. La tabla 13 muestra que se alcanza un valor neutro del potencial ζ a una proporción de aproximadamente 200 partículas de oro por micogloblo.

30

Tabla 13

Proporción en número oro coloidal/microglobos	Microglobos catiónicos
0	+35,0
50	+23,8
100	+19,3
200	-0,7
800	-2,8
2000	-19,0

Ejemplo 21 - Montaje microburbujas catiónicas-magnetitas

35 Se prepararon magnetitas recubiertas con DPPA/Pluronic F108 (proporción FE/DPPA/Pluronic F108 3/15/15 en mg/ml) según la patente en EE UU 5.3545.395. La solución se diluyó 100 veces con tampón Tris (1 g/l)/glicerol (0,3 M) (pH: 7,05). Las microburbujas catiónicas (preparadas según el ejemplo 2d, excepto que el gas empleado es SF₆ en lugar de la mezcla C₄F₁₀/N₂) se redispersan en una atmósfera de SF₆ con 5 ml de solución de magnetitas. Después de 2 minutos agitando con el vortex, la suspensión se mezcla suavemente durante 1 hora. A continuación las partículas flotantes se lavan dos veces con tampón Tris/glicerol por centrifugación (180 g/10 min). Se miden el tamaño y la concentración por contador Coulter Multisizer. El potencial ζ se determina con Malvern Zetasizer 3000Hsa (dilución: 50 μ l/10 ml de agua). Se midió la unión de magnetitas usando la determinación del tiempo de relajación (T2) (Bruecker: Minispec MQ20) y se comparó con un control llevado a cabo en la misma preparación de microburbujas sin partículas de magnetita. Los resultados se dan en la tabla 14.

45

Tabla 14

	Suspensión control (sin partículas de magnetita)	Suspensión con partículas de magnetita
potencial ζ (mV)	+40,4 \pm 0,8	-30,8 \pm 4,1
T2 (ms)	1800 \pm 300	29,3 \pm 0,2

Como se muestra en la tabla anterior, además de la reducción del potencial ζ con respecto a la suspensión control se observa una reducción sustancial del T2, lo que confirma una sustancial unión de micelas que contienen magnetita a las microburbujas.

Ejemplo 22 - Efecto de micelas cargadas opuestas en la superficie de microburbujas cargadas en la administración *in vivo*

5 Se preparan microburbujas cargadas positivamente como se describe en el ejemplo 2d usando una mezcla 80/20 (p/p) de DAPC y DSTAP. Se preparan microburbujas cargadas negativamente como se describe en el ejemplo 3b usando una mezcla 50/50 de DSPC y DPPG. Se exponen los viales a C₄F₁₀/N₂ 50/50 (p/p) antes de la reconstitución con tampón Tris/glicerol (5 ml).

10 Se preparan micelas según el ejemplo 6f (cargadas negativamente) y el ejemplo 8 (cargadas positivamente). Después de ello se preparan las siguientes suspensiones de microburbujas o de montajes:

Suspensión A: Se mezclan 600 µl de tampón Tris/glicerol con 2 ml de microburbujas (ejemplo 2d - cargadas positivamente) y se mezcla suavemente durante 30 min.

15 Suspensión B: Se mezclan 600 µl de micelas según el ejemplo 6g (cargadas negativamente) con 2 ml de microburbujas (ejemplo 2d - cargadas positivamente) y se mezcla suavemente durante 30 min.

20 Suspensión C: Se mezclan 600 µl de tampón Tris/glicerol con 2 ml de microburbujas (ejemplo 3b - cargadas negativamente) y se mezcla suavemente durante 30 min.

Suspensión D: Se mezclan 600 µl de micelas según el ejemplo 8 (cargadas positivamente) con 2 ml de microburbujas (ejemplo 3b - cargadas negativamente) y se mezcla suavemente durante 30 min.

25 Todas las suspensiones se lavan dos veces con tampón Tris/glicerol (por centrifugación 180 g/10 min) y los sobrenadantes se redispersan en 2 ml de tampón. Se determinan los tamaños y las concentraciones usando un contador Coulter Multisizer. El potencial ζ de cada suspensión se mide con Malvern Zetasizer 3000Hsa (50 µl/10 ml de NaCl 1 mM) y se ilustran en la siguiente tabla 15.

30

Tabla 15

Suspensión	potencial ζ (mV)
A	+48,6±9,3
B	-51,9±1,3
C	-61,5±7,2
D	+37,2±9,8

35 Las suspensiones se inyectaron en la vena de la oreja de un conejo a una dosis de 5E+06 microburbujas por kg de peso corporal. Se realizó ecografía bidimensional en imagenología de contraste coherente (ICC) usando un Acuson Sequoia 512 equipado con un transductor 4C1-S en imagenología intermitente (dos secuencias/s) y un índice mecánico (IM) alto. Se registraron imágenes del riñón en una videogradora durante 3 minutos y la secuencia se analizó para determinar la intensidad media de pixel como función del tiempo en la región de interés (ROI) seleccionada en la corteza (figuras 2 y 3).

40 Como se ve en las figuras, la adición de micelas de carga opuesta en las microburbujas cambia drásticamente el comportamiento *in vivo* de las microburbujas. Por tanto, las burbujas cargadas positivamente apenas son detectables en la corteza del riñón (suspensión A). Sin embargo, después de la incubación de con micelas cargadas negativamente, las mismas microburbujas muestran una señal fuerte en la ROI (suspensión B). Similarmente, las microburbujas cargadas negativamente (suspensión C) muestran una señal fuerte en el riñón. Sin embargo, después de la mezcla con micelas cargadas positivamente, casi no hay señal detectable en la ROI.

45

Ejemplo 23 - Montaje de microburbujas catiónicas con micelas aniónicas que comprenden un fármaco

50 Se mezclan 2 ml de una suspensión de microburbujas (preparada según el ejemplo 2a dispersadas en PBS) con diferentes cantidades de soluciones de Fungizone® (suspensión micelar de anfotericina B con desoxicolato de sodio en PBS - Bristol Myers Squibb) como se ilustra en la siguiente tabla 16. Las suspensiones se agitan suavemente durante 1 hora, después se lavan dos veces por centrifugación (180 g/5 min) con tampón PBS. El infranadante se desecha y los montajes obtenidos se dispersan en tampón (1 ml). Se miden el tamaño y la concentración por contador Coulter Multisizer (apertura: 30 µm - 50 µl/100 ml de NaCl al 0,9%). El potencial ζ se determina con un Malvern Zetasizer 3000Hsa (50 µl/10 ml de agua destilada). La cantidad de anfotericina B en las microburbujas se midió por espectrofotometría (409 nm - 50 µl de montajes en 2 ml de CHCl₃/MeOH 1/1) y se comparó a una curva de calibración de Fungizone®. Los resultados ilustrados en la siguiente tabla 16 muestran que al aumentar la cantidad de micelas añadidas, es posible incluir cantidades crecientes de fármacos en los montajes.

55

Tabla 16 - Montajes con fármaco

	µl de suspensión de micela por ml de suspensión de µburbujas	potencial ζ (mV)	anfotericina B (µg/ml)
Ejemplo 2a	-	49,1±3,0	-
+ Fungizone®	10	50,8±4,3	42,8
	30	28,9±6,9	122,0
	100	-24,7±0,3	367,9

Ejemplo 24 - Montaje con doble capa de micelas5 Ej. 24a: Preparación de burbujas cargadas negativamente

Se preparan microburbujas que contienen DPPC/DPPS usando el método similar al descrito en el ejemplo 3 de la patente en EE UU no. 5.830.435. Brevemente, se obtienen liposomas multilamelares (MLV) dispersando 59,2 mg de DPPC y 40,8 mg de DPPS en 100 ml de agua destilada que contiene 1 g de propilenglicol. Los liposomas se incuban a 70°C durante 30 min con agitación. El diámetro medio de los liposomas es aproximadamente 1,4 µm para D_N y 2,7 µm para D_V.

La suspensión de liposomas se introduce en un reactor de vidrio hermético a gas equipado con emulsionante mecánico de alta velocidad (Megatron MT3000, Kinematica, Suiza). Una bolsa de gas que contiene C₄F₁₀ se conecta a la cámara de mezcla del emulsionante. Después de la homogenización (10.000 rpm, 1 min) se obtiene una suspensión lechosa de microburbujas. El infranadante (aproximadamente 90 ml que contiene principalmente liposomas) se elimina por decantación. El sobrenadante (que contiene las microburbujas) se recupera y resuspende en agua destilada hasta un volumen total de 100 ml. El paso de decantación se repite y la suspensión final de burbujas se resuspende en maltosa al 10%. Se recogen alícuotas de la suspensión en viales de vidrio de 10 ml (1 ml de suspensión por vial) y las muestras se congelan a -45°C y se liofilizan.

Después de la liofilización, los viales se cierran con tapones de goma, se vacían y llenan con una mezcla de gas que contiene una mezcla 1:1 (v/v) de C₄F₁₀ y aire. Las microburbujas se generan inyectando 2 ml de agua destilada en los viales a través del tapón y agitando con la mano.

25 Ej. 24b: Preparación de micelas catiónicas y aniónicasEj. 24b1

30 Se preparan micelas catiónicas con 3,73 mg/ml de DSPE/PTE020 (un PEG-fosfolípido multibrazo, NOF Corporation, Japón) y 1,27 mg de fosfolípido catiónico DPEPC (dipalmitoil glicero-3-etilfosfocolina, Avanti® Polar Lipids, Inc., EE UU).

Ej. 24b2

35 Se preparan micelas aniónicas y funcionalizadas con 4,1 mg/ml de DSPE-PEG2000 y 0,9 mg/ml de un lipopéptido de unión a GPIIb/IIIa (DPPE-PEG2000-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, preparado según el ejemplo 3 del documento US 6.139.819).

40 Se preparan las micelas cargadas tanto positivamente como negativamente en solución de glucosa al 5%.

Ej. 24c: Preparación del montaje con burbujas cargadas negativamente y capas de multi-CAM que tiene cargas eléctricas opuestas

45 Se añaden respectivamente 50 µl y 500 µl de micelas catiónicas preparadas según el Ej. 24b1 a dos preparaciones que contienen aproximadamente 1x10⁹ microburbujas cargadas negativamente preparadas según el Ej. 24a. La mezcla se agita suavemente durante 30 min y después se lava dos veces por centrifugación (10'/1000 rpm), con resuspensiones en una solución de glucosa al 5%. El tamaño y potencial zeta del montaje obtenido determinados se describen en la tabla 17 posteriormente (filas "montaje 1"). Los resultados muestran que después de recubrir las microburbujas cargadas negativamente con una capa de micelas catiónicas, el potencial zeta medido de la suspensión del montaje se vuelve positivo.

55 A continuación se añaden respectivamente 100 µl y 250 µl de la suspensión de micelas aniónicas (preparada según el Ej. 24b2) al montaje que contiene 50 µl de micelas catiónicas y al montaje que contiene 500 µl de micelas catiónicas. Las dos mezclas se agitan suavemente durante 30 min y se lavan dos veces por centrifugación (10'/1000 rpm), con resuspensión en una solución de glucosa al 5%. Los valores del diámetro y potencial zeta del montaje de doble capa obtenido se dan en la tabla 17 posteriormente (filas "montaje 2"); la presencia de la segunda capa de micelas negativas determina valores negativos correspondientes del potencial zeta.

Tabla 17

	μl de micelas añadidos a 1×10^9 microburbujas	D_V (μm)	D_N (μm)	potencial ζ (mV)
Microburbujas	0	2,4	1,3	-63
Montaje 1	50	2,5	1,4	+5
Montaje 1	500	2,2	1,3	+8
Montaje 2	100	2,0	1,3	-30
Montaje 2	250	2,2	1,3	-38

5 También se pueden producir montajes similares que comprenden una pluralidad de capas alternativamente cargadas con otros tipos de CAM, tal como liposomas y nanopartículas. Por ejemplo, se pueden recubrir microburbujas cargadas negativamente con liposomas catiónicos y que contienen un fármaco y después con una segunda capa de micelas aniónicas que tienen fracciones de direccionamiento.

Ejemplo 25: Preparación de montajes a partir de emulsión

10 Se calientan 50 ml de agua destilada que contiene DAPC y DSTAP (80:20, 2 mg/ml) a 70°C durante 30 minutos, después se enfría a temperatura ambiente. Se emulsionan 4 ml de perfluorohexano en esta fase acuosa usando un homogenizador de alta velocidad (Polytron, 10.000 rpm, 1 minuto). La emulsión resultante muestra un diámetro mediana en volumen (D_{V50}) de 5,0 μm y un diámetro medio en número (D_N) de 2,7 μm determinado con un Malvern Mastersizer. La emulsión se lavó por centrifugación y se resuspendió en agua. Diferentes cantidades de micelas aniónicas preparadas según el ejemplo 24b2 se añaden respectivamente a tres alícuotas de la emulsión catiónica anterior, con concentraciones respectivas de 135 μl , 270 μl y 540 μl por ml de emulsión. Después de la incubación (30 min a temperatura ambiente con agitación suave) y eliminación del exceso de micelas por centrifugación, la emulsión recubierta por micelas se redispersó en una solución acuosa de PEG4000 al 20% (p/p). El montaje emulsión-micelas se distribuyó en viales (2 ml/vial) después se congeló y liofilizó en los viales. El aire en los viales de los liofilizados se eliminó y se sustituyó por C_4F_{10} . Después de la reconstitución con 2 ml de una solución de glucosa al 5%, se obtiene una suspensión de montaje microburbuja-micelas lechosa. Los resultados del análisis del contador Coulter y potencial zeta se reúnen en la tabla 18 a continuación.

Tabla 18

Micelas/ $\mu\text{burbujas}$ ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	burbujas/ml	D_N (μm)	D_V (μm)	D_{V50} (μm)	potencial Z
-	5,88E+07	1,35	4,65	4,22	46,9
135	8,27E+08	1,23	3,70	2,35	20,3
270	8,61E+08	1,39	4,12	3,35	-4,3
540	1,04E+09	1,31	3,85	3,34	-6,3

25 Las preparaciones con cantidades crecientes de micelas aniónicas, producen cantidades crecientes de microburbuja. Además, las propiedades de carga de superficie también se pueden modular (valores de potencial zeta que varían de positivo a negativo) según se desee.

30 Ejemplo 26: Preparación de montajes a partir de emulsión de gas

35 Se obtienen microburbujas cargadas negativamente según el ejemplo 24a usando C_4F_{10} como fase gas y DPPS como fosfolípido (2 mg/ml) a microburbujas estabilizadas. Después de la generación de burbujas por emulsión mecánica de alta velocidad (Megatron® MT3000, Kinematica, Suiza) de la suspensión de liposomas de DPPS, las microburbujas se lavan por diafiltración durante 30 minutos usando una membrana de policarbonato de 1 μm (Nuclepore®), para eliminar el exceso de fosfolípidos en la suspensión de burbujas. Se añaden micelas catiónicas que contienen DPEPC y DSPE-PEG2000 conjugado a IgG1 de rata anti-monoclonal de ratón contra P-selectina (70:30 en proporción molar, 5 mg/ml) a la suspensión de burbujas (50 μl de micelas por 1 ml de microburbujas aproximadamente 5×10^9 burbujas/ml). La mezcla se agita suavemente durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifuga. Los montajes (sobrenadante) se resuspendieron en una solución de maltosa al 10%, se congelaron y liofilizaron (2 ml/vial). Después de liofilizar, los liofilizados se gasearon con C_4F_{10} y se reconstituyeron con 2 ml de agua destilada. El análisis de Coulter mostró que más del 90% de los montajes burbuja-micelas todavía estaban intactos después de la liofilización. Estas microburbujas mostraron un D_N de 1,3 μm y un D_V de 2,9 μm . Las medidas de citometría de flujo confirmaron la presencia del anticuerpo IgG1 bioquímicamente activo en la superficie de los montajes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un montaje que comprende una microvesícula rellena de gas que tiene una primera carga neta global y un componente asociado a dicha microvesícula en donde dicho componente es una estructura supramolecular formada por la asociación de una pluralidad de moléculas, que tiene una segunda carga neta global opuesta en signo a dicha primera carga neta, que comprende un agente tensioactivo anfifílico biocompatible y tiene un diámetro de 100 nm o menos.
- 10 2. Un montaje según la reivindicación 1 en donde dicho componente asociado tiene un diámetro de 80 nm o menos.
3. Un montaje según la reivindicación 1 en donde dicho componente asociado tiene un diámetro de 50 nm o menos.
- 15 4. Un montaje según la reivindicación 1 en donde dicho componente asociado comprende un ligando de direccionamiento, un agente bioactivo, un agente diagnóstico o cualquier combinación de los mismo.
- 20 5. Un montaje según la reivindicación 4 que comprende además un segundo componente que tiene una carga neta global, que opcionalmente comprende un diferente ligando de direccionamiento, agente bioactivo, agente diagnóstico o cualquier combinación de los mismos.
- 25 6. Un montaje según la reivindicación 5, en donde dicho segundo componente tiene una carga neta global igual en signo con respecto a la carga de la microvesícula.
- 30 7. Un montaje según la reivindicación 1 en donde dicho agente tensioactivo anfifílico biocompatible es un lípido, un fosfolípido o un fosfolípido modificado.
- 35 8. Un montaje según la reivindicación 1 en donde dicho agente tensioactivo biocompatible se selecciona entre ácidos orgánicos de (C₂-C₁₀), ácidos grasos orgánicos que comprenden una cadena alifática de (C₁₂-C₂₄), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, ésteres de los mismos con polioxietileno; sales poliónicas (alcalinas); aminas orgánicas; amidas; sales de amina cuaternaria; aminoácidos; fosfolípidos; ésteres de mono u oligosacáridos con ácidos grasos orgánicos de (C₁₂-C₂₄); sulfonatos orgánicos; ácidos perfluoroorgánicos; tensioactivos poliméricos; y mezclas de los mismos.
- 40 9. Un montaje según la reivindicación 1 en donde la proporción entre el número de cargas por mol de microvesículas y el número de cargas por mol del segundo componente es desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10.
- 45 10. Un montaje según la reivindicación 9 en donde dicha proporción es de aproximadamente 2:1 o menos.
- 50 11. Un montaje según la reivindicación 1 en donde dicha microvesícula es una microburbuja estabilizada por una envoltura que comprende un compuesto formador de película anfifílico o un microglobo que tiene una envoltura material.
- 55 12. Un montaje según la reivindicación 11 en donde dicho compuesto formador de película anfifílico comprendido en la envoltura que estabiliza la microburbuja es un fosfolípido.
- 60 13. Un montaje según la reivindicación 11 en donde dicha envoltura comprende un fosfolípido o un lípido que tiene una carga neta positiva o negativa.
- 65 14. Un montaje según la reivindicación 11 en donde la envoltura material de dicho microglobo comprende un material polimérico, un material proteínico, un lípido insoluble en agua o cualquier combinación de los mismos.
15. Un montaje según la reivindicación 11 en donde la envoltura material de dicho microglobo comprende polímeros biodegradables iónicos.
16. Un montaje según la reivindicación 14 en donde la envoltura material de dicho microglobo comprende además un fosfolípido o un lípido que tiene una carga neta positiva o negativa.
17. Un montaje según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho componente asociado a dicha microvesícula es una micela.
18. Un montaje según la reivindicación 17 en donde dicha micela comprende un fosfolípido o un lípido que tiene una carga neta positiva o negativa, o un tensioactivo iónico polimérico.

- 5 19. Un montaje según cualquiera de las reivindicaciones 13, 16 o 18 en donde dicho fosfolípido o lípido se selecciona de derivados de fosfatidilserina, derivados de ácido fosfatídico, derivados de fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolaminas modificadas con polietilenglicol, derivados de etilfosfatidilcolina y las respectivas formas liso; sales de ácido cólico; sales de ácido desoxicólico; sales de ácido glicocólico; sales de ácidos grasos de (C₁₂-C₂₄) de los mismos; sales de alquilamonio que comprenden al menos una cadena alquilo de (C₁₀-C₂₀); sales de amonio terciario o cuaternario que comprenden al menos una cadena de acilo de (C₁₀-C₂₀) unida al átomo de nitrógeno mediante un puente alquileo de (C₃-C₆); y mezclas de los mismos.
- 10 20. Un montaje según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde una suspensión acuosa de dicho montaje en un soporte farmacéuticamente aceptable muestra un potencial ζ que está disminuido en al menos el 50% en valor absoluto con respecto al potencial ζ de una suspensión acuosa en el mismo soporte de las microvesículas rellenas de gas que forman dicho montaje.
- 15 21. Un montaje según la reivindicación 20 en donde dicho potencial ζ está disminuido en aproximadamente el 100% o más en valor absoluto.
- 20 22. Uso de un montaje según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para preparar una formulación farmacéuticamente activa.
- 20 23. Una suspensión acuosa de un líquido fisiológicamente aceptable que comprende un montaje según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
- 25 24. Un kit farmacéutico que comprende por separado:
- 30 a) una microvesícula rellena de gas, o un precursor de la misma en forma de una preparación liofilizada, que tiene una primera carga neta global como un primer componente;
- 30 b) un segundo componente, o un precursor del mismo en forma de una preparación liofilizada, asociable con dicha microvesícula que tiene una segunda carga neta global opuesta en signo a dicha primera carga neta, dicho componente asociado es una estructura supramolecular formada por la asociación de una pluralidad de moléculas, que comprende un agente tensioactivo anfifílico biocompatible y que tiene un diámetro de 100 nm o menos.
- 35 25. Un kit farmacéutico según la reivindicación 24 que comprende además un soporte líquido farmacéuticamente aceptable.
- 40 26. Método para preparar un montaje según cualquiera de las reivindicaciones previas 1 a 22, que comprende mezclar una preparación que comprende microvesículas rellenas de gas, o un precursor de las mismas en forma de preparación liofilizada, con una preparación que comprende un componente, o un precursor del mismo en forma de una preparación liofilizada, que se va a asociar a dichas microvesículas.
- 40 27. Método según la reivindicación 26 que comprende:
- 45 1) preparar una primera suspensión acuosa que comprende una microvesícula rellena de gas;
- 2) preparar una segunda suspensión acuosa que comprende un componente que se va a asociar con dicha microvesícula rellena de gas;
- 3) mezclar dichas dos suspensiones, para obtener una suspensión acuosa que comprende dicho montaje.

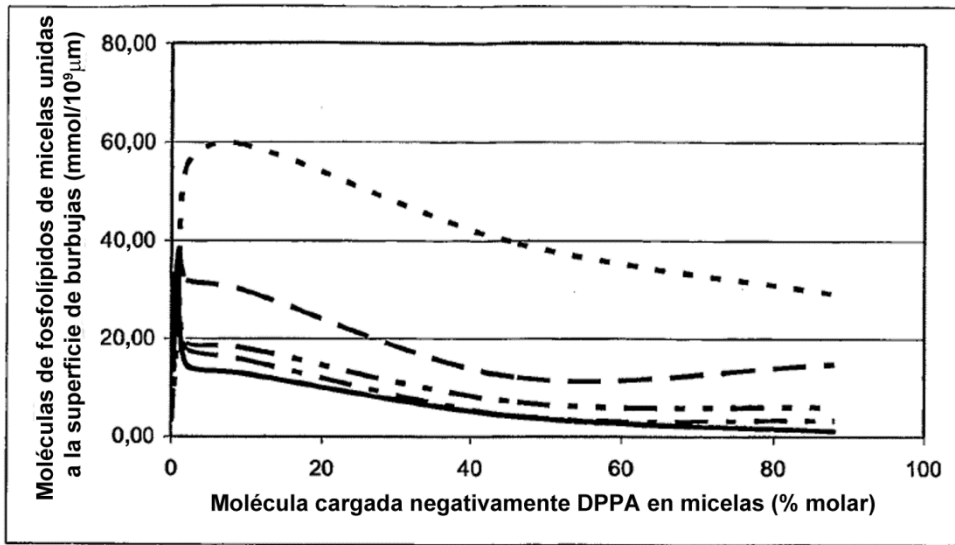


Figura 1

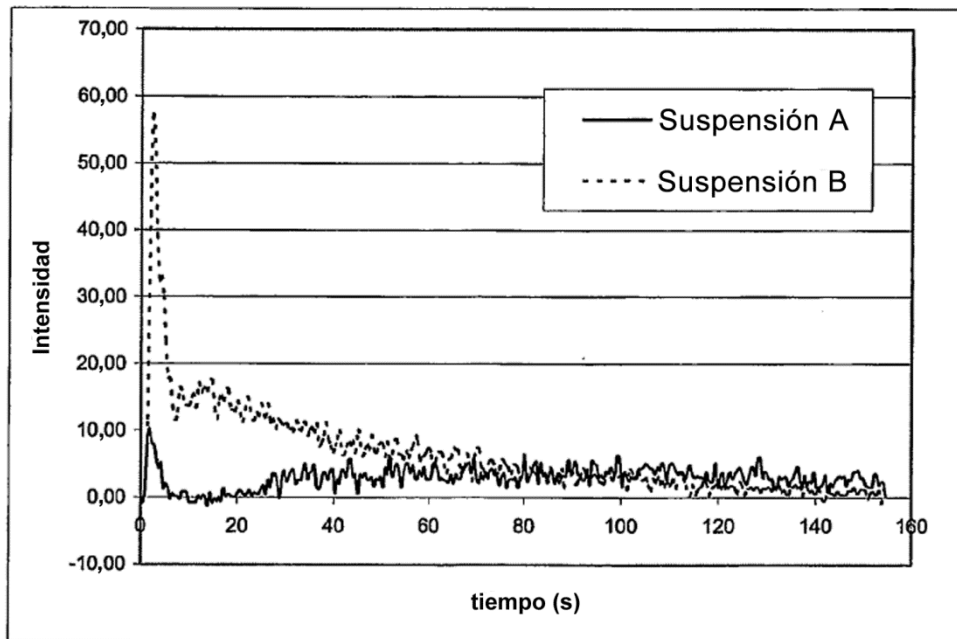


Figura 2

Figura 3

