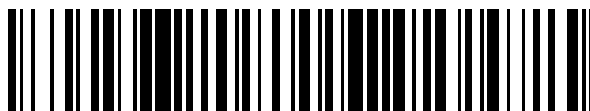


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 255**

51 Int. Cl.:

A61K 49/18 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010** **E 10781995 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015** **EP 2501415**

54 Título: **Nanopartículas de liposoma para pruebas de imagen de resonancia magnética de tumores**

30 Prioridad:

20.11.2009 GB 0920304

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2015

73 Titular/es:

MEDICAL RESEARCH COUNCIL (50.0%)
2nd Floor David Phillips Building Polaris House
North Star Avenue Swindon Wiltshire
SN2 1FL, GB y
IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

KAMALY, NAZILA;
KALBER, TAMMY, LOUISE;
KENNY, GAVIN, DAVID;
THANOU, MAYA;
MILLER, ANDREW, DAVID y
BELL, JIMMY

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 538 255 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

Nanopartículas de liposoma para pruebas de imagen de resonancia magnética de tumores

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos liposomas adecuados para su uso en la preparación de un agente de contraste para usar en la potenciación de las imágenes de resonancia magnética (IRM), en particular en la potenciación de las imágenes de resonancia magnética de tumores.

10 Antecedentes de la invención

La obtención de imágenes de cáncer es una de las áreas de enfermedad más importantes en las que la obtención de imágenes moleculares se fija para desempeñar un papel fundamental, tanto en la detección de cáncer como en el tratamiento posterior. Para una obtención eficaz de imágenes de cáncer mediante imágenes de resonancia magnética (IRM), existe una clara necesidad de desarrollar sondas de imagen molecular eficaces y biocompatibles.^{1,2} En este campo, la nanotecnología tiene mucho que ofrecer dado que la nanomedicina está lista para hacer considerables contribuciones en las áreas importantes de la administración de fármacos, detección de enfermedades y terapia. La aplicación de plataformas de nanotecnología para la obtención de imágenes de cáncer ha abierto oportunidades para el uso de sistemas de nanopartículas multifuncionales tales como liposomas, en el estudio de la detección y terapia del cáncer.

La IRM es una modalidad de obtención de imágenes clínicas que produce imágenes 3D opacas de tejidos que contienen agua. Hoy en día, más del 40 % de las imágenes clínicas en todo el mundo requiere la inyección de algún tipo de agente de contraste de IRM. Esto se debe al hecho de que la IRM sufre una falta de sensibilidad inherente y, a menudo, con el fin de diagnosticar correctamente la patología, se inyecta por vía intravenosa un agente de contraste paramagnético en los pacientes para potenciar aún más la señal de resonancia magnética (RM) y, por lo tanto, el lugar de la enfermedad. Estos agentes consisten en moléculas que incorporan un ión metálico paramagnético, con mayor frecuencia gadolinio o hierro. La mejora de las imágenes surge debido el efecto de la potenciación de los tiempos de relajación longitudinales (T_1) o transversales (T_2) de los protones del agua a granel circundantes por el ion metálico coordinado. Los agentes de contraste que incorporan gadolinio aumentan tanto $1/T_1$ como $1/T_2$ pero generalmente se utilizan la obtención de imágenes ponderadas en T_1 , donde su efecto $1/T_1$ es mayor en el tejido de su potenciación en $1/T_2$. Los agentes que contienen hierro, por otra parte, conducen a incrementos más sustanciales en $1/T_2$ y, por lo tanto, se visualizan con imágenes ponderadas en T_2 . El uso de agentes de contraste para IRM a base de gadolinio produce una potenciación positiva de la imagen (señal brillante en la imagen) y el uso de agentes de hierro conduce a una potenciación negativa de la imagen (oscurecimiento de la imagen).

El Gd.DTPA [complejo de gadolinio (III)-dietilentriaminopentaacetato] (Figura 1) fue el primer agente de contraste hidrosoluble excretable por vía renal aprobado para su uso por la FDA desde mediados de 1988, y actualmente se usa de forma rutinaria con el nombre comercial Magnevist^{®4}. La figura 1 presenta algunos ejemplos de los agentes de contraste más utilizados en la clínica.

Estos compuestos son generalmente complejos estables inertes donde el ion metálico está fuertemente quelado a los ligandos poli(aminocarboxilato). Estos tipos de agentes no son específicos, residen principalmente dentro de la circulación sanguínea y también se acumulan en los riñones debido a su filtración glomerular y generalmente se excretan sin metabolizar. Sin embargo, su uso en la obtención de imágenes de RM clínica tiene un gran valor, ya que se pueden visualizar anomalías anatómicas, tales como gliomas y lesiones en el cerebro, ya que en condiciones fisiológicas normales estos agentes no se cruzan una barrera hematoencefálica intacta. Las patologías dentro del hígado y otros órganos también pueden visualizarse, ya que estos agentes de contraste se acumulan rápidamente en los espacios intersticiales y, por tanto, pueden aumentar la relación señal - ruido en tales regiones de mayor volumen de fluido.

Sin embargo, como estos agentes no son específicos y se eliminan en unas pocas horas desde la inyección, su utilidad en la obtención de imágenes de RM está limitada a una ventana de tiempo corto de obtención de imágenes y sobre todo, potenciación del conjunto de sangre. Recientemente se han realizado muchos esfuerzos dentro del campo de la obtención de imágenes moleculares para mejorar las propiedades de los agentes de contraste de RM, lo que ha llevado al uso de polímeros, dendrímeros y diversas nanopartículas como vehículos de Gd. Los autores han sintetizado nuestra propia biblioteca nueva de lípidos activos en la IRM. A continuación, estos lípidos se han usado para formular liposomas para la obtención de imágenes tumorales.

Los liposomas están compuestos por componentes lípidos, con grupos de cabeza hidrófilos y grupos de cola hidrófobos (Figura 2). Cuando están hidratados, estos lípidos se agregan entre sí para formar vesículas de bicapa autoensambladas que encierran un compartimento acuoso. Debido a esta cavidad acuosa, tradicionalmente se han usado como vehículos de administración de fármacos, encapsulando fármacos solubles en agua a fin de mejorar la farmacocinética de los fármacos. Además, los ácidos nucleicos también se han condensado en formulaciones de

liposomas para la transfección eficaz y liberación de genes. A pesar de estas funcionalidades adicionales, los liposomas se estudiaron originalmente como modelos de membranas biológicas, y este es un concepto clave en la realización de su biocompatibilidad.

La naturaleza versátil de los liposomas puede alterarse para cambiar su interacción con diversas moléculas o estructuras aún más grandes tales como las células. Esto se puede hacer mediante la alteración de la carga global de la superficie del liposoma mediante la incorporación de lípidos con grupos de cabeza polares altamente cargados en la formulación liposómica, por ejemplo, la incorporación de lípidos catiónicos en la formulación produce liposomas catiónicos. Los lípidos catiónicos se han utilizado para formular complejos de liposoma / ADN (lipoplexos) utilizados como sistemas de liberación de genes *in vitro* e *in vivo*.

Los liposomas se caracterizan típicamente por su tamaño, forma y lamellaridad. Pueden estar compuestos por una sola bicapa (unilamelares), unas pocas bicapas (oligolamelares) o múltiples bicapas (multilamelares). La rigidez de la membrana se puede modificar con el uso de lípidos adecuados; y la fluidez de la membrana se puede variar mediante el uso de fosfolípidos con temperaturas de transición de fase altas o bajas. En general, los derivados de lípidos de ácidos esteárico (cadenas lipídicas C18 totalmente saturadas) otorgan rigidez e impermeabilidad a la membrana, mientras que los derivados lipídicos del ácido oleico (cadenas lipídicas C18 insaturadas) dan como resultado una bicapa lipídica más permeable y menos estable.

Mediante la incorporación de lípidos de gadolinio en las membranas de los liposomas pueden hacerse visibles en la IRM y se puede obtener sistemas con un mejor control del tamaño.⁵ Los liposomas son muy adecuados como vehículos de una alta capacidad de carga de gadolinio en las células. La incorporación de complejos de gadolinio anfipáticos en las membranas de liposomas ha producido liposomas marcados paramagnéticamente que potencian significativamente la capacidad de relajación de los protones. Estos liposomas paramagnéticos se han utilizado en una serie de investigaciones, incluyendo el del marcaje y rastreo celular.⁶ La incorporación de lípidos de gadolinio en formulaciones de liposomas la demostraron Kabalka et al., hace más de 20 años y el lípido de gadolinio Gd.DTPA.BSA [gadolinio (III).ácido dietilentriaminopentaacético-bis(estearilamida)] usado en sus estudios se usa con frecuencia para preparar liposomas paramagnéticos hoy en día.⁷

La capacidad para ajustar el tamaño del liposoma, la carga superficial y la especificidad permite un potencial de obtención de imágenes patológicas, tales como la obtención de tumores sólidos *in vivo*. Este ajuste de los liposomas se hace posible mediante el ajuste de la composición de la formulación de liposomas. Las cargas superficiales que tienden a la neutralidad son las más adecuadas para los propósitos *in vivo* con el fin de reducir el reconocimiento de partículas de liposomas por las proteínas plasmáticas y el sistema reticuloendotelial (SRE). Esto se puede lograr a través de la inclusión de lípidos neutros de carga en la formulación liposómica.

Trabajos anteriores han demostrado el nuevo lípido de gadolinio Gd. DOTA. Chol (gadolinio (III). 1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano-*N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetraacetato-colesterol) (véase la figura 3) es un potenciador de la señal de RM eficaz, y que MAGfect una formulación de liposomas que contiene este lípido de gadolinio es un vehículo doble de marcaje y transfección celular eficaz.⁶

Aunque es un lípido de marcaje celular relativamente eficaz, se ha descubierto que la formulación de concentraciones altas de liposomas es problemática, quizás debido al pobre anclaje de la cola de colesterol en las bicapas de liposomas en altas concentraciones. Por lo tanto, debido a esta limitación, la necesidad de proporcionar un anclaje a la membrana más sólido diseñado para aplicaciones *in vivo* donde se requieren concentraciones más altas de liposomas condujo a la investigación de un resto de cadena alquilo saturada alternativa en lugar del anclaje de colesterol. Para este propósito se sintetizó un lípido paramagnético Gd.DOTA.DSA (gadolinio (III) ácido 2-{4,7-bis-carboximetil-10-[(*N,N*-diestearilamidometil-*N'*-amido-metil]-1,4,7,10-tetra-azaciclododec-1-il)-acético) (véase la Figura 4) usando una combinación de químicas de solución y de fase sólida.

El quelato DOTA se conjugó con el lípido a través de un grupo funcional amida estable aunque biodegradable. Este lípido de gadolinio también se diseñó con un espaciador de cinco átomos de entre el quelante de gadolinio y los restos de cadena alquilo lipídicos. Esta separación entre el grupo de cabeza y la cola de alquilo lipídico se consideró óptima con el fin de asegurar la máxima exposición del quelato de gadolinio al agua en la superficie hidrófila de las partículas de liposomas. Además, este lípido de gadolinio también se diseñó con el ligando DOTA en lugar del DTPA [ácido dietilentriaminopentaacético] de uso más frecuente, puesto que el anterior ligando macrocíclico se considera un quelante más eficaz de gadolinio, capaz de retener el ion metálico incluso en el ambiente ácido del endosoma.⁸ Se eligió el quelato de Gd.DOTA aprobado por la FDA, ya que debido a sus constantes de estabilidad más altas, se sabe que los conjugados basados en DOTA son más estables *in vivo* en comparación con los ligandos de DTPA.

Eficacia de la IRM

Con el fin de establecer las propiedades de relajación de Gd.DOTA.DSA, se realizaron estudios de IRM de los lípidos en solución acuosa y los valores de T_1 y los parámetros de la capacidad de relajación se generaron en milisegundos. La eficacia del lípido de gadolinio Gd.DOTA.DSA se comparó con el agente de contraste clínico Magnevist® (Schering AG) y Gd.DTPA.BSA (véase la Tabla 1), y se encontró que se comparaba favorablemente a la

dosis clínicamente relevante. Estos datos también mostraron que Gd.DOTA.DSA tenía una relajación en T_1 comparable, sino ligeramente mejor, que el lípido Gd.DTPA.BSA ampliamente utilizado. Un método de recuperación de saturación estándar en T_1 (secuencia de eco de espín) se utilizó para determinar los valores de T_1 (de acuerdo con la Ec. 1), donde x es TR (tiempo hasta la repetición) y S_i es la señal medida para un TR dado.

5

$$S_i = S_0(1 - e^{(-x/T_1)})$$

Ecuación 1.

Ecuación de recuperación de saturación en T_1 para determinar los valores de T_1 .

10 La Tabla 1 presenta los valores de relajación en T_1 para los lípidos de Gd sintetizados, además de los controles pertinentes.

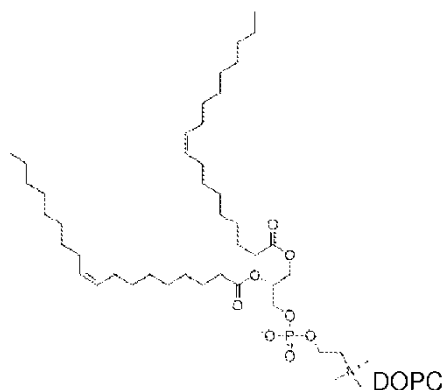
Muestra	T_1 (ms)
 0,5 mM Gd.DOTA.DSA	400,1 ± 15,92
 0,5 mM DOTA.DSA	2356 ± 112,588
 Magnevist®	371,0 ± 4,321
 H ₂ O	2750 ± 121,8
 0,5 mM Gd.DTPA.BSA	687,5 ± 26,03
 0,5 mM DTPA.BSA	2760 ± 211,7

Tabla 1. Valores de T_1 e imágenes de Gd.DOTA.DSA y Gd.DTPA.BSA con controles relativos.

15

Se ha encontrado que mediante el uso de Gd.DOTA.DSA es posible formular con éxito liposomas tanto catiónicos como neutros, y estos liposomas se han estudiado por su estabilidad, toxicidad *in vitro*, transfección *in vitro* y capacidades de obtención de imágenes de tumores *in vivo* [véase Kamaly et al 2009: Bioconjug Chem. 2009 Apr;20(4):648 - 55, y Kamaly et al 2008: Bioconjug Chem. 2008 Jan;19(1):118 - 29. Epub 2007 Nov 7]. Kamaly et al han desarrollado además dos liposomas PEGilados neutros que tienen mejores capacidades de potenciación de la señal de RM tumoral *in vivo*, además de estabilidad añadida. Estas partículas también incorporan Gd.DOTA.DSA. Estos liposomas contienen el DOPC de fosfolípido insaturado (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolcolina), cuya estructura es la siguiente:

20



Sin embargo, todavía hay una necesidad de nanopartículas de liposomas sólidas y estables que comprenden gadolinio que tienen capacidades de potenciación de la señal RM TUMORAL superiores *in vivo*. Específicamente, existe la necesidad de liposomas cuyas propiedades son tales que optimizan la acumulación de dichos liposomas en los tumores sólidos al tiempo que reducen al mínimo su acumulación en los órganos del cuerpo como el hígado, mejorando así su efecto potenciador de la señal RM al tiempo que reducen en gran medida la toxicidad de estos liposomas de gadolinio y mejoran su seguridad. Los autores han desarrollado nuevos liposomas que comprenden Gd.DOTA.DSA que satisfacen estas necesidades.

Descripción de la invención

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona

- (1) un liposoma que comprende Gd.DOTA.DSA (gadolinio (III) ácido 2-{4,7-bis-carboximetil-10-[(N,N-diestearilamidometil-N'-amido-metil)-1,4,7,10-tetra-azaciclododec-1-il]-acético) caracterizado por que dicho liposoma comprende adicionalmente un componente de fosfolípido neutro completamente saturado.

Aspectos preferidos del liposoma de este primer aspecto de la invención incluyen:

- (2) un liposoma de acuerdo con (1), donde dicho componente de fosfolípido completamente saturado es una 1,2-di(lípido C₁₂-C₂₀ saturado)-sn-glicero-3-fosfocolina, donde los grupos de lípidos saturados pueden ser iguales o diferentes unos de otros.

- (3) un liposoma de acuerdo con (1), donde dicho un liposoma de acuerdo con (1), donde dicho DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina).

- (4) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (3), donde dicho liposoma comprende además colesterol.

- (5) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (4), donde dicho liposoma comprende además un componente polietilenglicol-fosfolípido.

- (6) un liposoma de acuerdo con (5), donde dicho polietilenglicol-fosfolípido es DSPE-PEG (2000) [diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol (2000)].

- (7) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (6), donde la cantidad de Gd.DOTA.DSA en dicho liposoma es del 29 al 31 % en moles de la formulación de liposomas total.

- (8) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (6), donde la cantidad de Gd.DOTA.DSA en dicho liposoma es del 30 % en moles de la formulación de liposomas total.

- (9) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (8), donde la cantidad del componente fosfolípido completamente saturado en dicho liposoma es del 32 al 34 % en moles de la formulación de liposomas total.

- (10) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (8), donde la cantidad del componente fosfolípido completamente saturado en dicho liposoma es del 33 % en moles de la formulación de liposomas total.

- (11) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (10), donde la cantidad de colesterol en dicho liposoma es del 29 al 31 % en moles de la formulación de liposomas total.

- (12) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (10), donde la cantidad de colesterol en dicho liposoma es del 30 % en moles de la formulación de liposomas total.

(13) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (12), donde la cantidad de dicho componente polietilenglicol-fosfolípido en dicho liposoma es de 5-8 % en moles de la formulación de liposomas total.

5 (14) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (12), donde la cantidad de dicho componente polietilenglicol-fosfolípido en dicho liposoma es de 7 % en moles de la formulación de liposomas total.

(15) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (14), donde dicho liposoma tiene un tamaño medio de partícula a una dilución de 10 X en solución tampón de fosfato inferior o igual a 100 nm.

10 (16) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (14), donde dicho liposoma tiene un tamaño medio de partícula a una dilución de 10 X en solución tampón de fosfato inferior o igual a 80 nm.

15 (17) un liposoma de acuerdo con (1), donde dicho liposoma comprende Gd.DOTA.DSA, colesterol, y DSPC DSPE-PEG (2000).

(18) un liposoma de acuerdo con (17) donde Gd.DOTA.DSA, colesterol, DSPC y DSPE-PEG (2000) están presentes en la relación de 30: 33: 30: 7 % molar, respectivamente, en dicha formulación de liposomas.

En un segundo aspecto de la presente invención se proporciona:

20 (19) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (1) a (17), donde dicho liposoma comprende un agente dirigido a tumores.

Los liposomas preferidos que comprenden un agente dirigido a tumores incluyen:

25 (20) un liposoma de acuerdo con (19), donde dicho agente dirigido a tumores comprende un ligando para un receptor que está sobreexpresado en las células tumorales respecto a la expresión de dichos receptores en las células de tejido no tumoral de los mamíferos.

30 (21) un liposoma de acuerdo con (20), donde dicho agente dirigido a tumores comprende un resto de folato.

(22) un liposoma de acuerdo con (20), donde dicho agente dirigido a tumores es un compuesto de fosfolípido-polietilenglicol-folato.

35 (23) un liposoma de acuerdo con (22), donde dicho compuesto fosfolípido-polietilenglicol-folato es DSPE-PEG (2000) [diestearyl fosfatidiletanolamina-polietilenglicol (2000)-folato].

(24) un liposoma de acuerdo con una cualquiera de (21) a (23), donde la cantidad de dicho resto de folato presente en dicho liposoma es 1-2 % molar de la formulación de liposomas total.

40 (25) un liposoma de acuerdo con (19), donde dicho liposoma comprende Gd.DOTA.DSA, colesterol, DSPC DSPE-PEG(2000) y DSPE-PEG(2000)-Folato.

45 (26) un liposoma de acuerdo con (25) donde Gd.DOTA.DSA, colesterol, DSPC y DSPE-PEG (2000) y DSPE-PEG(2000)-Folato están presentes en la relación de 30:33:30:5:1,5 % molar, respectivamente, en dicha formulación de liposomas.

En un tercer aspecto de la presente invención se proporciona:

50 (27) un agente de contraste de resonancia magnética, que comprende liposomas de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (26) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, se proporciona:

55 (28) un agente de contraste de resonancia magnética de acuerdo con (27), donde dicho vehículo farmacéuticamente aceptable es un vehículo acuoso.

En un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona:

60 (29) un agente de contraste de resonancia magnética de acuerdo con (27) o (28) para uso en medicina, por ejemplo en el diagnóstico.

En un quinto aspecto de la presente invención se proporciona:

65 (30) uso de un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (26) en la preparación de un agente de contraste de resonancia magnética para potenciar las imágenes de resonancia magnética de los órganos y

estructuras de órganos en un mamífero.

Los aspectos preferidos de esta quinta realización incluyen:

5 (31) usar de acuerdo con (30) en la preparación de un agente de contraste de resonancia magnética para potenciar una imagen de resonancia magnética de un tumor en un mamífero.

(32) usar de acuerdo con (30) o (31), donde la concentración de dicho liposomas en dicho agente de contraste de resonancia magnética es 1 -50 mg / ml, más preferentemente 1 -30 mg / ml.

10

En un sexto aspecto de la presente invención se proporciona:

(33) un método de obtención de imágenes de resonancia magnética de un órgano o estructura de órgano en un mamífero, que comprende las etapas de:

15

(a) administrar el agente de contraste de resonancia magnética de acuerdo con (27) o (28) a un paciente; y

(b) tomar imágenes del órgano de interés en el paciente.

20

Los aspectos preferidos de esta sexta realización incluyen:

(34) un método de acuerdo con (33) donde dicho agente de contraste de resonancia magnética se usa para potenciar una imagen de resonancia magnética de un tumor en un mamífero.

25

(35) un método de acuerdo con (33) o (34), donde la concentración de liposomas en dicho agente de contraste de resonancia magnética es 1 -50 mg / ml, más preferentemente 1 -30 mg / ml.

En un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona:

30

(36) un método de obtención de imágenes de resonancia magnética de un órgano o estructura de órgano en un mamífero al que se le ha pre-administrado el agente de contraste magnético de acuerdo con (27) o (28) que comprende la etapa de:

35

(i) tomar imágenes del órgano de interés en el paciente.

En un octavo aspecto de la presente invención se proporciona:

(37) un método de fabricación de un liposoma de acuerdo con (1) a (26) que comprende mezclar una solución de Gd.DOTA.DSA (gadolinio (III) ácido 2- {4,7-bis-carboximetil-10 - [(N,N-distearilamidometil-N'-amido-metil-1,4,7,10-tetra-azaciclododec-1-il} -acético) y una solución de un fosfolípido totalmente saturado neutro.

40

Un aspecto preferido de la octava realización incluye:

(38) secar la mezcla (por ejemplo, al vacío) y, opcionalmente, rehidratar el liposoma resultante.

45

En un noveno aspecto de la presente invención se proporciona:

(39) un método de fabricación de un agente de contraste magnético de acuerdo con (27) o (28) que comprende mezclar un liposoma de (1) a (26) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50

Los aspectos preferidos de las realizaciones octava y novena son los mismos que los enumerados anteriormente en relación con los aspectos primero, segundo y tercero.

Descripción detallada de la invención

55

A continuación trataremos la presente invención con más detalle. La presente invención también se puede entender mejor haciendo referencia a las figuras 1 a 29, en las que:

La Figura 1 muestra agentes de contraste clínicos basados en gadolinio aprobados por la FDA;

60

La Figura 2 muestra la formación de liposomas a partir de lípidos anfipáticos;

La Figura 3 muestra Gd.DOTA.Chol, un componente de agente de contraste lipídico de MAGfect;

65

La Figura 4 muestra el lípido de gadolinio paramagnético diana, Gd.DOTA.DSA;

La Figura 5 muestra un espectro de masas por electropulverización de Gd.DOTA.DSA, m/z : 1117,2 (M-H), los picos isotópicos de Gd son visibles en la esquina superior derecha;

La Figura 6 muestra una traza de HPLC de Gd.DOTA.DSA 2: t_R = 36,22 min, columna C-4 péptido; mezcla de gradientes A = MeCN/0,1 %TFA; mezcla B = H₂O/TFA; mezcla C = MeOH, 0,0 min [100 % B], 15 - 25,0 min [100 % A], 25,1 - 45,0 min [100 % C]; flujo 1 ml/min;

La Figura 7 representa el EPR, donde el tejido normal no tiene brechas endoteliales suficientemente anchas como para permitir fugas de los agentes macromoleculares o de nanopartículas hacia el tejido extracelular que reviste los vasos, mientras que el tejido tumoral tiene una capa endotelial alterada, lo que permite que las partículas más grandes "se filtren" en el dominio extracelular del tumor;

La Figura 8 proporciona una representación de uno de los liposomas preferidos de la invención, el liposoma A, un nuevo liposoma Activo en IRM con utilidad en la obtención de imágenes del tumor;

La Figura 9 representa las estructuras de los lípidos que forman uno de los liposomas preferidos de la invención, el liposoma A;

La Figura 10 muestra la influencia de los lípidos de colesterol sobre la permeabilidad y la rigidez de la bicapa del liposoma.

Figura 11 muestra la distribución del tamaño de las partículas de liposoma A;

La Figura 12 muestra los resultados del ensayo de viabilidad celular MTT en células LCC PK1 de riñón utilizando las partículas de liposoma A de la presente invención a diversas dosis y tres periodos de incubación;

La Figura 13 muestra los resultados del ensayo de viabilidad celular MTT en células hepáticas HepG2 utilizando las partículas de liposoma A de la presente invención a diversas dosis y tres periodos de incubación;

La Figura 14 muestra los resultados obtenidos del ensayo LDH en células LCC PK1 de riñón utilizando las partículas de liposomas A de la presente invención a diversas dosis y tres periodos de incubación;

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos en el ensayo LDH en células hepáticas HepG2 utilizando las partículas de liposoma A de la presente invención a diversas dosis y tres periodos de incubación;

La Figura 16 presenta imágenes de resonancia magnética de ratones portadores de tumores en diversos periodos después de la inyección con una preparación que comprende liposoma A, donde los círculos blancos de puntos marcan el área del tumor y la flecha blanca apunta a la localización del tumor;

La Figura 17 muestra un gráfico del % de intensidad de la señal tumoral a diversos puntos temporales TR después de la administración del liposoma A durante el experimento de RMI de 24 horas donde se obtuvieron imágenes de la Figura 16;

La Figura 18 muestra un gráfico del incremento de la intensidad de la señal tumoral con el tiempo después de la administración del liposoma A durante el experimento de RMI de 24 horas donde se obtuvieron imágenes de la Figura 16;

La Figura 19 muestra los resultados de la microscopia de fluorescencia en seccionadas de tumores IGROV-1 tras la administración del liposoma A; en el panel de la izquierda se muestra una imagen de fluorescencia, mientras que en el panel de la derecha se representa una tinción con H y E (X 400));

La Figura 20 proporciona una representación de uno de los liposomas preferidos de la invención, el liposoma B, un nuevo liposoma Activo en IRM que tiene un resto receptor de folato y que tiene utilidad en la obtención de imágenes del tumor;

La Figura 21 representa las estructuras de los lípidos que forman uno de los liposomas preferidos de la invención, el liposoma B;

La Figura 22 muestra los resultados del análisis FACS de cuatro líneas celulares de expresión de α -FR;

La figura 23 es un gráfico que establece la cantidad de Gd absorbida por las células IGROV-1 después de la incubación con el Liposoma B con diferentes % mol del lípido dirigido al folato;

La Figura 24 presenta datos sobre las distribuciones del tamaño y polidispersidad del Liposoma B;

La Figura 25 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de MTT con partículas del Liposomas B a diversas dosis y tres periodos de incubación en células PK1 LCC;

La Figura 26 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad de LDH con partículas del Liposomas B a diversas dosis y tres periodos de incubación en células PK1 LCC;

La Figura 27 presenta imágenes de resonancia magnética de ratones portadores de tumor en diversos periodos después de la inyección con una preparación que comprende el Liposoma B, en las que los círculos blancos de puntos marcan la localización del tumor;

La Figura 28 muestra un gráfico del % de intensidad de la señal tumoral a diversos puntos temporales TR después de la administración del liposoma A durante el experimento de RMI de 24 horas donde se obtuvieron imágenes de la Figura 27 (n=3); y

La Figura 29 muestra los resultados de la microscopia de fluorescencia en seccionadas de tumores IGROV-1 tras la administración del Liposoma B; en el panel de la izquierda se muestra una imagen de fluorescencia, mientras que en el panel de la derecha se representa una tinción con H y E (X 400));

Los prometedores datos de relajación en T_1 de Gd.DOTA.DSA condujeron al desarrollo de formulaciones de liposomas de gadolinio usando Gd.DOTA.DSA, para la circulación sistémica *in vivo*, con el objetivo de la formación imágenes de tumores mediante IRM, usando el efecto ampliamente indicado de permeación y retención (EPR) potenciadas. Esto condujo al desarrollo de nuevos sistemas liposómicos de Gd.DOTA.DSA de liposomas de la presente invención que se caracterizan por que dicho liposoma comprende adicionalmente un componente fosfolípido neutro totalmente saturado.

Sorprendentemente, los autores han descubierto que mediante la incorporación de un componente fosfolípido neutro totalmente saturado en los sistemas liposómicos de Gd.DOTA.DSA de la presente invención, los liposomas resultantes son más pequeños y dan preparaciones de liposomas más homogéneas que tienen propiedades ideales para su uso en la preparación de agentes de contraste de resonancia magnética como resultado.

Los fosfolípidos neutros totalmente saturados apropiados adecuados para su uso en la construcción de liposomas Gd.DOTA.DSA de la presente invención son, típicamente, 1,2-di(lípido C_{12} - C_{20} saturado)-*sn*-glicero-3-fosfocolinas. Los ejemplos más preferidos incluyen los lípidos 1, 2-diesterail-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC) o 1, 2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC). La 1,2-diesterail-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC) es la más preferida. Típicamente, la cantidad de componente fosfolípido totalmente saturado en dicho liposoma es de 32 a 34 % molar del total de la formulación de liposomas, y, lo más preferentemente, es 33 % molar. Típicamente, la cantidad de componente Gd.DOTA.DSA en dicho liposoma es de 29 a 31 % molar del total de la formulación de liposomas, y, lo más preferentemente, es 30 % molar.

Típicamente, los liposomas tienen un tamaño de 100 nm o menos. Mediante nanoingeniería cuidadosa de los liposomas de esta manera para asegurar que su tamaño permanece por debajo de 100 nm, este intervalo de tamaños se considera óptimo para la acumulación de liposomas en los tumores sólidos, debido a las características del tejido tumoral. Se considera que el tejido tumoral posee una afinidad universal por agentes macromoleculares, lo que se denomina el efecto de permeación y retención potenciado (EPR), de modo que los agentes macromoleculares se acumulan en el tejido tumoral. El EPR fue introducido por primera vez por Maeda *et al.*,¹³ en el presente documento; se cree que las propiedades tumorales, tales como una angiogénesis incrementada, una infraestructura vascular heterogénea y destructiva, drenaje linfático alterado u una capa endotelial "con fugas" son todos ellos factores que contribuyen a la acumulación de estructuras macromoleculares dentro del tejido del tumor (véase la Figura 7). Como se explica e ilustra más adelante, esto proporciona ventajas particulares sustanciales sobre los liposomas activos de IRM de la técnica anterior y agentes de contraste paramagnéticos no liposómicos como resultado.

El efecto EPR se ha convertido en un modelo estándar para la focalización de fármacos macromoleculares y macromoléculas poliméricas o liposómicas a tumores. Estos agentes se adaptan fácilmente para la obtención de imágenes de tumores a través de su modificación para incluir una sonda de imagen o resto para la localización de la señal. El mecanismo clave aquí, siendo la retención de las macromoléculas en tumores sólidos, en contraste con los agentes de bajo peso molecular, tales como Gd.DTPA (MagnevistTM), que se recirculan hacia la sangre a través de difusión y se eliminan a través de los riñones en periodos relativamente cortos después de la inyección. Este efecto de retención o acumulación de partículas dentro del tejido tumoral también se conoce como focalización pasiva y se ha demostrado que debido a este fenómeno eficaz se pueden acumular niveles muy altos (10-50 veces) de fármacos poliméricos en las zonas tumorales dentro de unos días.¹⁴ El mecanismo de la acumulación tumoral de nanopartículas en el tejido tumoral se ha establecido como la extravasación de moléculas grandes a través del revestimiento alterado del endotelio de los vasos sanguíneos del tumor. Además de cumplir con el umbral de tamaño de extravasación del tumor, una razón más para que el tamaño del liposoma se mantenga dentro del intervalo de 100 nm para inyecciones *in vivo* se debe al aclaramiento de grandes liposomas a través del hígado. Los liposomas grandes son absorbidos por las células del hígado, que incluyen hepatocitos y células de Kupffer, las partículas de

liposomas pueden acumularse en el tejido del hígado o en el bazo, debido al mayor revestimiento endotelial en estos órganos.

El colesterol se puede incorporar preferentemente en la formulación ya que este lípido induce diversos efectos sobre la bicapa liposomal. Se ha demostrado que el colesterol aumenta el espaciado del grupo de cabeza en las formulaciones de liposomas y estabiliza las membranas de bicapa resultantes.⁹ En el presente documento, la presencia de colesterol en la formulación de liposomas controla la permeabilidad de la membrana de ambas bicapas de fluidos y rígidas mediante la inducción de la ordenación conformacional de las cadenas de lípidos (Figura 10). Además, el colesterol puede reducir la agregación inducida por el suero como resultado directo de su carga neutra.

¹⁰ Típicamente, la cantidad de componente de colesterol en dicho liposoma es del 29 al 31% molar del total de la formulación de liposomas y, lo más preferentemente, es 30 % molar.

Con el fin de prolongar el tiempo de circulación de las nanopartículas de liposomas para asegurar la máxima exposición del tumor, el polietilenglicol (PEG) también puede anclarse en la bicapa del liposoma usando una construcción fijada de polietilenglicol fosfolípido. Ejemplos de polietilenglicol-fosfolípidos preferidos para su uso en los liposomas de la invención incluyen DSPE-PEG(2000) [diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol (2000)]. Se ha demostrado que los liposomas que llevan una superficie decorada con polímero hidrófilo de PEG neutro se benefician de tiempos de circulación prolongados con semividas notificadas de 2 a 24 horas en roedores, y tan altas como de 45 horas en seres humanos. La teoría en el presente documento es que los liposomas de PEG injertados en la superficie han reducido la captación por las células hepáticas, ya que los liposomas no están unidos con eficacia a las proteínas plasmáticas. Estos liposomas también se denominan liposomas estéricamente estabilizados. En el presente documento, la capa de PEG inhibe estéricamente ambas interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de los componentes del plasma con la bicapa del liposoma. Típicamente, la cantidad de componente polietilenglicol-fosfolípido en dicho liposoma es de 5 a 8 % molar del total de la formulación de liposomas, y, lo más preferentemente, es 7 % molar.

Para fines *in vivo*, se han incorporado fosfolípidos totalmente saturados con grupos de cabeza neutros en la formulación de liposomas; como se ha descrito anteriormente, estos incluyen, pero no se limitan a, los lípidos 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DSPC) o 1, 2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DMPC). La utilización de lípidos neutros, además de la incorporación de entre 5-10 relaciones molares de un lípido PEGilado en la formulación de liposomas, ofrece estabilización estérica y protección de las proteínas plasmáticas de la sangre tales como opsoninas, y conduce a la reducción de la absorción por las células de Kupffer. Se cree que la estabilización se produce por la formación de escudos altamente hidratados de moléculas de polímero alrededor de la superficie del liposoma. Debido a esta característica de "blindaje", estos tipos de liposomas se a menudo se denominan liposomas "Sigilosos".

En una realización adicional de la presente invención, los liposomas de la presente invención pueden incorporar además un agente dirigido a tumores. Los liposomas de la presente invención que comprenden un agente dirigido a tumores típicamente comprenden un ligando para un receptor que está sobreexpresado en las células tumorales respecto a la expresión de dichos receptores en las células de tejido no tumoral de los mamíferos.

Un ejemplo de un agente dirigido a tumores de este tipo es uno que comprende un resto de folato. En ejemplos preferidos de la presente invención, el agente dirigido a tumores es un compuesto de fosfolípido-polietilenglicol-folato. Más preferentemente, el compuesto fosfolípido-polietilenglicol-folato es DSPE-PEG (2000)-Folato [diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol (2000) -folato].

Típicamente, la cantidad del resto de folato presente en el liposoma es 1 -2 % molar del total de la formulación de liposomas.

Como ejemplo de agentes dirigidos a tumores, el folato es un buen ejemplo de dicho resto dirigido; ya que los sistemas de focalización basados en folato presentan un medio eficaz liberar de forma selectiva en los tumores agentes terapéuticos o de obtención de imágenes.¹⁵ Se ha demostrado que los tumores agresivos o indiferenciados en una etapa avanzada tienen una mayor densidad de receptores de folato (RF), lo que indica que la terapia del cáncer podría beneficiarse del enfoque amplio que ofrece la liberación de fármacos mediados por FR.¹⁶ Los RF se sobreexpresan en varios tipos de cáncer, tales como cáncer de cerebro, de riñón, de pulmón y de mama, y, en particular, en carcinomas epiteliales tales como cánceres de ovario.¹⁷ El ligando de los FR, folato (o ácido fólico), es una vitamina que se utiliza para la biosíntesis de los nucleótidos y se utiliza en niveles altos para satisfacer las necesidades de las células cancerosas en proliferación.¹⁸

Además de los numerosos esfuerzos para la liberación de fármacos, la tecnología dirigida al folato ha sido aplicado con éxito a la radioobtención de imágenes de agentes terapéuticos,¹⁹ imágenes de fluorescencia de células de cáncer,²⁰ agentes de contraste para IRM,²¹ y liposomas de gadolinio.²² Choi et al., han demostrado el uso de nanopartículas de óxido de hierro dirigidas a folato para la obtención de imágenes de tumores inducidos por KB y demostraron que estas partículas tenían un aumento de la intensidad de señal del 38 % en comparación con los controles.²³ Recientemente se ha mostrado el éxito de la IRM tumoral con un agente de contraste liposomal bimodal no dirigido, de modo que se observó que liposomas bimodales paramagnéticos y fluorescentes de un tamaño ~

100 nm se acumulaban en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de ovarios.²⁴ Los liposomas se pueden acumular dentro del tejido tumoral debido al efecto de permeación y retención (EPR) potenciado ampliamente notificado que depende de la acumulación pasiva de macromoléculas coloidales de ~ 40 kDa y superiores en los tumores.²⁵ El efecto EPR surge debido al endotelio aberrante del tumor que, como resultado de sus "fugas" permite la penetración de nanopartículas en el tejido tumoral. La acumulación de liposomas en el tejido tumoral podría mejorarse a través del uso de restos dirigido a los receptores que están posconjugados en la superficie de los liposomas, o unidos a los lípidos que se incorporan dentro de la bicapa liposomal. Dado que la afinidad de unión RF ($K_d = 1 \times 10^{-10}$ M) no parece verse afectada cuando su ligando, ácido fólico, se conjuga con un agente de imagen o resto terapéutico a través de su γ -carboxilo,²⁶ un ligando de folato atado en el extremo distal de un PEG lipídico anfifílico permite el desarrollo de un sistema liposomal dirigido a FR.

La línea celular de carcinoma nasofaríngeo humano KB se considera que tiene el nivel de expresión de RF más alto, aunque el número de casos de este tipo de cáncer es bajo en comparación con el cáncer de ovarios, que tiene la frecuencia más alta (> 90 % de los casos).²⁷ En particular, la isoforma α -FR, que es una proteína de membrana anclada por glicosil fosfatidilinositol (GPI), se expresa altamente en el carcinoma de ovarios.²⁸ Además, también se ha demostrado que la isoforma α -RF tiene valor de biomarcador específico, lo que ayuda a la identificación del origen del sitio del tumor metastásico.²⁹ Por lo tanto, los inventores estaban interesados en utilizar este receptor con el fin de probar la eficacia de los liposomas bimodales dirigidos a folato para la obtención de imágenes de tumores de ovarios usando IRM. La liberación de fármacos liposomales basados en folato se ha estudiado ampliamente,³⁰ sin embargo, el efecto de potenciación de la tasa de acumulación de liposomas en los tumores debido a la focalización al folato no se ha estudiado de forma dinámica en tiempo real en gran medida. La potenciación eficaz de la señal del tumor se ha previsto, ya que los RF se expresan en cantidades significativamente menores en el tejido normal, limitados principalmente a los túbulos renales, el epitelio pulmonar, y el tejido de la placenta.³¹ Para evaluar el valor de la adición de un ligando dirigido sobre la velocidad y la extensión de la acumulación de liposomas en los tumores sólidos, en la presente invención se han formulado liposomas fluorescentes y paramagnéticos bimodales dirigidos a los RF y se comparan con los liposomas no dirigidos mediante tanto IRM como microscopia de fluorescencia. Los inventores han descubierto que dan muy buenos resultados con baja toxicidad, excelente potenciación de la señal de RM específica y, después de la rápida acumulación en el tumor inicialmente, después, un aclaramiento rápido y natural de los agentes de contraste del cuerpo.

En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona también un agente de contraste de resonancia magnética que comprende liposomas de acuerdo con una cualquiera de los aspectos primero y segundo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Típicamente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un vehículo acuoso tal como una solución tamponada con HEPES [ácido (4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-etanosulfónico].

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un agente de resonancia magnética de acuerdo con el tercer aspecto para su uso en medicina, preferentemente para su uso en el diagnóstico y en particular preferentemente para su uso en la obtención de imágenes de órganos y de estructuras de órganos (por ejemplo, tumores).

En un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos primero y segundo de la invención en la preparación de un agente de contraste de resonancia magnética para potenciar las imágenes de resonancia magnética de los órganos y estructuras de órganos en un mamífero. Los liposomas de la presente invención son de uso particular en la preparación de un agente de contraste de resonancia magnética para potenciar una imagen de resonancia magnética de un tumor en un mamífero.

Como ya se ha descrito anteriormente, y se ilustra adicionalmente más adelante, los liposomas paramagnéticos de la presente invención tienen propiedades superiores debido a su tamaño óptimo (aumento de la acumulación en tumores debido al efecto EPR y la toxicidad hepática reducida debido a la reducción de la absorción por las células de Kupffer), mayor estabilidad, quelación de gadolinio más fuerte mientras que su naturaleza no iónica reduce las consecuencias fisicoquímicas que previamente se han observado con los agentes de contraste de gadolinio iónico donde un exceso de carga negativa conduce a reacciones competitivas *in vivo* y desplazamiento de Gd^{3+} . Como consecuencia de ello, los agentes de contraste de resonancia magnética de la presente invención proporcionan ventajas sustanciales y sorprendentes sobre los agentes de contraste paramagnético de gadolinio de la técnica anterior, ya que tienen una excelente capacidad de potenciación de la imagen, mientras que al mismo tiempo muestran un perfil de seguridad muy mejorado debido a la dosis reducida de gadolinio que se requiere porque los liposomas de gadolinio de la presente invención se acumulan gradualmente en los tejidos tumorales sin acumularse en otros órganos, particularmente en el hígado. Como resultado de la mayor eficacia combinada con la menor toxicidad, los agentes de contraste de la presente invención pueden ofrecer un alcance más amplio de obtención de imágenes dirigida por resonancia magnética en la clínica de los agentes conocidos hasta la fecha.

Típicamente, la concentración de los liposomas en los agentes de contraste de resonancia magnética de la invención es 1 -50 mg / ml, más preferentemente 1 -30 mg / ml. Ejemplos de un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en la preparación de los agentes de contraste de resonancia magnética es un vehículo acuoso tal como HEPES.

En un sexto aspecto de la presente invención, también se proporciona un método de obtención de imágenes de resonancia magnética de un órgano o estructura de órgano en un mamífero, que comprende las etapas de:

(a) administrar a un paciente agente de contraste de resonancia magnética de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención; y

(b) tomar imágenes del órgano de interés en el paciente.

Una vez más, por lo general el método se utiliza para potenciar una imagen de resonancia magnética de un tumor en un mamífero. Normalmente, los inventores usan una concentración de liposomas en el agente de contraste de resonancia magnética de la invención es 1 -50 mg / ml, más preferentemente 1 -30 mg / ml.

La presente invención puede entenderse mejor con referencia a los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1 Liposoma A

El liposoma A se representa en la Figura 8. El liposoma A es un nuevo liposoma Activo para IRM con capacidad de obtención de imágenes del tumor, como se demostrará a continuación.

La formulación del liposoma A consiste en Gd.DOTA.DSA / DSPC / colesterol / DSPE_PEG2000: 30/33/30/7 % mol. Para los estudios histológicos preclínicos, a la formulación también se añade un 1 % molar de DOPE-Rodamina se usa un 32 % molar de DSPC.

El liposoma A se desarrolló para observar la potenciación de la señal del tejido tumoral *in vivo* mediante IRM. Las estructuras de los lípidos que comprenden este sistema de liposomas se muestran en la Figura 9. La potenciación de la señal de IRM se logra mediante la incorporación del lípido paramagnético Gd.DOTA.DSA en la formulación de liposomas.

Caracterización del liposoma A

Antes de los ensayos de toxicidad, se midió la distribución del tamaño de las partículas según la Figura 1. En la Figura 11, los tamaños de partícula de liposoma A en varias diluciones de PBS se muestran en el gráfico inferior mientras que los de la partícula de control se muestran en la parte superior del gráfico. La formulación del liposoma A consiste en Gd.DOTA.DSA / DSPC / colesterol / DSPE_PEG2000: 30/33/30/7 % molar y la nanopartícula control es DOTA.DSA / DSPC / colesterol / DSPE_PEG2000: 30/33/30/7 % molar. NOTA: Los picos a 1000 nm + se eliminan después de la filtración a través de filtros de 0,2 µm (datos no mostrados).

Tanto el liposoma A como la partícula de control (sin Gd quelado con el grupo de cabeza DOTA) eran extremadamente estables y se dimensionaron por debajo de 100 nm a varias diluciones en PBS. La partícula también tuvo un índice polidispersidad muy bajo, lo que indica una muestra uniforme y homogénea.

Los tamaños medidos para el liposoma A son más pequeños que los liposomas de DOPC publicados anteriormente y el índice de polidispersidad (PDL) es también mucho menor que los medidos para la misma formulación que contiene DOPC (véase la Tabla 2). Esto indica que la nueva formulación DSPC ofrece una distribución de tamaño más pequeño, que es más favorable para el aclaramiento hepático de los liposomas y la acumulación gradual dentro del tejido tumoral, y también un índice de polidispersidad inferior confirma una muestra más homogénea y uniforme de los liposomas.

Tabla 2. Liposomas PEGilados neutros formulados con DOPC.

Formulación liposómica (% mol)						
Gd.DOTA.DSA	DOPC	Colesterol	DOPE-Rodamina	DSPE-PEG ₂₀₀₀	Tamaño inicial (nm)	PI
30	34	30	1	5	104,9 ± 34,6	0,420
30	33	30	1	6	114,5 ± 45,3	0,201
30	32	30	1	7	104,3 ± 36,8	0,309

Investigaciones toxicológicas *in vitro*

La toxicidad *in vitro* de los liposomas A y la nanopartícula de control de la misma composición pero sin Gd quelado en el macrociclo DOTA se evaluó utilizando los ensayos de toxicidad MTT y LDH. Los liposomas se formulan en tampón [20 mM HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1 ácido -piperazinetasulfónico, pH 6,8, NaCl 150 mM) en un concentración total de 25 mg ml⁻¹.

Ensayo MTT de viabilidad celular

La determinación de la proliferación y la viabilidad celular son áreas clave evaluadas para ensayos *in vitro* de la respuesta de una población de células a factores externos, por lo tanto, un ensayo de MTT se llevó a cabo para medir el efecto de liposomas A sobre la viabilidad celular. El ensayo de MTT mide la tasa de proliferación celular y a la inversa, cuando los acontecimientos metabólicos conducen a apoptosis o necrosis, la reducción de la viabilidad celular (equilibrio entre proliferación y muerte celular). Este ensayo implica la reducción de sales de tetrazolio por enzimas deshidrogenasas mitocondriales. El tetrazolio amarillo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio) se convierte en el producto púrpura Formazán, por las células metabólicamente activas, a través de la acción de las enzimas deshidrogenadas. El formazán púrpura intracelular resultante puede solubilizarse y cuantificarse mediante espectrofotometría. De esta manera se puede medir y cuantificar la viabilidad de las células en presencia de los liposomas de gadolinio añadido.

-5 Dos líneas celulares, células de riñón LLC-PK1 y células hepáticas Hep G2, se sembraron a $2,5 \times 10^4$ células / ml en placas de 96 pocillos y se incubaron en medio de crecimiento durante 24 h antes del ensayo. Después, el liposoma A se añadió a las células a una concentración de $0,004 - 1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ y las células se incubaron durante 6, 24, y 48 horas. La citotoxicidad se determinó y los datos se presentan en la Figura 12.

El ensayo de viabilidad MTT en células de riñón LLC PK1 reveló un buen nivel de viabilidad celular, después de la adición de los liposomas, y se demostró que la viabilidad caía solo en los períodos de incubación y de dosis más altas. La toxicidad del liposoma A es menor que la nanopartícula control, este efecto se debe, quizá, a los ácidos carboxílicos del grupo de cabeza de DOTA, que en la formulación del liposoma A, está quelado a Gd^{3+} , y, por lo tanto, se convierte en neutro y relativamente inerte dentro del entorno celular.

La viabilidad celular de HepG2 se vio mínimamente afectada como resultado de la adición del Liposomas A o la nanopartícula de control (Figura 13). Sin embargo, la toxicidad del liposoma A era más baja que la de la nanopartícula de control, donde se observaron reducciones de la viabilidad celular a la dosis más alta y a los períodos de incubación más largos (gráfico superior, Figura 13).

Ensayo de citotoxicidad con lactato deshidrogenasa (LDH)

El ensayo de LDH es un ensayo de citotoxicidad colorimétrico no radiactivo que mide cuantitativamente la LDH, que es una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular durante la muerte de la célula. La cantidad de LDH liberada en el medio celular se mide con un ensayo enzimático acoplado de 30 minutos, lo que tiene como resultado la conversión de una sal de tetrazolio (INT) en un producto de formazán rojo. La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas y, por lo tanto, muertas. Después, los resultados se normalizan contra los controles, tal como la LDH liberada de las células sin compuestos añadidos a ellas. La Figura 14 presenta los resultados del ensayo NCL LDH en células de riñón PK1 LLC para la nanopartícula control y el liposoma A.

Los datos de la Figura 14 muestran que la toxicidad celular es baja en el intervalo de dosis y el período de incubación menores (4 horas). El liposoma A parece menos tóxico cuando se compara con la nanopartícula control.

La citotoxicidad de los liposomas de control es más variable para las nanopartículas de control y parece que estas partículas son más tóxicas para las células hepáticas HepG2 (Figura 15, arriba) que el liposoma A. La toxicidad para HepG2 y, por lo tanto, la toxicidad hepática del liposoma A parece bastante baja a todas las concentraciones y períodos de incubación. Estos datos confirman una toxicidad general baja para el liposoma A.

Obtención de Imágenes de tumores *in vivo*

Los tumores en ratón de cáncer humano son un buen modelo para las investigaciones preliminares de agentes de imagen y su eficacia como potenciadores de la señal tumoral. La línea celular de cáncer de ovarios humano IGROV-1 se usó para inducir tumores en ratones Balb / c atímicos. En el presente documento, las células se inyectaron debajo los flancos derechos de ratones hembra de 6-8 semanas de edad y, después de dos semanas, en los ratones habían crecido suficientes tumores grandes adecuados para la obtención de imágenes. Se prepararon partículas de liposoma A en tampón HEPES y se inyectaron a través de la vena de la cola de los ratones portadores de tumores, un método que asegura la rápida entrada de los liposomas en la circulación sanguínea. Antes de la inyección, se obtuvieron imágenes de IRM basales en un imán 4,7 T con el fin de identificar el tumor y medir los valores de la intensidad de la señal basales. Después de la inyección de los liposomas, se sometieron a las pruebas de imagen a los ratones 2 horas, 16 horas y 24 horas después de la inyección. Se obtuvieron imágenes ponderadas en T_1 para cada punto de tiempo y la potenciación de la intensidad de la señal en porcentaje como resultado de la acumulación de los liposomas dentro del tejido tumoral se calculó a partir de los valores de intensidad de la señal del tumor generados a partir del tejido tumoral (véase la Figura 16).

La Figura 16 presenta las imágenes de RM de ratones portadores de tumores, el tumor aparece oscuro antes de la inyección de liposoma A, y se potencia después de la administración de los liposomas. Este efecto es persistente hasta el punto final de 24 horas de experimento. La potenciación de la señal tumoral del liposoma A se confirma

adicionalmente mediante la Figura 17, donde a diferentes puntos temporales TR, se observa que la intensidad de la señal tumoral aumenta de forma constante con el tiempo, lo que confirma la acumulación gradual del liposoma A en el tumor debido al efecto EPR.

5 Cuando estos datos se representan como un aumento de la intensidad de la señal tumoral en la figura 18, se puede ver que la intensidad de la señal aumenta en 24 horas, y que se consigue un aumento del 72 % de la señal hasta el punto final de 24 horas del experimento. Estos datos son muy impresionantes y demuestran la utilidad del liposoma A de acuerdo con la presente invención como un agente de obtención de imágenes tumorales dirigido "pasivo".

10 A las 24 horas de la inyección, se sacrificó a los ratones y se extirparon los tumores. Los tumores fueron congelados, se fijaron y se sometieron a crioseccionamiento, de modo que se cortaron secciones de 7 m y los portaobjetos se analizaron para detectar la fluorescencia utilizando un microscopio. La inclusión del rojo del lípido fluorescente rojo DOPE-Rodamina en la formulación de liposoma A permitió la evaluación bimodal de la localización de los liposomas en el tejido tumoral.

15 Como era de esperar en vista de los estudios de IRM, el análisis histológico de las secciones de tumor reveló un nivel muy alto de señal de fluorescencia en el tejido tumoral (véase la Figura 19). Se pudo observar la aparición de señales de hiperfluorescencia dentro del tejido tumoral. Estos resultados de intensidad de fluorescencia proporcionaron congruencia visual cualitativa con las imágenes de RM y validaron la acumulación del liposoma A dentro de los tumores de xenoinjertos. El tejido tumoral tiene microvasos con grandes fenestraciones y, como tales, los liposomas son capaces de extravasarse hacia el tumor. Estos liposomas extravasados no se eliminan debido a un sistema de drenaje linfático deteriorado y pueden acumularse dentro del fluido extracelular del tumor con el tiempo.

25 **Conclusión**

El liposoma A es una nueva formulación de nanopartículas en liposoma que es capaz de formar imágenes de eficaces de los tumores mediante IRM. La incorporación de DSPC, un fosfolípido totalmente saturado para su uso en los liposomas Gd.DOTA.DSA de la presente invención da excelentes resultados. Los resultados demuestran claramente que el liposoma A tiene toxicidad hepática baja y una actividad muy alta de potenciación de la señal de IRM. Se cree que esto se debe al tamaño óptimo del liposoma A, un típico liposoma Gd.DOTA.DSA de la presente invención, ya que es lo suficientemente pequeño como para acumularse en el tumor debido al efecto EPR y este tamaño más pequeño también evita que se acumule en el hígado en particular, debido a la reducción de la absorción por las células de Kupffer.

35 **Ejemplo 2 Liposoma B**

En otro experimento, se desarrolló otro liposoma Activo en IRM dirigido a tumores denominado en lo sucesivo Liposoma B.

40 El Liposoma B es una nueva nanopartícula de liposomas dirigida a tumores para IRM. Como parte de las investigaciones en liposomas dirigidos, los inventores han desarrollado el liposoma paramagnético dirigido a folato, Liposomas B (véase la representación de liposoma B en la Figura 20), que mostró una mayor acumulación en un modelo de tumor que expresa receptores de folato. Las partículas se formularon para garantizar una distribución del tamaño de aproximadamente 100 nm con un índice de polidispersidad bajo. Se usaron células IGROV-1 para inducir tumores en ratones atímicos Balb / c y los liposomas dirigidos a folato se inyectaron por vía intravenosa. Se observó una acumulación rápida de los liposomas dirigidos a folato dentro del tejido tumoral en comparación con los liposomas no dirigidos. La formulación del liposoma B es similar a la del liposoma A, con la excepción de que el porcentaje molar del lípido sigiloso DSPE-PEG2000 se reduce en un 1,5 % molar con el fin de incorporar el anfífilo a dirigir: DSPE-PEG-2000(Folato) [diestearoilfosfatidiletanolamina-poli-etilenglicol (2000)-folato] (véase la Figura 21 para la composición de partículas).

La línea celular de carcinoma nasofaríngeo humano KB se considera que tiene el nivel de expresión de RF más alto, aunque el número de casos de este tipo de cáncer es bajo en comparación con el cáncer de ovarios, que tiene la frecuencia más alta (> 90 % de los casos).²⁷ En particular, la isoforma α -FR, que es una proteína de membrana anclada por glicosil fosfatidilinositol (GPI), se expresa altamente en el carcinoma de ovarios.²⁸ Además, también se ha demostrado que la isoforma α -RF tiene valor de biomarcador específico, lo que ayuda a la identificación del origen del sitio del tumor metastásico.²⁹ Por lo tanto, los inventores estaban interesados en utilizar este receptor con el fin de probar la eficacia de los liposomas bimodales dirigidos a folato para la obtención de imágenes de tumores de ovarios usando IRM. La liberación de fármacos liposomales basados en folato se ha estudiado ampliamente,³⁰ sin embargo, el efecto de potenciación de la tasa de acumulación de liposomas en los tumores debido a la focalización al folato no se ha estudiado de forma dinámica en tiempo real en gran medida. La potenciación eficaz de la señal del tumor se ha previsto, ya que los RF se expresan en cantidades significativamente menores en el tejido normal, limitados principalmente a los túbulos renales, el epitelio pulmonar, y el tejido de la placenta.³¹ Para evaluar el valor de la adición de un ligando dirigido sobre la velocidad y la extensión de la acumulación de liposomas en los tumores sólidos, en la presente invención se han formulado liposomas fluorescentes y paramagnéticos bimodales

dirigidos a los RF y se compararon con los liposomas no dirigidos mediante tanto IRM como microscopia de fluorescencia.

Con el fin de establecer si la línea celular IGROV-1, una línea celular de carcinoma de ovarios humano expresa un nivel suficiente de receptores de folato, se llevó a cabo el análisis FACS de cuatro líneas celulares diferentes. Para estos fines, se eligió la isoforma del receptor de α -folato receptor (α -FR), que es un transportador de folato con niveles de expresión restringidos en los tejidos normales. Para medir los niveles de expresión de α -RF de las líneas de células de ovarios humanos IGROV-1, OVCAR-3 y células HeLa (cáncer cervical), se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo. Además de estas líneas celulares también se analizó una línea celular de cáncer de mama (SKBR-3) como una línea celular de control negativo sin expresión de α -FR. Las células fueron cultivadas en medios libres de ácido fólico y se incubaron con suero para bloquear las interacciones no específicas. Se llevó a cabo inmunotinción con un anticuerpo monoclonal (MAb Mov18 / ZEL) específico del α -FR, y después de la incubación con este anticuerpo, se dejó incubar un anticuerpo secundario marcado con FITC (anticuerpo IgG de cabra, conjugado con FITC) con las células. Después de la tinción, las células se fijaron y se analizaron mediante microscopia de fluorescencia. A partir del análisis de α -RF con FACS (véase la Figura 22), donde todas las líneas celulares se cultivaron en las mismas condiciones estandarizadas utilizando medio de cultivo celular libre de folato, se demostró que la línea celular IGROV-1 exhibía un nivel claramente más elevado de expresión de α -FR. A partir de estos datos típicos de FACS, la expresión α -RF se midió en el orden de: IGROV-1>>OVCAR-3>HeLa>SKBR-3 (tres días después de la siembra).

Después de haber establecido la sobreexpresión de α -RF en la línea celular IGROV-1, los liposomas de liposoma B dirigido se prepararon para determinar la unión específica al receptor celular y la absorción en células IGROV-1 de cáncer de tumor.

El porcentaje de anfífilo dirigido a folato se optimizó inicialmente antes de la obtención de imágenes de RM. La Tabla 3 muestra una serie de liposomas con diferentes anfífilos de folato formulados para la incubación con las células IGROV-1.

Tabla 3. Formulación de liposoma BTM con varios % molar de lípido dirigido DSPE-PEG2000

Liposomas usados en los experimentos de optimización del ligando de folato						
Gd.OOTA.DSA (% molar)	DSPC (% molar)	Col. (% molar)	DSPE-PEG2000 (% molar)	DSPE-PEG2000 (folato) (% molar)	Tamaño (nm)	PI
30	33	30	6,99	0,01	134,33 ± 9,07	0,401 ± 0,207
30	33	30	6,97	0,03	112,36 ± 3,164	0,266 ± 0,094
30	33	30	6,5	0,5	103,46 ± 12,70	0,377 ± 0,337
30	33	30	5,5	1,5	146,3 ± 3,897	0,602 ± 0,141
30	33	30	4	3	84,766 ± 9,729	0,960 ± 0,487
30	33	30	7	0	79,3 ± 1,997	0,424 ± 0,186

Para los experimentos de optimización de ligando, se añadieron liposomas de Liposoma B mostrados en la Tabla 3 a las células IGROV-1 en cultivo y se incubaron durante 6 horas. Después de este período de incubación, las células se lavaron, se lisaron y se sometieron a mediciones ICP-MS para determinar su contenido en ^{157}Gd . La Figura 23 presenta los datos obtenidos. A partir de estos datos se puede observar que la formulación de liposomas con la mayor captación en células IGROV-1 es la que contiene 1,5 % molar de DSPE-PEG-2000 (folato). Los trabajos anterior publicados de los inventores utilizaron liposomas PEGilados neutros que incorporaron DOPC, y un 3 % molar de PEG-DSPE-2000 (folato) dirigidos a ligando, sin embargo, el liposoma B requiere la mitad del ligando dirigido, lo que reduce drásticamente los costes de producción. Por lo tanto, se puede ver que esta reducción de costes debido a la necesidad de solo la mitad de la cantidad de ligando dirigido representa una ventaja adicional proporcionada por el uso de fosfolípidos totalmente saturados tales como DSPC en los liposomas de la presente invención.

El liposoma B es una nueva formulación que incorpora una relación optimizada de los ligandos dirigidos, establecida utilizando la misma línea celular de la que crecieron los tumores para los experimentos de obtención de imágenes de RM *in vivo*.

Después de haber optimizado la relación ligando dirigido de los liposomas con Liposoma B, los liposomas se caracterizan después por su tamaño y distribución. La Figura 24 presenta datos sobre la caracterización del tamaño de partículas de Liposoma B. Las partículas tienen un tamaño medio de aproximadamente 100 nm, teniendo las

partículas filtradas un excelente índice de polidispersidad.

Toxicidad *in vitro*

Los ensayos de MTT en células de riñón LLC PK1 se realizaron en liposomas con el Liposoma B y la viabilidad celular no se vio afectada en gran medida en la mayoría de las dosis y los tiempos de incubación (véase la Figura 25). El período de incubación y la dosis más altos dio lugar a una reducción de la viabilidad celular, lo que indica que el intervalo de dosis óptimo estaba entre 0,001 y 0,5 mg / ml. Los datos del ensayo de LDH se presentan en la Figura 26, los efectos de la toxicidad del Liposomas B en el presente documento parecen ser mucho más pronunciados en el período de incubación de 48 horas.

Capacidad de relajación de los liposomas con liposoma B

La capacidad de relajación de los liposomas con Liposoma B se midió mediante la formulación de liposomas con concentraciones variables del lípido Gd.DOTA.DSA para obtener 5 formulaciones con concentraciones de Gd atómico dentro del intervalo de 1,972 a 0,2466 mM. Las capacidades de relajación del Liposoma B y los liposomas dirigidos a folato que contienen el lípido DOPC (según la publicación anterior de los inventores (Bioconjugate Chem. 2009, 20, 648 - 655) se muestran en la Tabla 4. 4. Como el lípido de Gd activo de IRM: Gd.DOTA.DSA y su concentración es la misma en ambas formulaciones, las capacidades de relajación r_1 y r_2 obtenidas a 4,7 T son comparables.

Tabla 4. Comparación de la capacidad de relajación de los liposomas con Liposoma B con DSPC y liposomas que contienen DOPC dirigido a folato

DOPC		DSPC	
r_1	1,3006	r_1	0,9126
r_2	5,3794	r_2	5,555

IRM tumoral *in vivo*

Las partículas de liposomas B (concentración total de liposomas; 15 mg ml⁻¹ se prepararon en tampón HEPES (20 mM, NaCl, 135 mM, pH 6,5) y se inyectaron a través de la vena de la cola de ratones portadores de tumores IGROV-1. Antes de la inyección, se obtuvieron imágenes de IRM basales en un imán 4,7 T con el fin de identificar el tumor y medir los valores de T₁ basales. Después, se sometieron a las pruebas de imagen a los ratones 2 horas, 16 horas y 24 horas después de la inyección. El porcentaje de potenciación de la señal como resultado de la acumulación de las partículas de liposoma B dentro del tejido del tumor se calculó a partir de las intensidades de la señal generadas a partir de los tumores. La Figura 27 presenta las imágenes de RM de los tumores antes de la inyección, 2, 16 y 24 horas después de la administración de liposoma B. Las imágenes tumorales revelan un borde brillante de señal potenciada alrededor de la zona del tumor en el punto de tiempo de 24 horas, lo que muestra la gran efectividad del Liposoma B paramagnético dirigido al receptor de folato de acuerdo con la presente invención.

Los valores de intensidad de señal del tumor medidos (véase la Figura 28) muestran que en tan sólo 2 horas después de la inyección i.v., es evidente el efecto activo y dirigido específico de los liposomas de folato donde la señal de tumor se ve potenciada en un 20 %. A continuación, la potenciación de la señal se aumenta continuamente hasta el punto de tiempo de obtención de imágenes de 16 horas, donde se consigue una potenciación de la señal tumoral del 62 %. Esta sustancial potenciación se observa a pesar de la inyección de partículas de liposoma B que contienen la mitad de la cantidad de ligando dirigido a folato en comparación con los liposomas anteriores que contiene DOPC-3 % molar DSPE-PEG2000 (folato).

Además, la novedad y utilidad del liposoma B se demuestra por el hecho de que después del pico de 16 horas en las intensidades de la señal tumoral, la señal tumoral comienza a bajar. Aunque con el liposoma A, la intensidad de la señal del tumor aumenta hasta el punto final de 24, este efecto de disminución de la intensidad de la señal del tumor del liposoma B es ventajoso, ya que las partículas se eliminan "de forma natural" de la tumores, después de la obtención de imágenes, que es un requisito de cualquier nanopartícula segura y biocompatible. Aunque se pueden alcanzar tasas de acumulación y dosis más rápidas en los sitios tumorales utilizando ligandos dirigidos, informes recientes han llamado la atención sobre la seguridad de la acumulación prolongada y retención de nanopartículas dirigidas. Los inventores creen que el liposoma B es una nanopartícula liposomal activa óptima en IRM dentro del intervalo de dosis μ M puede potenciar sustancialmente el tejido tumoral, eliminarse después del punto de saturación de la potenciación de la señal y demuestra ventajas sobre los actuales agentes de contraste de IRM de peso molecular bajo clínicamente disponibles.

Histología de los tumores IGROV-1

Después de la IRM, se sacrificó a los ratones y los tumores se extirparon, se congelaron, se fijaron y se seccionaron para análisis histológico. La inclusión de la del lípido fluorescente DOPE-Rodamina en la formulación de liposomas permite el análisis post-mortem por microscopia de fluorescencia, que es una indicación sensible de la presencia de liposomas en el tejido tumoral. La Figura 29 presenta imágenes de microscopia de fluorescencia de tumores

seccionados 24 horas después de la inyección del liposoma B. La presencia de fluorescencia roja intensa de estas láminas tumorales seccionadas es indicativa de la acumulación de los liposomas B dirigidos en el tejido tumoral.

Estos hallazgos sugieren que la focalización sobre el folato para la obtención de imágenes *in vivo* de tumores presenta una plataforma robusta y amplia para la obtención de imágenes de tumores.

Conclusiones

En la búsqueda de nanopartículas cada vez más óptimas para la obtención eficaz de imágenes de tumores sólidos, las consideraciones de tamaño de partícula, la carga y los elementos de orientación son requisitos clave para el desarrollo exitoso de las partículas para la obtención de imágenes tumorales. Los resultados de los Experimentos 1 y 2 muestran de forma concluyente que los nuevos liposomas de la presente invención demuestran propiedades óptimas que los hacen especialmente adecuados para su uso como agentes de contraste en imágenes por resonancia magnética de tumores.

Sección experimental

Materiales

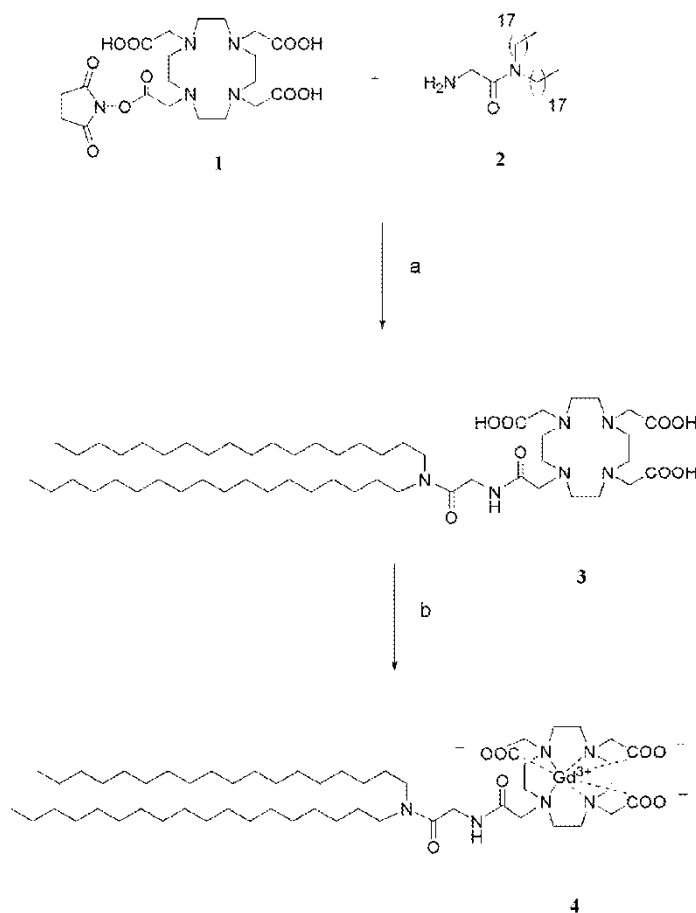
Fosfatidiletanolamina-lisamina rodamina B (DOPE-rodamina), colesterol, diestearoilfosfolina (DSPC) y 1,2-diestearoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina-N-metoxi (polietilenglicol)-2000 (DSPE-PEG2000) se adquirieron en Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, EE.UU.). Todos los demás productos químicos eran de calidad analítica o de la mejor calidad disponible y se adquirieron en Sigma-Aldrich (Reino Unido) o Macrocyclics (EE.UU.). Gd.DOTA.DSA se sintetizó del siguiente modo.

Procedimientos generales

Los espectros de RMN de ^1H se registraron en un espectrómetro 400 MHz Bruker Advance 400. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) campo abajo de TMS, usando cloroformo residual (7,27 ppm) como patrón integral. Los datos se avalan del siguiente modo: desplazamiento químico, s = singlete, a = singlete ancho, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, m = multiplete, las constantes de acoplamiento *J* se dan en hercios (Hz). Los espectros de RMN de ^{13}C se registraron en un espectrómetro 400 MHz Bruker Advance 400. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) campo abajo de TMS, usando la resonancia media de CDCl_3 (77,0 ppm) como patrón integral. Los espectros de infrarrojos (IR) se registraron en un espectrofotómetro de infrarrojos JASCO FT/IR-620, las absorciones se registran en números de onda (ν_{max} en cm^{-1}). La HPLC analítica se llevó a cabo en un sistema de bomba Hitachi-LaChrom L-7150 equipado con un detector evaporativo de dispersión de luz Polymer Laboratories PL-ELS 1000. Las mezclas de gradiente para HPLC se asignaron del siguiente modo: mezcla de gradiente A = $\text{H}_2\text{O}/0,1\%$ TFA; mezcla B = $\text{MeCN}/0,1\%$ TFA; mezcla C = MeOH. Los espectros de masas se realizaron con los instrumentos VG-070B, Joel SX-102 o Bruker Esquire 3000 ESI. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Stuart Scientific SMP3 y se presentan sin corrección. Las reacciones con material sensible al aire se llevaron a cabo mediante técnicas de jeringa estándar. El CH_2Cl_2 se destiló sobre P_2O_5 . Los análisis cromatográficos en capa fina (TLC) se realizaron en un gel de sílice con respaldo de aluminio de 0,2 mm de Merck en placas 60 F254 y los componentes se visualizaron mediante iluminación con luz UV o mediante tinción con permanganato de potasio, molibdato de amonio ácido (IV), yodo, ninhidrina, Rodamina B, ácido sulfúrico diluido acuoso o bromocresol verde, cuando fue adecuado se usó Pharmacia LKB - Ultrospec III (lámpara de deuterio a 300 nm) para visualizar la absorbancia UV. La cromatografía en columna ultrarrápida se realizó usando gel de sílice de Merck de malla de 0,040 a 0,063 mm, 230 a 400. Los experimentos de microscopia se llevaron a cabo en un microscopio Nikon Eclipse E600. El análisis FACS se llevó a cabo en una máquina Becton Dickinson FACSCalibur. Todos los experimentos de IRM se llevaron a cabo en un imán 4,7 T Magnex (Oxford, Reino Unido) Varian Unity Inova consola (Palo Alto, CA, EE.UU.).

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de conformidad con la normativa del Reino Unido y Ley de Guía para Operaciones con Animales (Procedimientos Científicos) (1986).

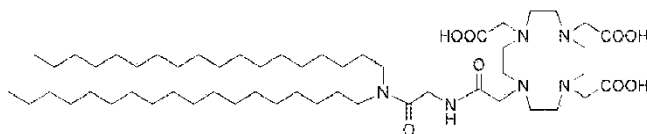
El esquema 1 presenta la ruta sintética llevada a cabo para producir el único componente sintetizado internamente de las nanopartículas liposomales presentadas. Gd.DOTA.DSA lípido 4. Este lípido se produce con una pureza ~ 98 % según se evaluó mediante HPLC analítica.



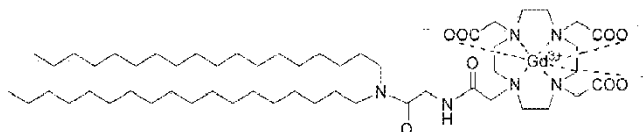
Esquema 1. a: 3 equiv., Et_3N , CH_2Cl_2 seco, 45 C, 12 h, 68 %. b: 6 H_2O . $GdCl_3$, H_2O , 90 C, 12 h, cuantitativa.

5 Síntesis química:

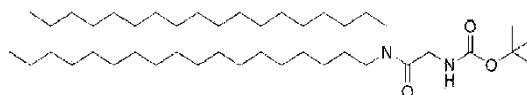
(i) **Ácido 2- {4,7-bis-carboximetil-10-[(N,N-diesterilamidometil-N'-amidometil]-1, 4,7,10-tetra-azaciclododec-1-il} -acético (DOTA.DSA) (3)**



El éster de DOTA-NHS(100 mg, 0,120 mmol) y bis(esteroilamida) (80,17 mg 0,139 mmol)) se añadieron a un matraz evacuado, al que se añadió CH_2Cl_2 anhidro (40 ml). Después se añadió trietilamina (66,90 l, 0,480 mmol) y la reacción se agitó durante la noche en atmósfera de N_2 . Los disolventes se eliminaron vacío y la mezcla bruta se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (eluyendo con (CH_2Cl_2 : MeOH: NH_3 34,5: 9: 1): CH_2Cl_2 1:9 →9:1, v/v) para dar un sólido blanco. R_f [CH_2Cl_2 : MeOH: H_2O : 34,5: 9: 1 v/v] 0,61. RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$: MeOD: AcOD: 3: 1, 300K) δ H (ppm) 10,55 (3H, s, a, 3 x COOH), 5,30 (1 H, s, a, CH_2NHCOO), 3,65 (6H, m, 3 x NCH_2COOH), 3,22 (6H, m, 2 x NCH_2CH_2 , 1 x NCH_2CONH), 2,58 (16H, s, a, 4 x NCH_2CH_2N), 2,29 (2H, s, a, CH_2NH), 1,67 - 1,59 (4H, m, $OCNCH_2CH_2$), 1,46 -1,44(27H, d de s, J 6,0, $C(CH_3)_3 \times 3$), 1,25 (60H, s, cadena CH_2 's), 0,90 (6H, t, J 6,8, $CH_3 \times 2$). FTIR: ν_{max} (nujol)/ cm^{-1} 3750,56, 2726,56, 1889,87, 1793,63, 1681,21, 1534,22. HPLC: tR = 34,16 min, columna C-4 péptido, mezcla de gradientes: 0,0 min [100 % A], 15 - 25,0 min [100 % B], 25,1 - 45,0 min [100 % C], 45,1 - 55,0 min [100 % A]; flujo: 1 ml/min. HRMS (FAB+) calculado para $54H_{10}N_6O_8$ m/z 964,7916, hallado 987,7833 ($M + Na$) $^+$.

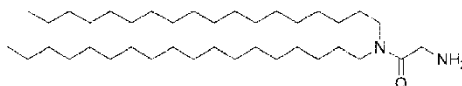
(ii) Ácido 2- {4,7-bis-carboximetil-10-[(N,N-diestearilamidometil-N'-amidometil]-1, 4,7,10-tetra-azaciclododec-1-il} -acético Gadolinio (III) (Gd.DOTA.DSA) (4)

Una cantidad estequiométrica de $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (28,118 mg, 0,075 mmol) se añadió a DOTA.DSA (3) (73 mg, 0,0757 mmol), y la reacción se agitó en H_2O (20 ml) destilada a 0 °C durante la noche (el pH descendió a 3,5 tras la adición de gadolinio). El agua para producir un polvo blanco (83,9 mg, rendimiento 99 %, descomp. = 345 - 348 °C). Rf [CH_2Cl_2 : MeOH: H_2O : 34,5: 9: 1 v/v] 0,55. La prueba de naranja de xilenol indicó que no había iones de Gd^{3+} detectables libres. FTIR: ν_{max} (nujol)/ cm^{-1} 3750,23, 2234,78, 1991,59, 1889,89, 1793,44, 1681,90,77. HPLC: tR = 36,22 min, columna C-4 péptido, mezcla de gradientes: 0,0 min [100 % A], 15 - 25,0 min [100 % B], 25,1 - 45,0 min [100 % C], 45,1 - 55,0 min [100 % A]; flujo: 1 ml/min. MS (ESI+) calculado para $\text{C}_{54}\text{H}_{101}\text{GdN}_6\text{O}_8$ m/z 1119,67, hallado 1120,10 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

(iii) Éster terc-butílico de ácido N,N-distearilamidometilcarbámico (2a)

Boc-glicina (310 mg, 1,77 mmol) y dioctadecilamina (923,96 mg, 1,77 mmol) se disolvieron en cloroformo seco (30 ml). Se añadieron HBTU (hexafluorofosfato de 2- (1 H-benzotriazol-1-il) -1, 1, 3,3-tetrametiluronio) (804,12 mg, 2,12 mmol) y DMAP (4-dimetilaminopiridina) (648,72 mg, 5,31 mmol) a la solución y la reacción se agitó a temperatura ambiente en N_2 durante 12 horas. Los disolventes se eliminaron a vacío. La mezcla se disolvió en CH_2Cl_2 (50 ml) y se extrajo con H_2O (3 x 50 ml). Los extractos acuosos combinados se extrajeron de nuevo con 2: 1 CH_2Cl_2 : MeOH (2 x 50 ml), los disolventes se redujeron y se volvieron a disolver en éter dietílico y se realizó una extracción posterior con 7 % de ácido cítrico y H_2O ; la capa orgánica se lavó con salmuera, se recogió y se filtró a través de celite y finalmente se secó sobre MgSO_4 . El éter dietílico se evaporó a vacío para dar un sólido blanco puro (1,164 g, 97 % de rendimiento, pf = 82 - 85 °C). Rf [CH_2Cl_2 : MeOH: H_2O :

34,5: 9: 1 v/v] 0,56. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δH (ppm) 5,50 (1 H, s, a, amida NH), 3,99 (2H, s, a, NHCH_2), 3,35 - 3,25 (2H, d, a, OCNCH_2), 3,17 - 3,07 (2H, d, a, OCNCH_2), 1,44 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,61 - 1,44 (13H, m, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ y $\text{OCN}(\text{CH}_2\text{CH}_2)$), 1,25 (60H, s, CH_2 's cadena de alquilo), 0,872 (6H, s, a, $\text{CH}_3 \times 2$). RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δC (ppm) 167,6 ($\text{CON}(\text{CH}_2)_3$), 156,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{COCO}$), 79,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 46,9 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_9$), 46,1 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_9$), 42,2 (NHCH_2CO), 31,9 - 26,9 ($\text{CH}_2 \times 30$), 22,7 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_9$), 14,1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$). FTIR: ν_{max} (nujol)/ cm^{-1} 2360,56, 1723,85, 1650,78, 1580,63, 1377,25. HPLC: tR = 36,08 min, columna C-4 péptido, mezcla de gradientes: 0,0 min [100 % A], 15 - 25,0 min [100 % B], 25,1 - 45,0 min [100 % C], 45,1 - 55,0 min [100 % A]; flujo: 1 ml/min. HRMS (FAB+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{86}\text{N}_2\text{O}_3$ m/z 678,6638, hallado 679,6953 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

(iv) N, N-Diestearilamidometilamina (DSA) (2)

La amina protegida 2a se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (5 ml), a la que se añadió ácido trifluoroacético (3 ml). La reacción se agitó en atmósfera de N_2 durante 2 horas. Los disolventes se eliminaron al vacío y el producto se secó al vacío para obtener un polvo blanco (158 mg, rendimiento del 94 %, pf = 59-64 °C). Rf [Hexano: acetato de etilo: 9:1 v/v] 0,44. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δH (ppm) 3,85 (2H, s, OCCH_2NH_2), 3,32 (2H, t, J 7,2 Hz, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 3,13 (2H, t, J 7,2 Hz, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 2,39 (2H, s, muy a, NH_2), 1,61 - 1,55 (4H, m, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 1,26 (60H, s, cadena CH_2 's), 0,86 (6H, t, J 6,8, $\text{CH}_3 \times 2$). RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δC (ppm) 168,8 (CO), 43,7 (OCNCH_2), 41,9 (OCNCH_2), 35,6 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33,4 (cadena alquilo CH_2 's), 32,3, 31,1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 22,7 - 14,1 (cadena alquilo CH_2 's). FTIR: ν_{max} (nujol)/ cm^{-1} 1681, 1534, 1313, 1206, 1174. HPLC: R = 31,46 min, columna C-4 péptido, mezcla de gradientes: 0,0 min [100 % A], 15 - 25,0 min [100 % B], 25,1 - 45,0 min [100 % C], 45,1 - 55,0 min [100 % A]; flujo: 1 ml/min. HRMS (FAB+) calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}$ m/z 578,6114, hallado 579,6199 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

Debido a la naturaleza paramagnética del lípido 4, la espectroscopia de RMN no era adecuada como herramienta de caracterización debido al extremo ensanchamiento de los picos causado por el metal gadolinio paramagnético. Todos los lípidos de gadolinio se analizaron mediante espectrometría de masas por electropulverización (ESI-MS), se utilizó el ensayo de HPLC y naranja de xilenol para analizar la presencia de cualquier Gd^{3+} libre en las muestras de producto. El ensayo de naranja de xilenol es una prueba colorimétrica mediante la cual un cambio de color de naranja a púrpura es indicativo de Gd^{3+} en complejo con el colorante naranja de xilenol. Esto provoca un

desplazamiento batocrómico de 440 nm a 573 nm. En el presente documento, mediante el uso de una curva de calibración estándar de concentraciones conocidas de gadolinio frente a la absorbancia, la cantidad de Gd^{3+} libre en la muestra podría evaluarse. Tal como se presenta en las Figuras 5 y 6, los análisis HPLC y MS de Gd.DOTA.DSA 4 se llevaron a cabo y no se demostró que hubiera presente Gd^{3+} libre y el compuesto se preparó con un 98 % de pureza y excelentes rendimientos. Los picos isotópicos de gadolinio también eran visibles en la traza MS y, como resultado, la observación de los abundantes isótopos de gadolinio confirmaron la formación de complejos del metal con el lípido DOTA. La HPLC, la MS y los picos isotópicos de gadolinio para el compuesto 4 se muestran en las Figuras 5 y 6.

Prueba de naranja de xilenol

La presencia de iones de gadolinio libres en los compuestos en los que se ha incorporado Gd se determinó midiendo la absorbancia a 573 nm de una mezcla de solución de naranja de xilenol (990 μ l, 0,5 mM in tampón de acetato sódico (0,1 M, pH 5,2) y solución de prueba (en 1:1 MeOH: CH_2Cl_2) que contiene el compuesto Gd (10 μ l). Coeficiente de extinción $\epsilon = 20, 700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ mediante lo cual $[Gd \text{ libre}] = A573/\epsilon$.

Análisis de IRM de Gd.DOTA.DSA Para el análisis en T₁, se añadieron Gd.DOTA.DSA 4, Gd.DTPA.BSA y controles del compuesto libre de metal y Magnevist (Schering AG, Alemania) a agua para dar una concentración final de 0,5 mM. Las soluciones (200 μ l) se introdujeron tubos eppendorf y los valores de relajación en T₁ se midieron en un escáner 4.7T Varian RM a temperatura ambiente. Para las mediciones de la capacidad de relajación se prepararon formulaciones de liposomas de gadolinio con el fin de obtener cinco concentraciones diferentes de gadolinio entre 0,20 a 0,66 M en 200 μ l agua destilada y se determinó la capacidad de relajación molar $r_1(\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1})$. Los valores de T₁ se obtuvieron utilizando experimentos de recuperación de saturación realizados con una secuencia de eco de espín estándar y una adquisición de una sola lámina de 2 mm ((TR = 50, 100, 200, 300, 500, 700, 1200, 3000, 5000, 7000 ms, TE = 15 ms), número de promedios de la señal; 2, FOV; 70 $\times$ 70 mm², recogidos en una matriz de 256 $\times$ 128.

Preparaciones de liposomas. Todos los lípidos se almacenaron como soluciones madre en disolventes orgánicos anhidros ($CHCl_3$, MeOH o una mezcla de ambos), a - 20 °C en argón. Volúmenes apropiados de cada población de lípidos se colocaron en un matraz de fondo redondo que contenía cloroformo y se agitaron para asegurar una mezcla completa de los lípidos. El disolvente se eliminó a vacío lentamente para asegurar la producción de una película uniforme de lípido. La película se rehidrató con tampón (HEPES, NaCl, 150 mM, pH 6,8) en un volumen definido (20 ml por 500 mg de liposomas). La solución resultante se sometió a ultrasonidos durante 60 min (a 30 °C). El pH de la suspensión liposomal se comprobó mediante pH Boy (Camlab Ltd., Over, Cambridgeshire, Reino Unido). Para cada preparación, el tamaño y la polidispersidad de los liposomas se midieron mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS).

Modelo de tumor en ratón. Se implantaron células IGROV (5×10^6 /0,1 ml PBS) en los flancos de ratones Balb / c atímicos de 6-8 semanas de edad para la generación de tumores subcutáneos. Tras ~2 semanas (pesos tumorales estimados de 40-50 mg) se anestesió a los ratones se anestesiaron con una mezcla de isoflurano/O₂ y se colocaron en una bobina de volumen de ¹H de cuadratura y se colocaron en el imán. Se obtuvieron exploraciones basales y después se inyectó en los ratones por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola 200 μ l de la solución de liposomas (HEPES (20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5)) y se obtuvieron imágenes a 4,7 T (secuencia de eco de espín: TR = 400 - 2800 ms, TE = 10 ms, FOV = 45 $\times$ 45 cm², promedios: 1, tamaño de la matriz: 256 $\times$ 128 espesor: 2,0 mm y 20 láminas).

Experimentos de Histología. Tras la IRM, se sacrificó a los animales y los tumores, hígados y riñones se extirparon, se congelaron en nitrógeno líquido, se incluyeron en fluido de inclusión OCT (VWR) y se cortaron secciones de 10 $\times$ 7 mm de espesor, se montaron sobre portaobjetos y se estudiaron para microscopia de fluorescencia.

Referencias

¹Shah, K.; Jacobs, A.; Breakefield, X. O.; Weissleder, R. Molecular imaging of gene therapy for cancer. Gene Therapy 2004, 11, 1175 - 1187.

²Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. Genes & Development 2003, 17, 545 - 580.

³Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. Chemical Reviews 1999, 99, 2293 - 2352.

⁴Parac-Vogt, T. N.; Kimpe, K.; Laurent, S.; Pierart, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N.; Binnemans, K. European Journal of Inorganic Chemistry 2004, 3538 - 3543

⁵Tilcock, C., Unger, E., Cullis, P. and MacDougall, P. Radiology 1989, 17

⁶ Oliver, M.; Ahmad, A.; Kamaly, N.; Perouzel, E.; Caussin, A.; Keller, M.; Herlihy, A.; Bell, J.; Miller, A. D.; Jorgensen, M. R. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2006, 4, 3489 - 3497

⁷ Kabalka, G. W., Davis, M.A., Holmberg, E., Maruyama, K. and Huang, L. *Magnetic Resonance Imaging* 1991, 9, 373377

⁸ E.C Unger, T. A. F., C. Tilcock, T.E. *New Journal of Magnetic Resonance Imaging* 1991, 6, 689 - 693

⁹ Bhattacharya, S.; Haldar, S. *Biochimica Et Biophysica Acta* 2000, 1467, 39 - 53

¹⁰ Lian, T.; Ho, R. J. Y. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, 90, 667 - 680.

¹¹ Moghimi, S. M.; Szebeni, J. *Progress in Lipid Research* 2003, 42, 463 - 478.

¹² Scherphof, G. L.; Velinova, M.; Kamps, J.; Donga, J. In *Liposome research days: Towards new products for human health*; Hirota, S., Ed.; Elsevier: Shizuoka; Japan, 1996, p 179 - 192.

¹³ Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. In *Recent advances in drug delivery systems*; Anderson, J. M., Kim, S. W., Kopecek, J., Robinson, J. R., Eds.; Elsevier: Salt Lake City, UT, 1999, p 271 - 284

¹⁴ Iyer, A. K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. *Drug Discovery Today* 2006, 11, 812 - 818

¹⁵ Ke, C. Y., Mathias, C. J., and Green, M. A. (2004) Folate-receptor-targeted radionuclide imaging agents. *Adv. Drug Delivery Rev.* 56, 1143 - 1160. Reddy, J. A., Allagadda, V. M., and Leamon, C. P. (2005) Targeting Therapeutic and Imaging Agents to Folate Receptor Positive Tumours. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 6, 131 - 150. Wang, Z. J., Boddington, S., Wendland, M., Meier, R., Corot, C., and Daldrup-Link, H. (2008) MR imaging of ovarian tumours using folate-receptor-targeted contrast agents. *Pediatric Radiol.* 38, 529 - 537. Saul, J. M., Annapragada, A. V., and Bellamkonda, R. V. (2006) A dual-ligand approach for enhancing targeting selectivity of therapeutic nanocarriers. *J. Controlled Release* 114, 277287. Ghaghada, K. B., Saul, J., Natarajan, J. V., Bellamkonda, R. V., and Annapragada, A. V. (2005) Folate targeting of drug carriers: A mathematical model. *J. Controlled Release* 104, 113 - 128. Müller, C., Schubiger, P. A., and Schibli, R. (2006) *in vitro* and *in vivo* targeting of different folate receptor-positive cancer cell lines with a novel 99mTc-radiofolate tracer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33, 1162 - 1170. Hilgenbrink, A. R., and Low, P. S. (2005) Folate Receptor-Mediated Drug Targeting: From Therapeutics to Diagnostics. *J. Pharm. Sci.* 94, 2135 - 2146. Henriksen, G., Bruland, O. S., and Larsen, R. H. (2005) Preparation and Preclinical Assessment of Folate-conjugated, Radiolabelled Antibodies. *Anticancer Res.* 25, 9 - 16. Wang, S., Luo, J., Lantrip, D. A., Waters, D. J.; Mathias, C. J., Green, M. A., Fuchs, P. L. and Low, P. S. (1997) Design and Synthesis of [111In]DTPA-Folate for Use as a Tumour-Targeted Radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem.* 8, 673 - 679. Sudimack, J., and Lee, R. J. (2000) Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv. Drug Delivery Rev.* 41, 147 - 162. Hofland, H. E., Masson, C., Iginla, S., Osetinsky, I., Reddy, J. A., Leamon, C. P., Scherman, D., Bessodes, M., and Wils, P. (2002) Folate-Targeted Gene Transfer *in vivo*. *Molecular Therapy* 5, 739744.

¹⁶ Gabizon, A., Horowitz, A. T., Goren, D., Tzemach, D., Shmeeda, H., and Zalipsky, S. (2003) *in vivo* Fate of Folate-Targeted Polyethylene-Glycol Liposomes in Tumour-Bearing Mice. *Clin. Cancer Res.* 9, 6551 - 6559. Salazar, M. D., and Ratnam, M. (2007) The folate receptor: What does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer Metastasis Rev.* 26, 141 - 152.

¹⁷ Low, P. S., Henne, W. A., and Doorneweerd, D. D. (2008) Discovery and Development of Folic-Acid-Based Receptor Targeting for Imaging and Therapy of Cancer and Inflammatory Diseases. *Acc. Chem. Res.* 41, 120 - 129.

¹⁸ Gupta, Y., Jain, A., Jain, P., and Jain, S. (2007) Design and development of folate appended liposomes for enhanced delivery of 5-FU to tumour cells. *J. Drug Targeting* 15, 231 - 240.

¹⁹ Sega, E. I. and Low, P. S. (2008) Tumour detection using folate receptor-targeted imaging agents. *Cancer and Metastasis Rev.* 27, 655 - 664.

²⁰ Kim, I. B., Shin, H., Garcia, A. J., and Bunz, U. H. F. (2007) Use of a Folate-PPE Conjugate To Image Cancer Cells *in vitro*. *Bioconjugate Chem.* 18, 815 - 820.

²¹ Konda, S. D., Aref, M., Wang, S., Brechbiel, M., and Wiener, E. C. (2001) Specific targeting of folate-dendrimer MRI contrast agents to the high affinity folate receptor expressed in ovarian tumour xenografts. *Magma* 12, 104 - 113.

²² Oyewumi, M. O., Yokel, R. A., Jay, M., Coakley, T., and Mumper, R. J. (2004) Comparison of cell uptake, biodistribution and tumour retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumour-bearing

mice. J. Controlled Release 95, 613 - 626.

²³ Choi, H., Choi, S. R., Zhou, R., Kung, H. F., and Chen, I. W. (2004) Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumour imaging via folate receptor-targeted delivery. Acad. Radiol. 11, 996 - 1004.

²⁴ Kamaly, N., Kalber, T., Ahmad, A., Oliver, M. H., So, P. W., Herlihy, A. H., Bell, J. D., Jorgensen, M. R., and Miller, A. D. (2008) Bimodal Paramagnetic and Fluorescent Liposomes for Cellular and Tumour Magnetic Resonance Imaging. Bioconjugate Chem. 19, 118 - 129.

²⁵ Torchilin, V. P. (2007) Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. The AAPS Journal 9, E128-E147.

²⁶ Sun, C., Sze, R., and Zhang, M. (2006) Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. J. Biomed. Mater. Res. PartA 78, 550 - 557.

²⁷ Müller, C., Schubiger, P. A., and Schibli, R. (2006) *in vitro* and *in vivo* targeting of different folate receptor-positive cancer cell lines with a novel 99mTc-radiofolate tracer. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 33, 1162 - 1170.

²⁸ Wu, J., Liu, Q., and Lee, R. J. (2006) A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. Int. J. Pharm. 316, 148 - 153.

²⁹ Wu, M., Gunning, W., and Ratnam, M. (1999) Expression of Folate Receptor Type in Relation to Cell Type, Malignancy, and Differentiation in Ovary, Uterus, and Cervix. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention 8, 775-782.

³⁰ Stevens, P. J., Sekido, M., and Lee, R. J. A (2004) Folate Receptor-Targeted Lipid Nanoparticle Formulation for a Lipophilic Paclitaxel Prodrug. Pharm. Res. 21, 2153 - 2157.

³¹ Gabizon, A. A., Shmeeda, H., y Zalipsky, S. (2005) Pros and Cons of the Liposome Platform in Cancer Drug Targeting. International Liposome Society (ILS 2005). Liposome advances: progress in drug and vaccine delivery, pp 175 - 184, Taylor & Francis, London.

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma que comprende Gd.DOTA.DSA (gadolinio (III) ácido 2-{4,7-bis-carboximetil-10-[(N,N-diestearilamidometil-N'-amido-metil]-1,4,7,10-tetra-azaciclododec-1-il}-acético), **caracterizado por que** dicho liposoma comprende adicionalmente un componente de fosfolípido neutro completamente saturado.
2. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho componente de fosfolípido completamente saturado es una 1,2-di(lípido C₁₂-C₂₀ saturado)-sn-glicero-3-fosfocolina, donde los grupos de lípidos saturados pueden ser iguales o diferentes unos de otros.
3. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho un liposoma de acuerdo con (1), donde dicho DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina).
4. Un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho liposoma comprende además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en colesterol y un componente de polietilenglicol-fosfolípido.
5. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho polietilenglicol-fosfolípido es DSPE-PEG (2000) [diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol (2000)].
6. Un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cantidad de Gd.DOTA.DSA en dicho liposoma es del 29 al 31 % en moles de la formulación total de liposomas, preferentemente 30 % molar de la formulación total de liposomas; la cantidad de componente fosfolípido totalmente saturado en dicho liposoma es de 32 a 34 % molar de la formulación total de liposomas, preferentemente 33 % molar de la formulación total de liposomas; la cantidad de colesterol en dicho liposoma es del 29 al 31 % molar de la formulación total de liposomas, preferentemente 30 % molar de la formulación total de liposomas; y la cantidad de dicho componente de polietilenglicol-fosfolípido en dicho liposoma es 5- 8 % molar de la formulación total de liposomas y preferentemente 7 % molar de la formulación total de liposomas.
7. Un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho liposoma tiene un tamaño medio de partícula a una dilución de 10 X en solución tampón de fosfato inferior o igual a 100 nm, preferentemente inferior o igual a 80 nm.
8. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho liposoma comprende Gd.DOTA.DSA, colesterol, y DSPC DSPE-PEG (2000).
9. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 8, donde Gd.DOTA.DSA, colesterol, DSPC y DSPE-PEG (2000) están presentes en la relación de 30:33:30:7 % molar, respectivamente, en dicha formulación de liposomas.
10. Un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho liposoma comprende un agente dirigido a tumores.
11. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho agente dirigido a tumores comprende un ligando para un receptor que está sobreexpresado en las células tumorales respecto a la expresión de dichos receptores en las células de tejido no tumoral de los mamíferos.
12. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho agente dirigido a tumores se selecciona del grupo que consiste en un resto de folato y un compuesto de fosfolípido-polietilenglicol-folato.
13. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho compuesto fosfolípido-polietilenglicol-folato es DSPE-PEG (2000) [diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol (2000)-folato].
14. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 12 a 13, donde la cantidad de dicho resto de folato presente en dicho liposoma es 1-2 % molar de la formulación de liposomas total.
15. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho liposoma comprende Gd.DOTA.DSA, colesterol, DSPC DSPE-PEG(2000) y DSPE-PEG(2000)-Folato.
16. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 15, donde Gd.DOTA.DSA, colesterol, DSPC y DSPE-PEG (2000) y DSPE-PEG(2000)-Folato están presentes en la relación de 30:33:30:5,5:1,5 % molar, respectivamente, en dicha formulación de liposomas.
17. Un agente de contraste de resonancia magnética, que comprende liposomas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente un vehículo acuoso.

18. Un agente de contraste de resonancia magnética de acuerdo con la reivindicación 17, para uso en medicina, por ejemplo en el diagnóstico.
19. Uso de un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en la preparación de un agente de contraste de resonancia magnética para potenciar las imágenes de resonancia magnética de órganos y estructuras de órganos en un mamífero, y, preferentemente, en la preparación de un agente de contraste de resonancia magnética para potenciar una imagen de resonancia magnética de un tumor en un mamífero.
20. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, donde la concentración de dicho liposomas en dicho agente de contraste de resonancia magnética es 1 -50 mg / ml, preferentemente 1 -30 mg / ml.
21. Un método de obtención de imágenes de resonancia magnética de un órgano o estructura de órgano en un mamífero, que comprende las etapas de:
 - (a) administrar el agente de contraste de resonancia magnética de acuerdo con la reivindicación 17 a un paciente; y
 - (b) tomar imágenes del órgano de interés en el paciente.
22. Un método de acuerdo con 21, donde dicho agente de contraste de resonancia magnética se usa para potenciar una imagen de resonancia magnética de un tumor en un mamífero.
23. Un método de obtención de imágenes de resonancia magnética de un órgano o estructura de órgano en un mamífero al que se le ha pre-administrado el agente de contraste magnético de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende la etapa de:
 - (i) tomar imágenes del órgano de interés en el paciente.
24. Un método de fabricación de un liposoma de acuerdo con la reivindicación 1 a 16, que comprende mezclar una solución de Gd.DOTA.DSA (gadolinio (III) ácido 2- {4,7-bis-carboximetil-10 - [(N,N-distearilamidometil-N'-amido-metil-1,4,7,10-tetra-azaciclododec-1-il) -acético) y una solución de un fosfolípido totalmente saturado neutro.
25. Un método de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende la etapa adicional de secado de la mezcla (por ejemplo al vacío) y, opcionalmente, la rehidratación del liposoma resultante.
26. Un método de fabricación de un agente de contraste magnético de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende mezclar un liposoma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

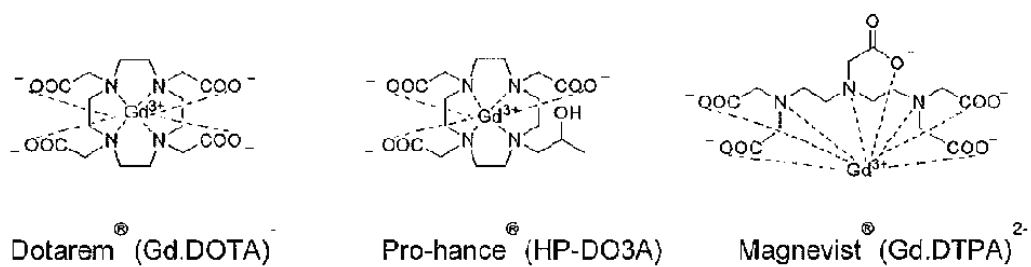


Figura 1



Figura 2

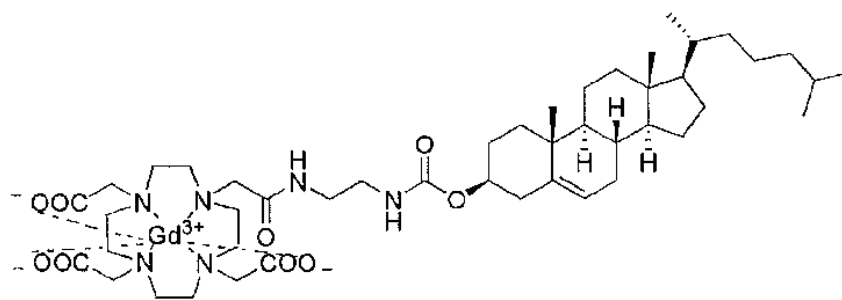


Figura 3

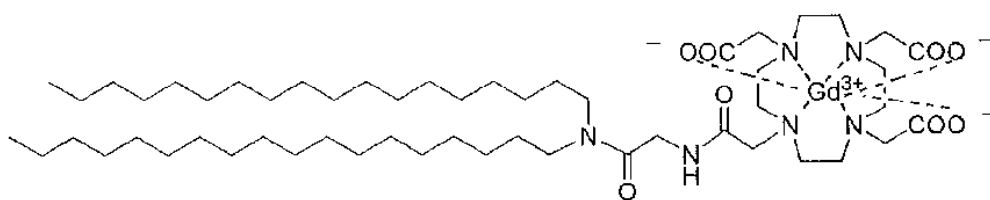


Figura 4

a

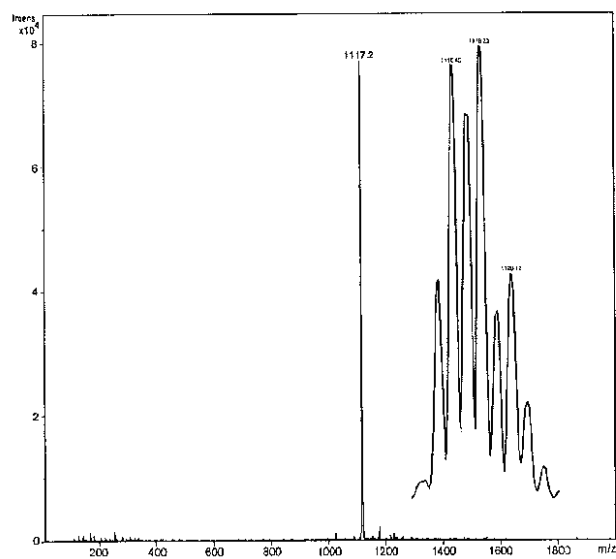


Figura 5

b

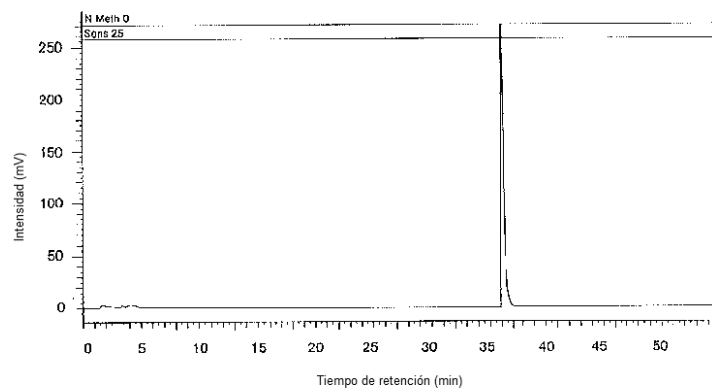


Figura 6

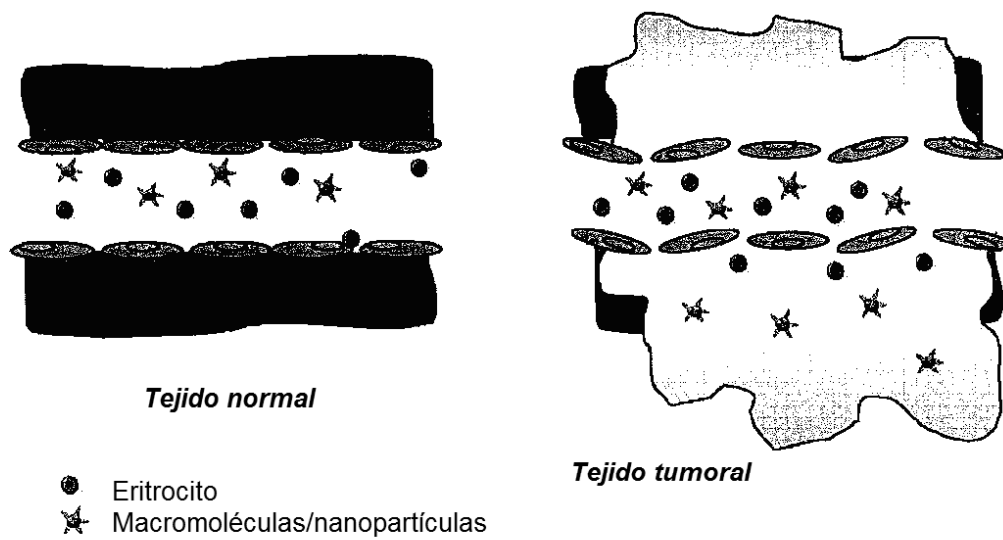


Figura 7

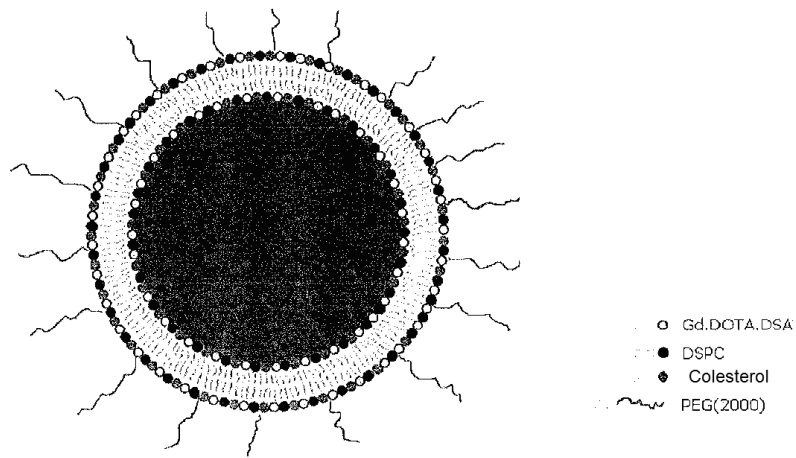


Figura 8

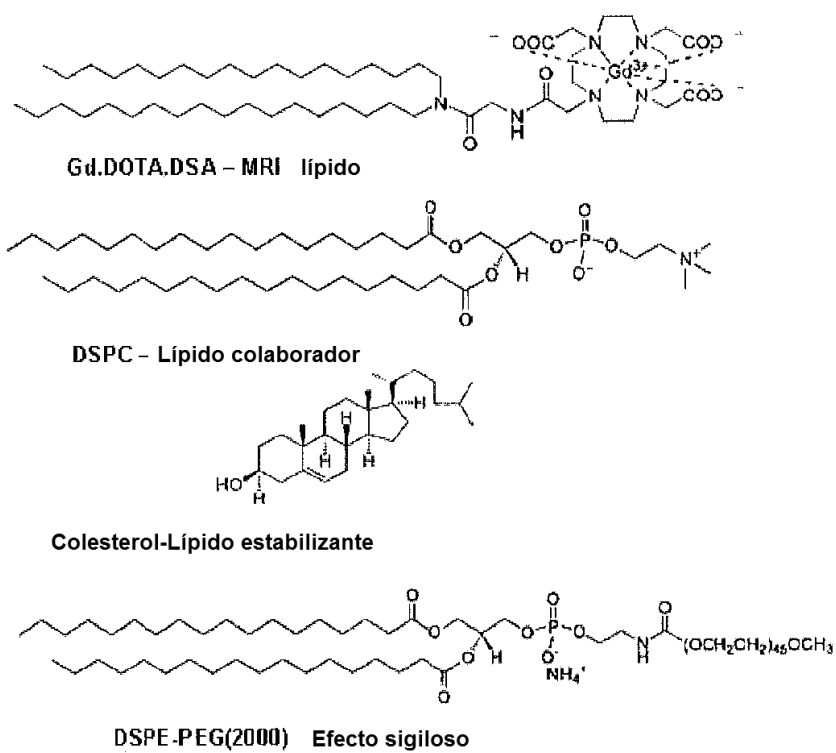


Figura 9

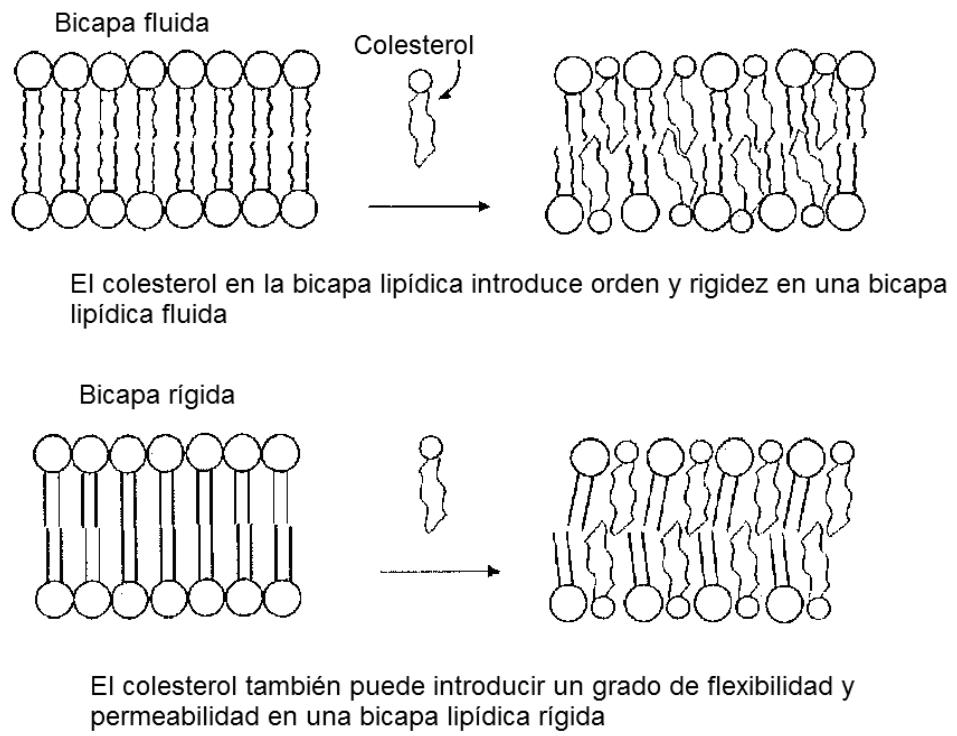
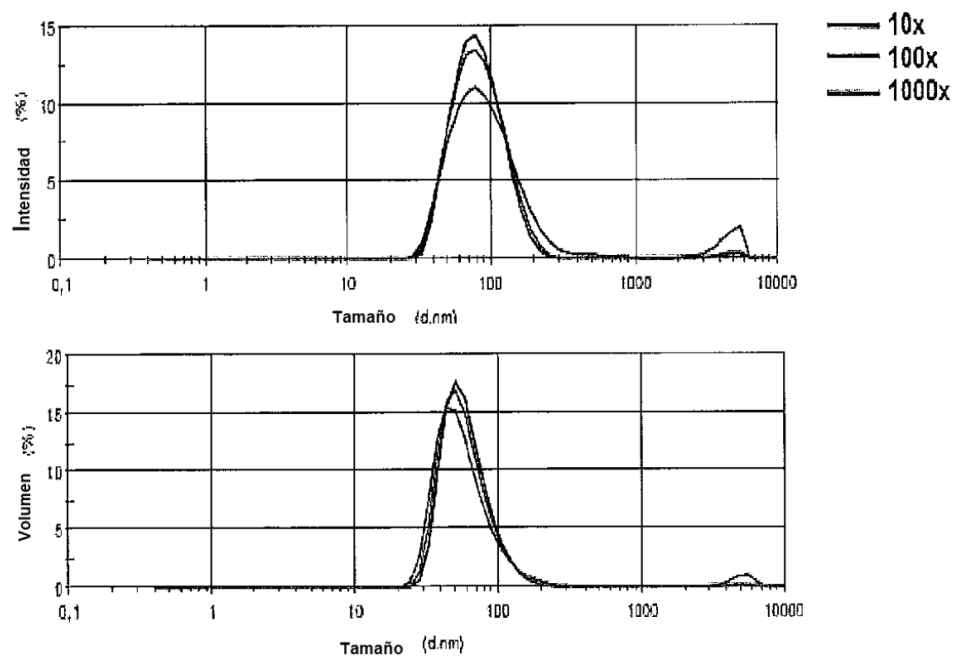


Figura 10



Dilución	Z-prom, nm	Pdl	Pc int, nm	Int%	Pc-Vol, nm	Vol%
10x	76,7 (1,3)	0,155 (0,011)	86,0 (3,5)	99,0 (1,0)	62,4 (1,5)	99,4 (0,6)
100x	76,5 (0,5)	0,157 (0,009)	87,8 (3,5)	99,3 (0,9)	61,0 (1,2)	99,6 (0,5)
1000x	89,0 (1,8)	0,319 (0,035)	97,5 (7,6)	93,3 (2,1)	60,5 (1,4)	96,4 (0,8)

Figura 11

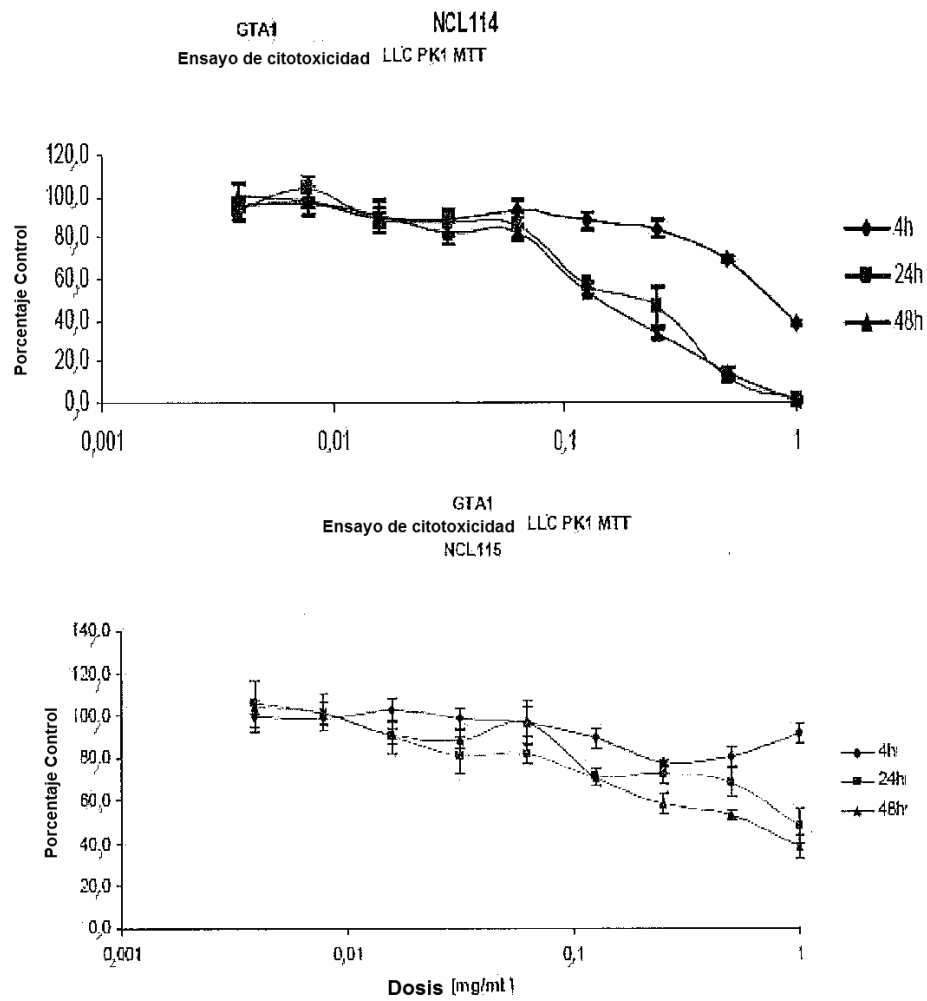


Figura 12

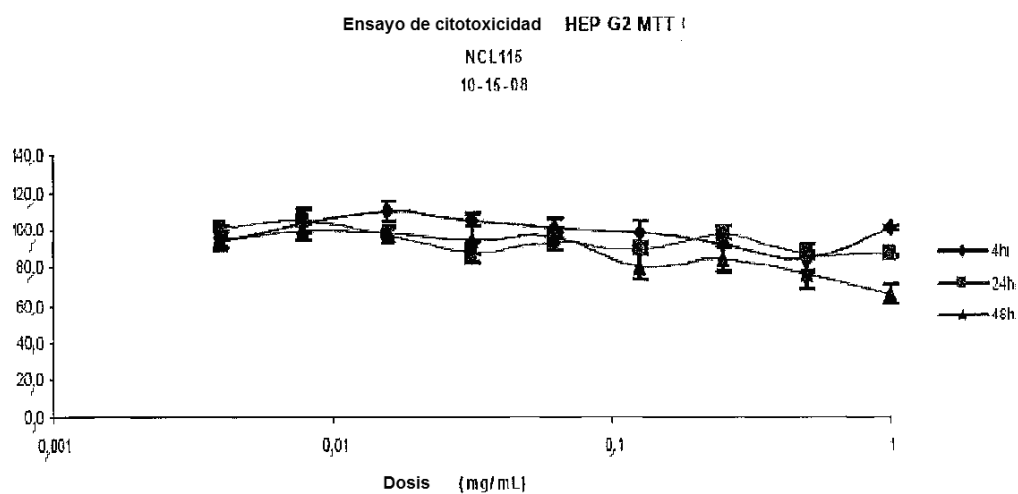
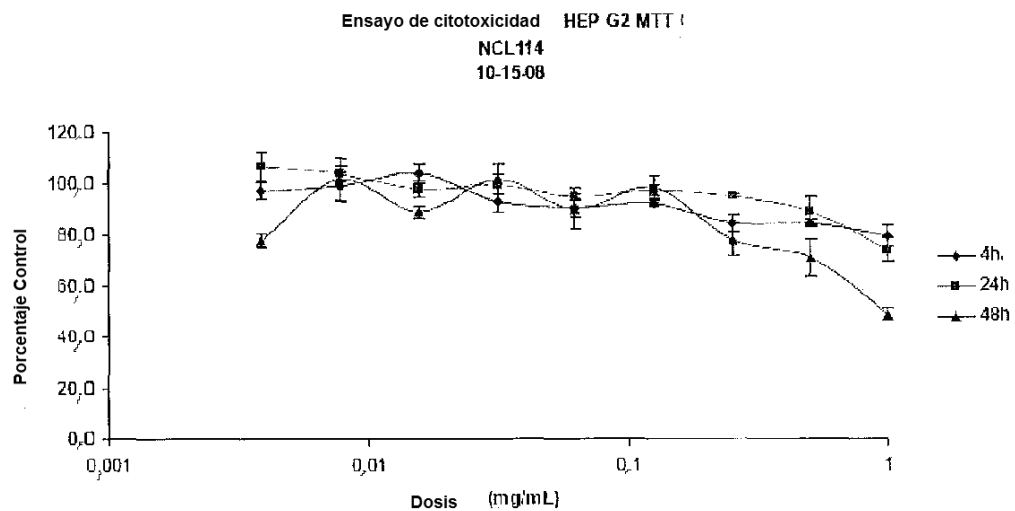


Figura 13

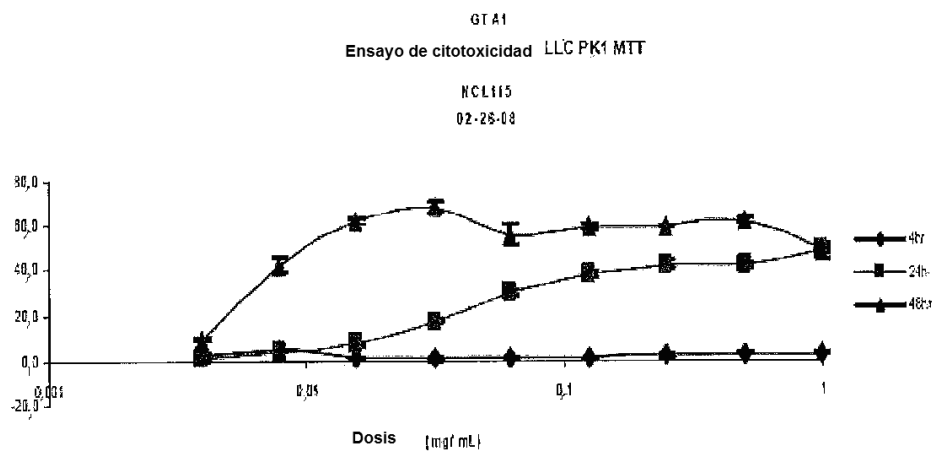
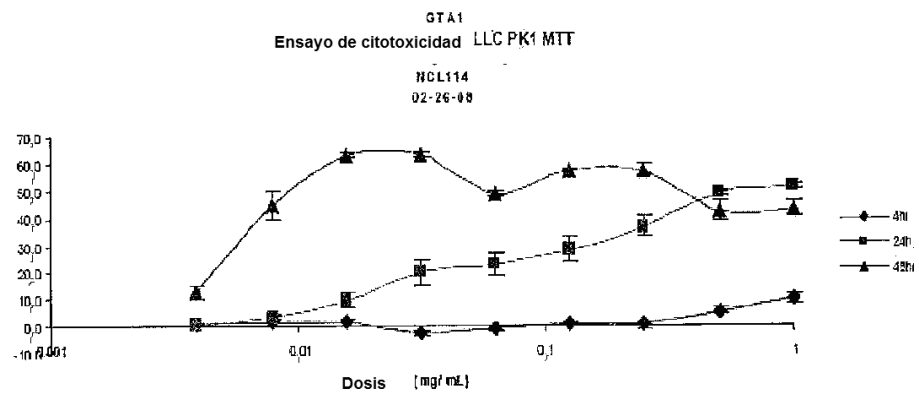


Figura 14

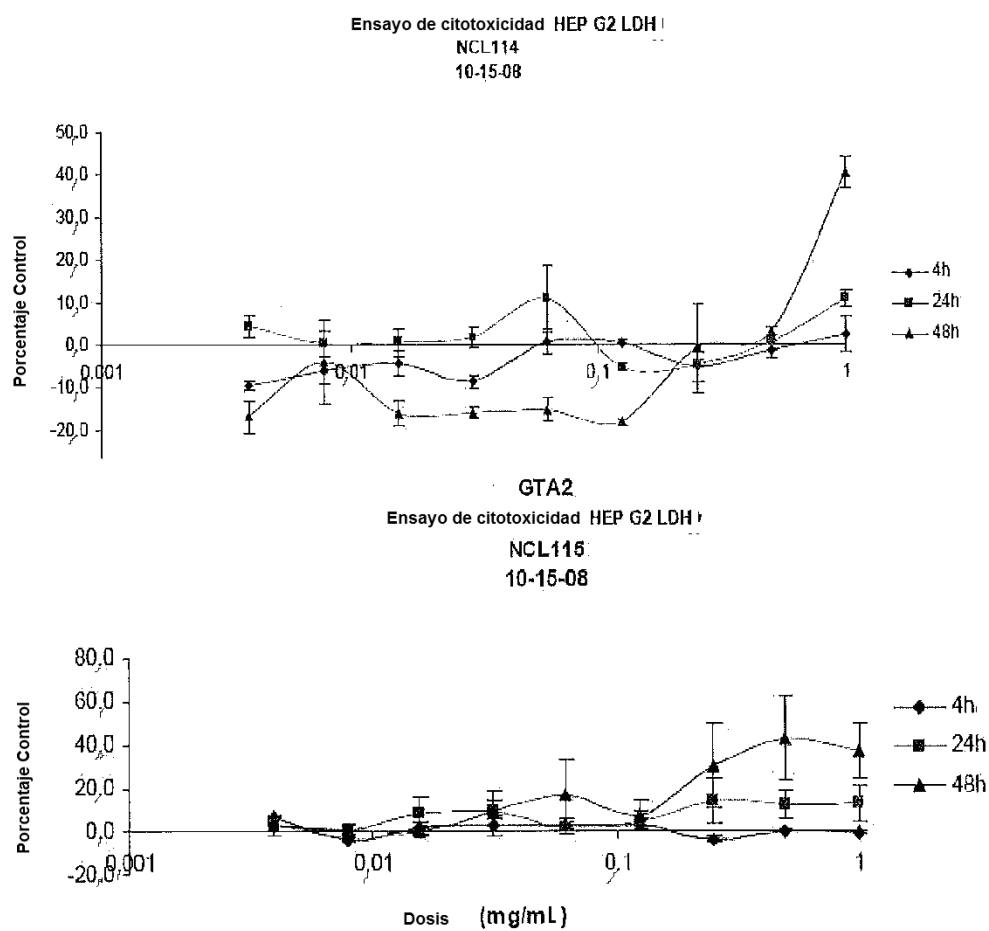


Figura 15

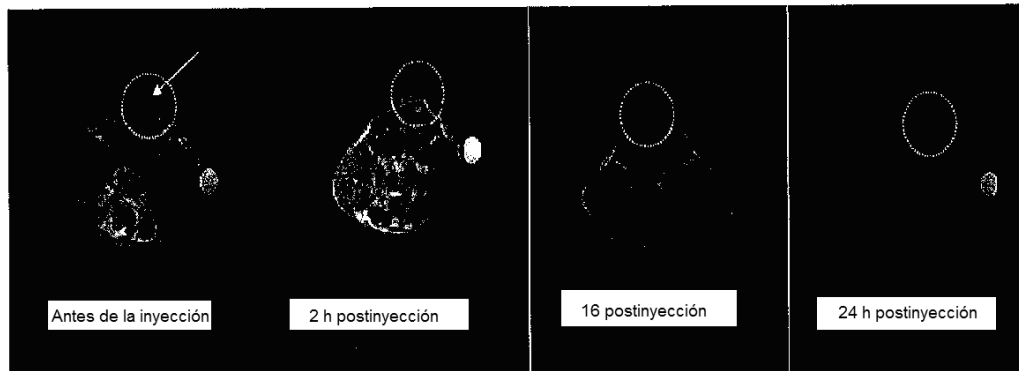


Figura 16

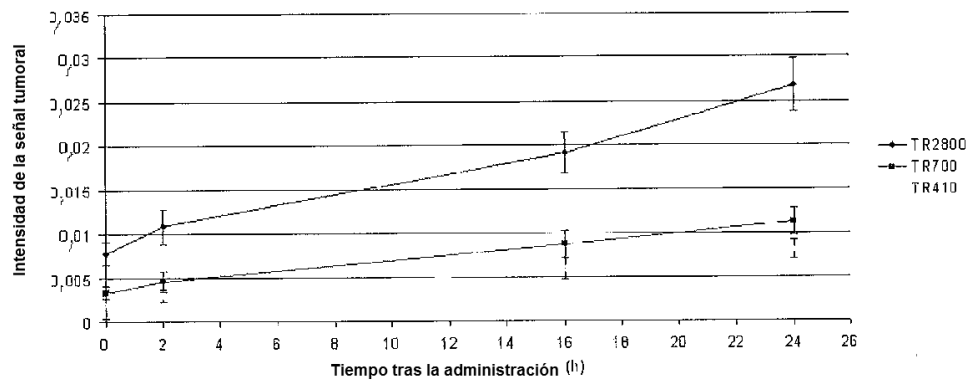


Figura 17

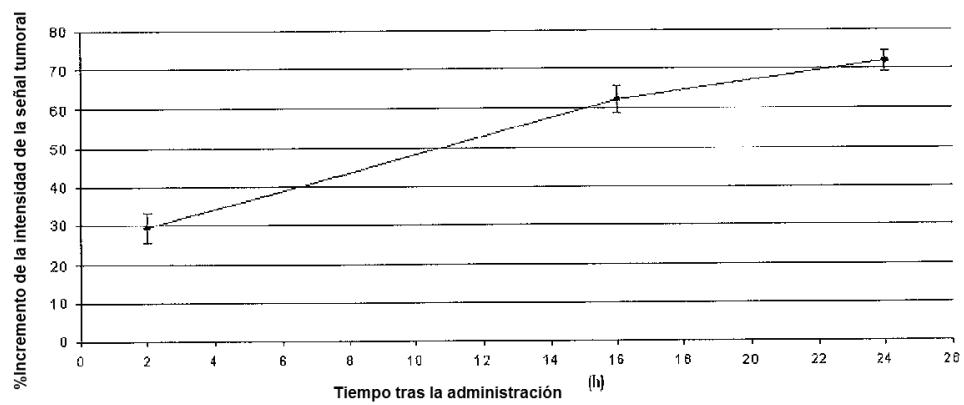


Figura 18

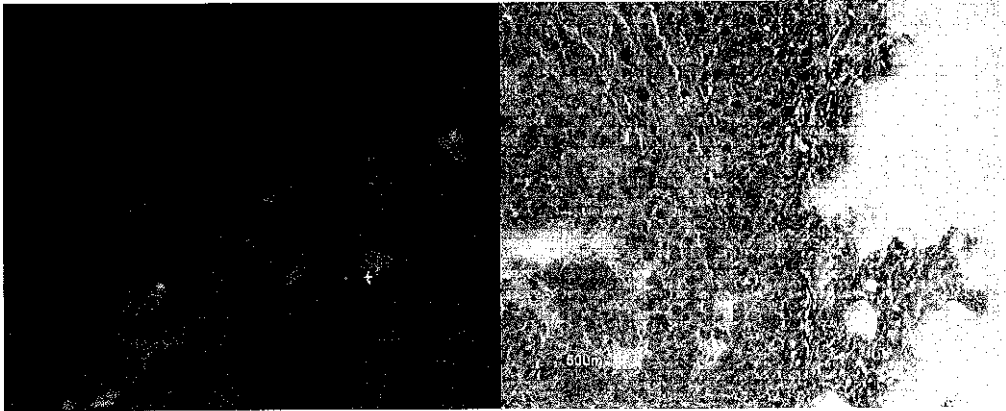


Figura 19

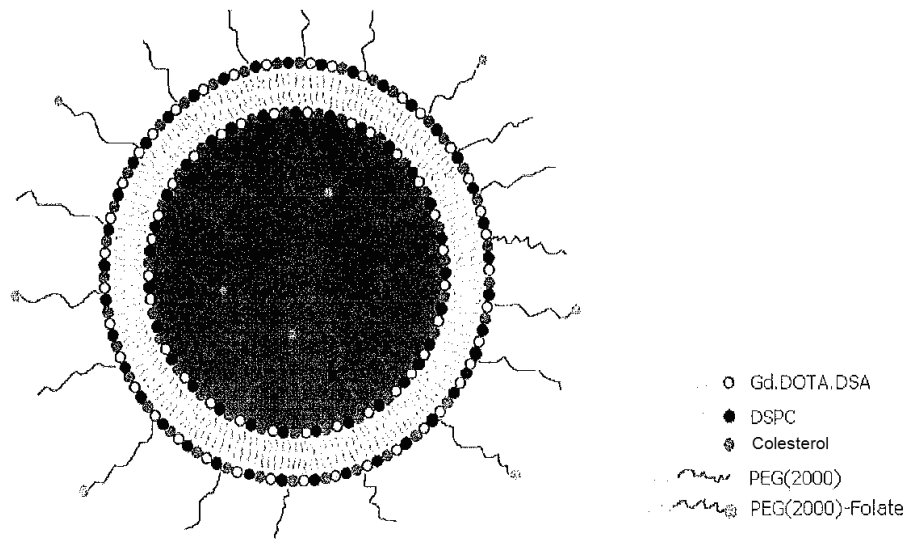


Figura 20

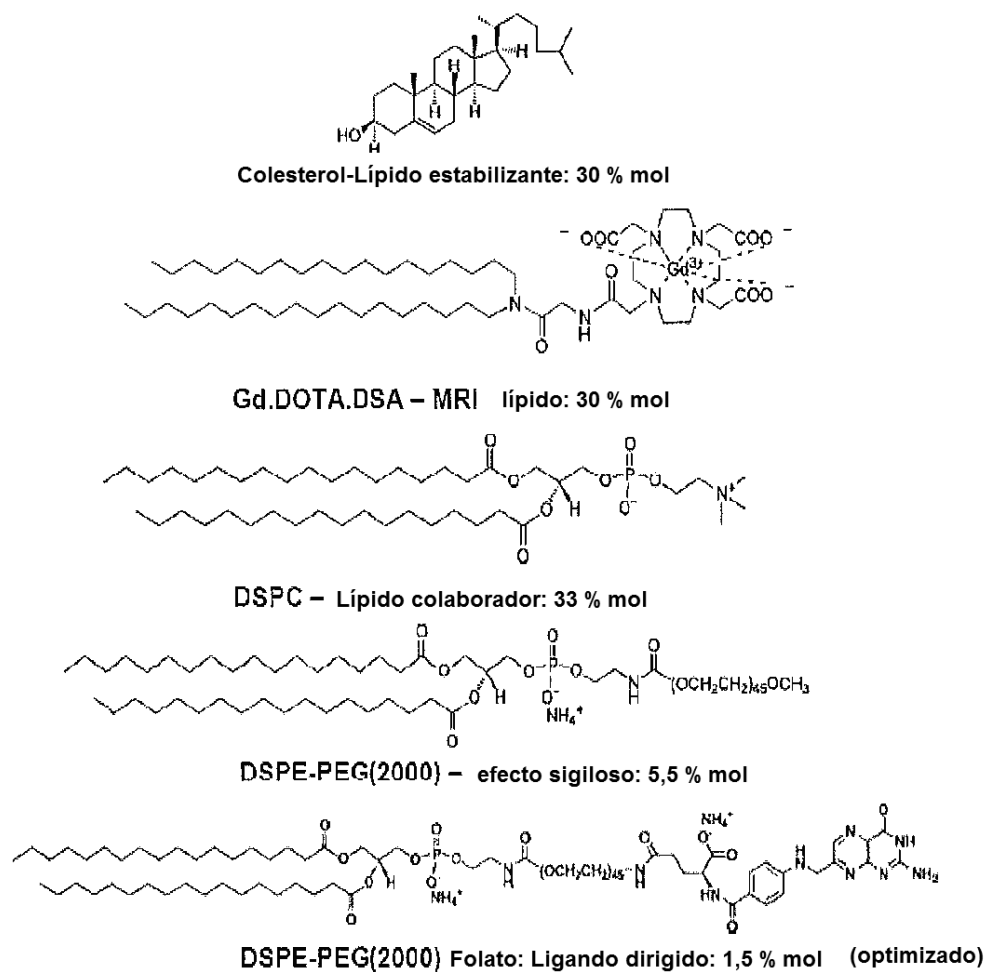


Figura 21

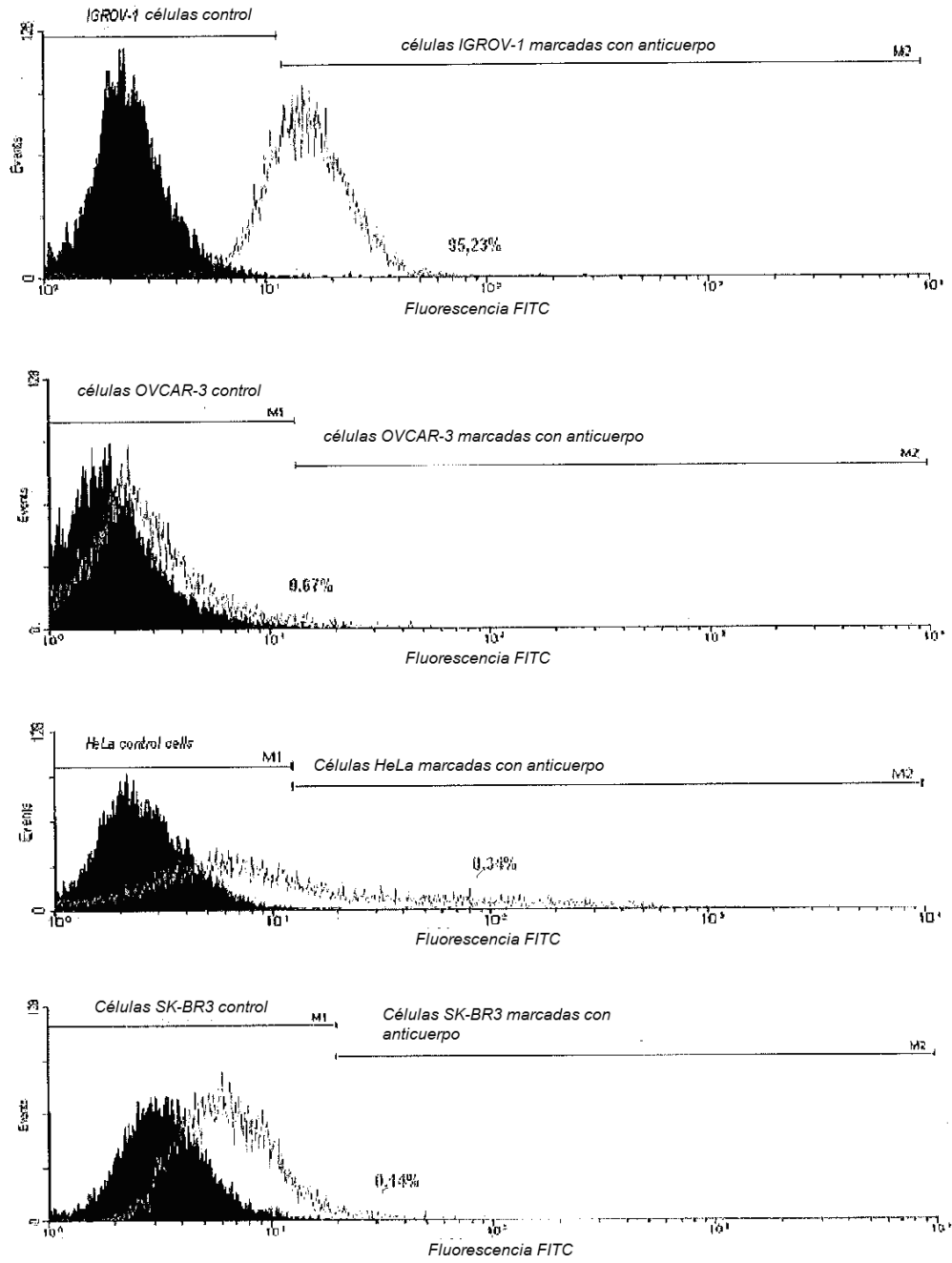


Figura 22

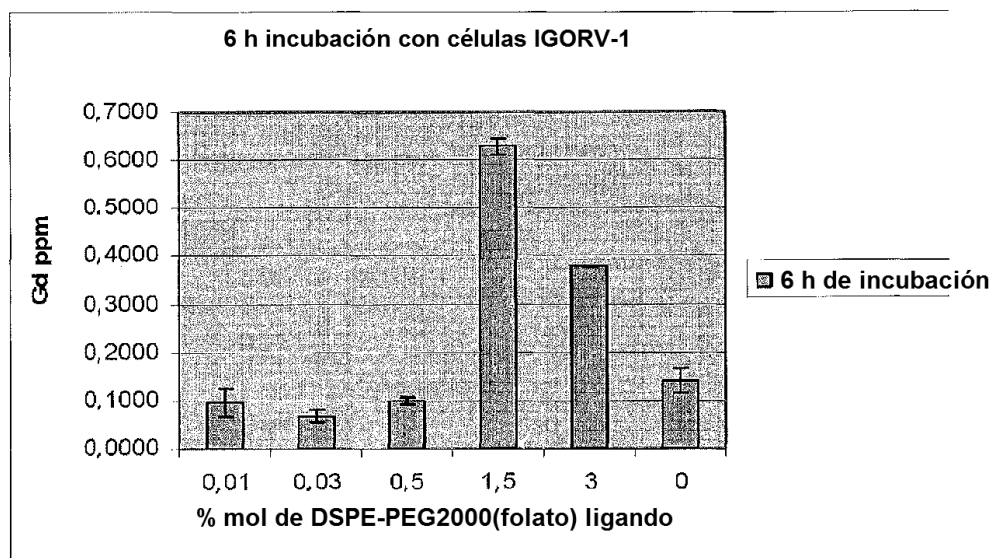
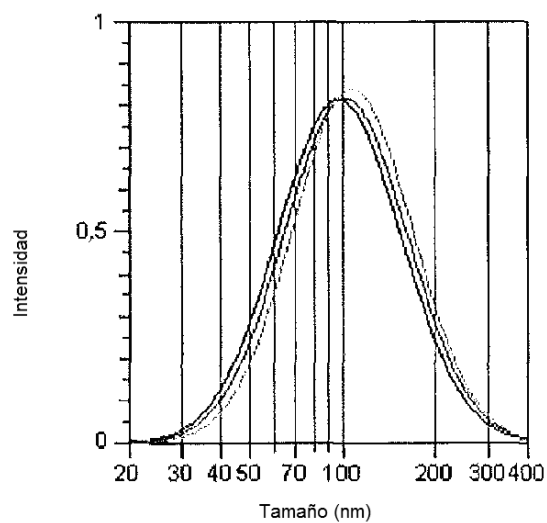


Figura 23



ID	Z-Prom (nm)	Pdl	Int-Pico (nm)	%Int	Vol-Pico (nm)	%Vol
ultrasonidos en baño 0,46 um filtrado	100,4 (0,6)	0,131 (0,014)	115,8 (1,9)	100 (0)	87,1 (1,5)	100 (0)
ultrasonidos en baño 0,20 um filtrado	99,5 (0,6)	0,086 (0,017)	109,5 (1,6)	100 (0)	90,5 (1,4)	100 (0)

Figura 24

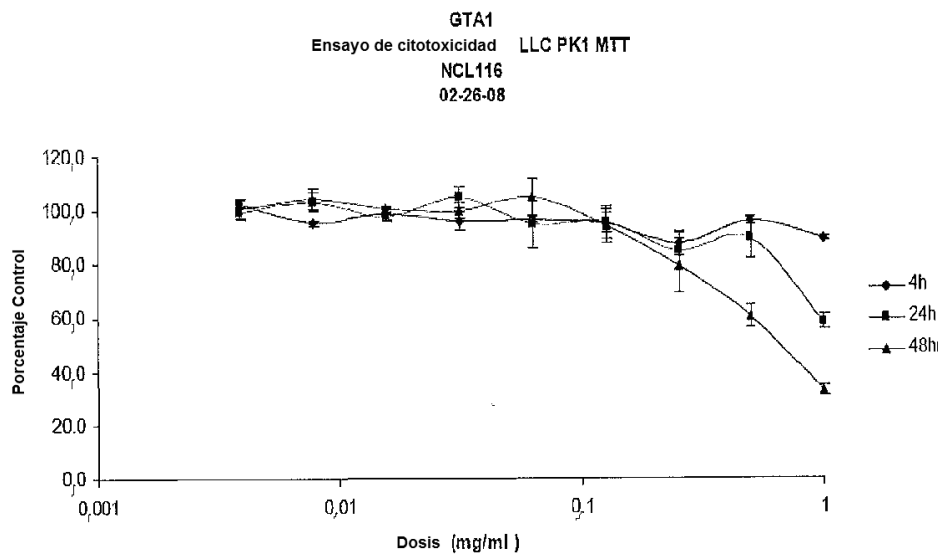


Figura 25

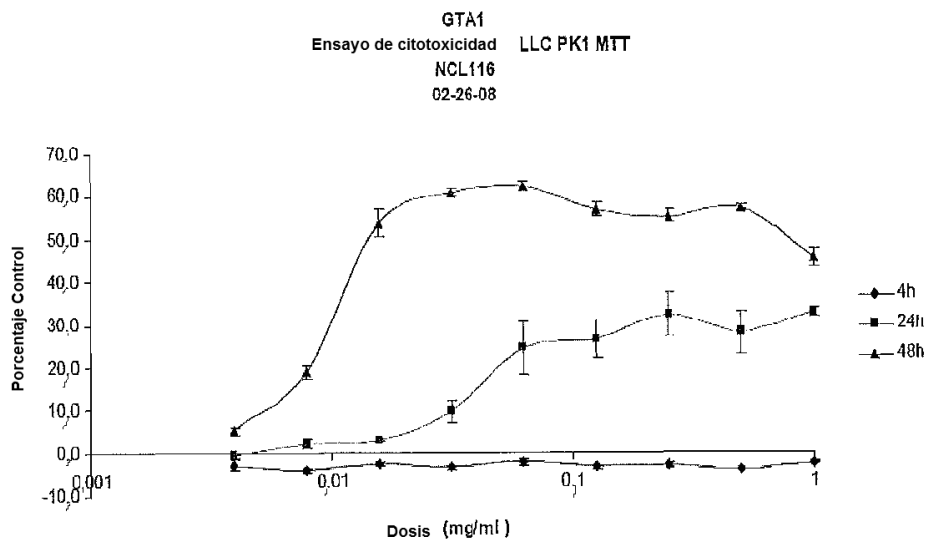


Figura 26

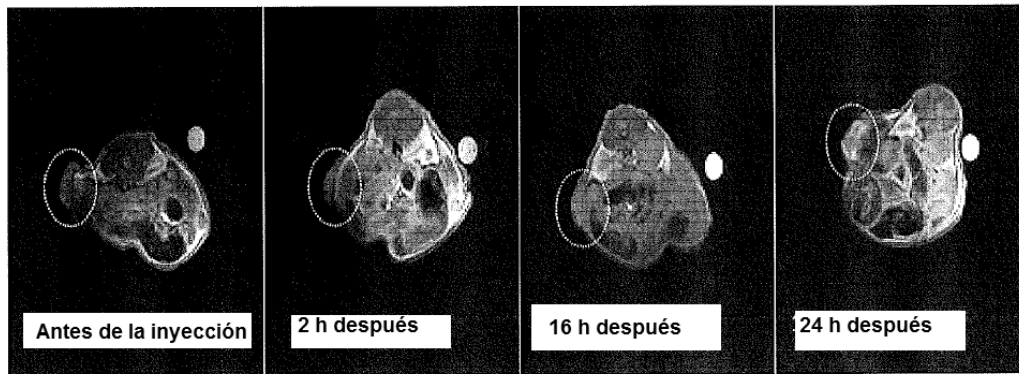


Figura 27

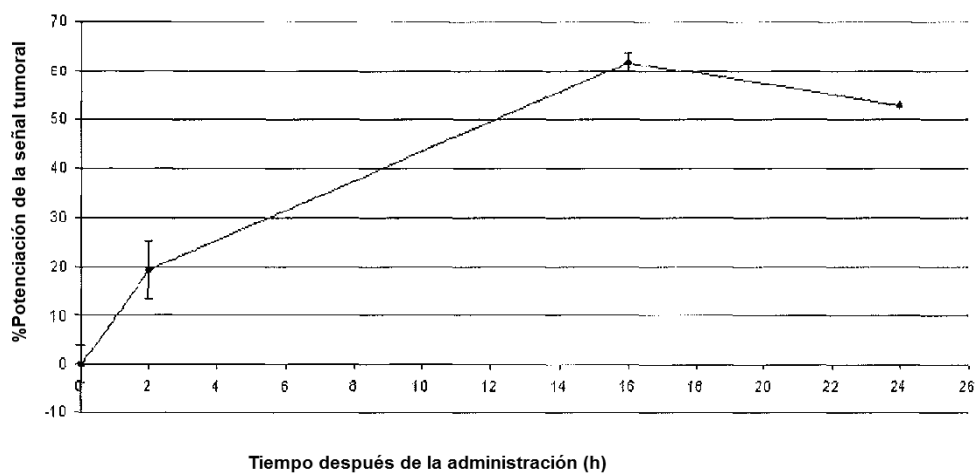


Figura 28



Figura 29