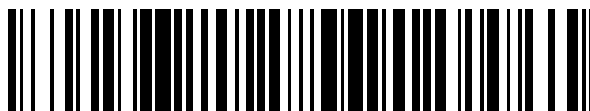


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 821**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2012** **PCT/EP2012/068288**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013** **WO13041500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2012** **E 12759459 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017** **EP 2758081**

54 Título: **Complejos de microburbujas y métodos de uso**

30 Prioridad:

19.09.2011 US 201113235890

20.06.2012 US 201213528399

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
05.07.2017

73 Titular/es:

GENERAL ELECTRIC COMPANY (100.0%)

1 River Road

Schenectady, NY 12345, US

72 Inventor/es:

SOOD, ANUP;

ROTHMAN, JAMES, E.;

LOWERY, LISA;

BURCZAK, JOHN;

LIM, HAE, WON y

MOHAN, PRAVEENA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 621 821 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

Complejos de microburbujas y métodos de uso

La invención se refiere en general a la unión novedosa de agentes terapéuticos a productos farmacéuticos de microburbujas de albúmina usando un enlazamiento de ligandos con afinidad por albúmina con los agentes. La unión proporciona un método de suministro asistido por microburbujas de agentes terapéuticos a células o tejido diana de interés, *in vitro* o *in vivo*.

La destrucción mediada por ultrasonidos de microburbujas portadoras de fármacos se ha encontrado que es útil como un sistema de suministro de fármacos no invasivo. Pueden incorporarse fármacos u otros agentes terapéuticos a las microburbujas en una serie de modos diferentes, incluyendo la unión del fármaco a la cubierta de la microburbuja y el enlazamiento de ligandos. Por ejemplo, las microburbujas rellenas de perfluorocarburo son suficientemente estables para circular por los vasos como agentes de contraste intravasculares; actúan como portadores de estos agentes hasta alcanzar el sitio de interés. Los ultrasonidos aplicados sobre la superficie de la piel pueden usarse entonces para explotar las microburbujas en ese sitio, causando la liberación localizada del fármaco o agentes terapéuticos en localizaciones específicas de sitio.

Más específicamente, las microburbujas de albúmina se han usado y suministrado a una diana orgánica específica mediante ultrasonidos acústicos dirigidos a sitio. La albúmina es una proteína importante en la sangre y su papel fisiológico natural es unirse a y portar una amplia variedad de ligandos lipófilos/poco solubles por el cuerpo. Estos ligandos, que pueden tener afinidad por la albúmina, incluyen ácidos grasos y otros productos biosintéticos y catabólicos que son de naturaleza hidrófoba. Como tales, las microburbujas de albúmina se han usado para portar una variedad de agentes terapéuticos basados en proteínas y otros productos biológicos, incluyendo oligonucleótidos (ODN) y polinucleótidos tales como ODN anticodificantes, con secuencias complementarias de una secuencia de ARN mensajero (ARNm) diana específica. Estos complejos de microburbujas-ácido nucleico pueden generarse a partir de ODN no modificados que se mezclan con albúmina o componentes lipídicos durante la formación de la cubierta de microburbujas o, como alternativa, la formación de complejo puede efectuarse mezclando microburbujas preformadas con un ODN de interés. En ambos casos, el ODN actúa como intervención mecánica en el proceso de traducción génica o un evento de procesamiento anterior. La ventaja de este enfoque es el potencial de acciones específicas de gen que deberían reflejarse en una dosis relativamente baja y mínimos efectos secundarios no buscados.

Sin embargo, es conocido que hay una barrera clave para traducir la potente biología del ODN en fármacos al nivel de suministro de fármacos con eficacia y seguridad. Por ejemplo, el suministro de ODN con formulación química, vectores víricos y suministro de partículas se ha dificultado por problemas relacionados con la seguridad clínica antes que pueda alcanzarse la eficacia terapéutica. Además, el uso de microburbujas de albúmina como portador de ODN tales como ARNip está limitado debido a la unión limitada de los ODN a las microburbujas de albúmina, así como a la estabilidad del complejo de albúmina-ODN. Debido al potencial de superficie de cubierta negativo de la albúmina, los ácidos nucleicos más cortos cargados negativamente no se unen muy bien a las microburbujas y las eficacias de transfección génica usando estos complejos son generalmente subóptimas.

El documento WO9733474 describe un método de suministro de agentes biológicamente activos a sitios de tejido específicos que comprende: formar una solución de microburbujas encapsuladas en proteína rellenas de gas insoluble, estando dichas microburbujas conjugadas con dicho agente biológico; administrar dicha disolución a un animal y exponer dicho sitio de tejido a ultrasonidos de modo que dicho agente biológico se libere en dicho sitio.

El documento EP1488813 describe una composición que tiene un agente biológicamente activo incorporado a la misma, caracterizada porque la composición es para suministrar el agente biológicamente activo a un sitio específico del cuerpo vivo, y comprende microesferas de albúmina encapsuladas en microburbujas que contienen perfluorocarburo.

El documento de Lu QL *et al* (2003), *Gene Therapy*, vol. 10, pág. 396-405 describe materiales y métodos con los que los ultrasonidos de microburbujas mejoran la eficacia de transducción génica en músculo esquelético *in vivo* con daño de tejido reducido.

El documento W09818500 describe la funcionalización de microesferas de albúmina rellenas de gas con biotina para orientación específica múltiple.

El documento WO2008053360 describe compuestos de unión a albúmina que son útiles para mejorar las propiedades farmacocinéticas de agentes de diagnóstico o terapéuticos, en particular aumentar el tiempo de circulación sanguínea y/o la capacidad de penetración en tejido de dichos agentes.

El documento de Srinivasan SK *et al* (1995), "Antisense Research and Application", vol. 5, pág. 131-139 describe que un oligonucleótido sustituido con colesterol desplaza a fármacos fuertemente interactivos de la albúmina.

Por tanto, existe la necesidad de mejorar la unión de los agentes terapéuticos a las microburbujas así como de mejorar la estabilidad y eficacia del complejo de microburbujas.

Además, existe la necesidad de reducir la toxicidad en el suministro selectivo de fármacos altamente citotóxicos. El suministro no orientado de estos fármacos puede causar toxicidad sistémica y ha evitado el uso de muchos de estos fármacos en conjunto o a las dosis mayores requeridas para una buena eficacia. Los intentos de suministrar estos como profármacos han reducido en muchos casos este problema, sin embargo, la captación selectiva en el tejido diana no es siempre fácil de conseguir, ya que la mayoría de los mecanismos de captación en el tejido enfermo están también presentes en el tejido normal. Potenciar la captación de estos fármacos en tejidos selectivos por mecanismos no naturales como se divulga en la presente memoria puede añadir por lo tanto un valor considerable.

Sumario de la invención

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes. Se proporcionan en la presente memoria composiciones y métodos novedosos para una unión aumentada de fármacos terapéuticos a microburbujas usando la afinidad de composiciones terapéuticas de ligando hacia la cubierta de albúmina.

La circulación sistémica de las microburbujas portadoras de la composición terapéutica puede visualizarse fácilmente mediante imagenología de ultrasonidos. El agente terapéutico se libera de las microburbujas usando un desencadenante de pulso de ultrasonido de alta energía específico en el sitio de tratamiento. La cavitación de las microburbujas causa la sonoporación de las células/tejido vecino.

En una realización, se divulga un complejo de microburbujas que comprende una microburbuja que tiene una cubierta externa que comprende una mezcla de albúmina nativa y desnaturalizada y un núcleo hueco que encapsula un gas de perfluorocarburo, un agente terapéutico seleccionado del grupo que comprende un agente quimioterapéutico de molécula pequeña, un péptido, un carbohidrato o un oligonucleótido, citotoxina, inhibidor de la síntesis de proteína o combinación de los mismos y un ligador bifuncional que tiene un extremo enlazado con el agente terapéutico y el otro enlazado con un ligando mediante reacción de un grupo reactivo en el ligando. El ligando está unido a la cubierta externa de la microburbuja a través de interacciones hidrófobas.

En otra realización, se divulga un complejo de microburbuja anteriormente mencionado para uso en un método de suministro de un agente terapéutico a una diana de tejido. El método comprende las etapas de proporcionar el complejo de microburbujas, administrar el complejo de microburbujas a un sujeto, en el que el sujeto es la fuente de la diana de tejido, y administrar energía ultrasónica al sujeto, en el que la energía ultrasónica es suficiente para causar la cavitación del complejo de microburbuja en la diana de tejido.

Se comprenderán mejor estos y otros rasgos, aspectos y ventajas de la presente invención cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La FIG. 1 es una representación de la unión no covalente de ligando de ARNip a microburbujas de albúmina.

La FIG. 2 es una microfotografía representativa de un ensayo de desplazamiento en gel para una mezcla de ARNip conjugado con colesterol (2 pmol) y cantidades variables de Optison (0, 9, 22 y 46 pmol para i, ii, iii y iv, respectivamente).

La FIG. 3 es una microfotografía representativa de un ensayo de desplazamiento en gel para Cy3-ARNip (4 pmol) mezclado con concentraciones variables de Optison o bien HSA nativo que no muestra desplazamiento en el ensayo en gel.

La FIG. 4 es una microfotografía representativa de un ensayo en gel de Cy3-colesterol-ARNip (2 pmol) mezclado con concentraciones variables de Optison, HSA nativa o HSA desnaturalizada.

La FIG. 5 es una representación gráfica de las propiedades de unión de colesterol-ARNip a Optison y HSA nativa; (A) la fluorescencia relativa de las bandas de colesterol-ARNip se mide a partir del ensayo de desplazamiento en gel; (B) la fracción unida de ARNip se calcula a partir de la fluorescencia relativa y se representa frente a la concentración de albúmina.

La FIG. 6 es una representación gráfica de la captación de ARNip por células tumorales U-87 en Opticell que se cuantifica midiendo la fluorescencia de cy3 en células.

La FIG. 7 incluye microfotografías de imágenes de fluorescencia que muestran una comparación de la transfección de ARNip entre un reactivo de transfección lipídica (RNAitect) y Optison.

La FIG. 8 es una representación gráfica de los valores de fluorescencia celular media y del error estándar de la transfección de ARNip entre un reactivo de transfección lipídica (RNAitect) y Optison.

La FIG. 9 es una representación gráfica de la fracción unida de miristato de fluoresceína a Optison y HSA nativa calculada a partir de los valores de anisotropía.

Las FIG. 10 A y B son la fluoresceína unida a Optison (0, 8, 40 y 200 pmol para i, ii, iii y iv respectivamente) y visualizada en el gel como bandas oscuras para miristato de fluoresceína (63 pmol) y estearato de fluoresceína (180 pmol) respectivamente.

Descripción detallada de la invención

La invención en su sentido más amplio se define en las reivindicaciones independientes.

La siguiente descripción detallada es ejemplar y no pretende limitar la invención de la solicitud ni usos de la invención. Además, no hay intención de limitarse por ninguna teoría presentada en los antecedentes precedentes de la invención o descripciones de los dibujos.

La invención se refiere en general al suministro asistido por microburbujas de un agente terapéutico a células o tejido de interés, *in vitro* o *in vivo*.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico puede comprender un agente quimioterapéutico de molécula pequeña, un péptido, un carbohidrato o un oligonucleótido; y un ligador bifuncional que tiene un extremo enlazado con el agente terapéutico y el otro enlazado con un ligando mediante reacción de un grupo reactivo en el ligando, y en el que el ligando se une a la cubierta externa de la microburbuja. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico puede ser un oligonucleótido (ODN). Los oligonucleótidos hacen referencia a polímeros de ácido nucleico que se forman mediante la escisión de enlace de ácidos nucleicos más largos o se sintetizan usando bloques de construcción, fosforamiditas protegidas de nucleósidos naturales o químicamente modificados o, en menor medida, de compuestos no nucleosídicos. La longitud del oligonucleótido puede variar desde un polímero de ácido nucleico corto de cincuenta o menos pares de bases a más de 200 pares de bases. Como se usa en la presente memoria, ODN hace referencia también a polinucleótidos que tienen más de 200 pares de bases. Se incluyen también ODN anticodificantes que hacen referencia a hebras sencillas de ADN o ARN que son complementarias de una secuencia elegida. En el caso de ARN anticodificante, el ARN anticodificante previene la traducción de proteína de ciertas hebras de ARN mensajero al unirse a las mismas. El ADN anticodificante puede usarse para orientar a un ARN complementario específico (codificante o no codificante). Se incluyen también ARN interferentes pequeños (ARNip), a veces conocidos como ARN interferente corto o ARN silenciador, que es una clase de moléculas de ARN bicatenario, típicamente de 20-25 nucleótidos de longitud, que desempeñan una variedad de papeles en la biología incluyendo la ruta de interferencia de ARN (iARN), donde interfiere con la expresión de un gen específico, como mecanismo antivírico o en la conformación de la estructura de cromatina de un genoma.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico puede ser una citotoxina. Como se usa en la presente memoria, citotoxina hace referencia a una sustancia que tiene un efecto tóxico sobre las células. Por ejemplo, una citotoxina puede causar la experimentación de necrosis, en que pierden la integridad de membrana y mueren como resultado de la lisis celular. En otros ejemplos, una citotoxina puede estar asociada con citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo, en la que una célula se marca por un anticuerpo y reacciona ante ciertos linfocitos.

Los ejemplos de agentes citotóxicos se enumeran en "The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Goodman and Gilman, Décima edición, McGraw-Hill, Nueva York, 2001. Estos incluyen taxol; mostazas nitrogenadas tales como mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, mostaza de uracilo y clorambucilo; derivados de etilenimina tales como tiotepa; alquilsulfonatos tales como busulfán; nitrosoureas tales como carmustina, lomustina, semustina y estreptozocina; triazenos tales como dacarbazina; análogos de ácido fólico tales como metotrexato; análogos de pirimidina tales como fluorouracilo, citarabina y azaribina; análogos de purina tales como mercaptopurina y tioguanina; alcaloides de vinca tales como vinblastina y vincristina; antibióticos tales como dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, mitramicina y mitomicina; enzimas tales como L-asparaginasa; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino; urea sustituida tal como hidroxiiurea; derivados de metilhidrazina tales como procabazina; supresores adrenocorticales tales como mitotano; hormonas y antagonistas tales como adrenocorticosteroides (prednisona), progestinas (caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroprogesterona y acetato de megestrol), estrógenos (dietilestilbestrol y etinilestradiol), antiestrógenos (tamoxifeno) y andrógenos (propionato de testosterona y fluoximesterona).

Pueden acoplarse también con el ligando fármacos que interfieren con la síntesis de proteína intracelular, los inhibidores de la síntesis de proteína; dichos fármacos son conocidos por los especialistas en la materia e incluyen puromicina, cicloheximida y ribonucleasa.

En una realización, la proteína para la que el agente terapéutico actúa como inhibidor incluye, pero sin limitación, enzimas, proteínas solubles y séricas, proteínas expresadas sobre la superficie de una célula, proteínas no inmunoglobulinas, proteínas intracelulares y segmentos de proteínas que son o pueden hacerse hidrosolubles, individualmente o en combinaciones de las mismas así como cualquier derivado de las proteínas.

En una realización particular, la proteína incluye tal como, pero sin limitación, cisteína proteasas, glutathion-S-transferasa, epóxido hidrolasa (EH), tiolasa, oxidoreductasa dependiente de NAD/NADP, enoil-coA hidratasa, aldehído deshidrogenasa, hidroxipiruvato reductasa, transglutaminasa de tejido (tTG), formiminotransferasa ciclodesaminasa (FTCD), aminolevulinato deshidratasa (ADD), creatina cinasa, carboxilesterasa (LCE), monoacilglicerol (MAG) lipasa, metaloproteasas (MP), fosfotasa (proteína tirosina fosfotasa, PTP), proteosoma, proteína de unión a FK506 (FKBP12), diana de mamífero de rapamicina (mTOR; conocida como alternativa como dominio de unión a FBP-rapamicina (FRB)), serina hidrolasa (superfamilia), proteína de unión a ubiquitina, -galactosidasa, enzimas de unión a nucleótido, proteína cinasas, proteínas de unión a GTP, cutinasa,

adenilosuccinato sintasa, adenilosuccinato liasa, glutamato deshidrogenasa, dihidrofolato reductasa, ácido graso sintasa, aspartato transcarbamilasa, acetilcolinesterasa, HMG-colato reductasa y ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), individualmente o en combinaciones de las mismas. Se incluyen también derivados de cualquiera de las proteínas.

- 5 En otro ejemplo, la proteína está sustancialmente exenta de un cofactor. "Sustancialmente exenta de un cofactor" incluye proteínas que no requieren ningún cofactor, producto químico, modificación química o modificación física adicional para ser naturalmente estables en condiciones fisiológicas y a temperatura y presión ambientales en disolución o como un sólido, y pueden unirse a su correspondiente ligando *in vivo*.

- 10 En una realización, puede utilizarse una microburbuja de albúmina para portar un agente terapéutico en suministro sistémico. Puede usarse entonces energía acústica ultrasónica orientada a tejido para cavitarse la microburbuja de albúmina y suministrar el agente terapéutico al entorno intracelular. Por ejemplo, el complejo de microburbujas puede administrarse por vía intravenosa o al peritoneo (por vía intraperitoneal) de un sujeto cuyas células o tejidos sean las dianas. Una vez se porta el complejo de microburbujas a través del sujeto hasta la célula diana, se suministra la energía acústica ultrasónica. En ciertas realizaciones, puede ocurrir la visualización de las células diana antes del suministro de ultrasonido, aunque en aún otras realizaciones la visualización puede efectuarse instantáneamente y monitorizarse la cavitación.

- 15 En ciertas realizaciones, la cubierta externa de albúmina de la microburbuja comprende tanto albúmina nativa como desnaturalizada mantenidas juntas principalmente por enlaces de cisteína a cisteína. En ciertas realizaciones, la composición primaria de la cubierta de albúmina está principalmente en la forma nativa, permitiendo la porción desnaturalizada enlazamientos por enlace de cisteína aumentados. En ciertas realizaciones, la cantidad relativa de albúmina desnaturalizada a albúmina nativa oscila de aproximadamente 0,5 a 30 % en peso. En otras realizaciones, la cantidad relativa está en el intervalo de aproximadamente 1 a 15 % en peso. La mezcla de albúmina nativa y desnaturalizada proporciona un equilibrio de la elasticidad de la cubierta necesaria para la cavitación con sitios de unión reactivos aumentados sobre la superficie de la microburbuja. Las microburbujas pueden formarse por sonicación de gas perfluorocarburo en presencia de una disolución de albúmina precalentada, o como alternativa, mezclando el gas y la albúmina precalentada usando altas fuerzas de cizallamiento. Una pequeña parte de las moléculas de albúmina se reorganiza durante la sonicación de la disolución de albúmina precalentada y ocurre reticulación a través de ligamientos disulfuro entre moléculas de albúmina. Se cree que estas moléculas de albúmina son de estructura similar a la forma F de la albúmina, que tiene más residuos hidrófobos expuestos. Esto permite sitios de unión aumentados para las interacciones hidrófobas.

- 20 La microburbuja se rellena con un gas de perfluorocarburo insoluble tal como, pero sin limitación, perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropano, perfluorobutano, perfluoropentano o una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, las microburbujas son de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 micrómetros de diámetro, estando optimizado el tamaño para permitir la circulación a través de la corriente sanguínea.

- 25 En ciertas realizaciones, los complejos de microburbujas terapéuticos comprenden un agente terapéutico modificado con un ligador que tiene un grupo reactivo capaz de unirse a un ligando que tiene afinidad hacia la albúmina. Como tal, el agente terapéutico puede acoplarse con albúmina a través del ligando.

- 30 El ligador incluye cualquier resto ligador que enlace el ligando con el agente terapéutico a través de un primer resto. El ligador puede ser tan corto como un carbono o una especie polimérica larga tal como polietilenglicol, tetraetilenglicol (TEG), polilisina u otra especie polimérica usada normalmente en la industria farmacéutica para modular la farmacocinética y características de biodistribución de los agentes terapéuticos. Otros ligadores de longitud variable incluyen la longitud C1-C250 con uno o más heteroátomos seleccionados de O, S, N y P, y opcionalmente sustituidos con átomos de halógeno. En una realización particular, el ligador comprende al menos una especie oligomérica o polimérica compuesta por monómeros naturales o sintéticos, un resto oligomérico o polimérico seleccionado de una composición oligomérica o polimérica farmacológicamente aceptable, un oligo- o poliaminoácido, péptido, sacárido, nucleótido y resto orgánico con 1-250 átomos de carbono, individualmente o en combinación de los mismos. El resto orgánico con 1-250 átomos de carbono puede contener uno o más heteroátomos tales como O, S, N o P y está opcionalmente sustituido con átomos de halógeno en uno o más lugares.

- 35 El primer resto puede ser simplemente una extensión del ligador, formado por la reacción de una especie reactiva en el ligador con un grupo reactivo en el agente terapéutico. Los ejemplos de especies reactivas y grupo reactivo incluyen, pero sin limitación, ésteres activados (tales como éster de N-hidroxisuccinimida, éster de pentafluorofenilo), una fosoramidita, un isocianato, un isotiocianato, un aldehído, un cloruro de ácido, un cloruro de sulfonilo, una maleimida, un haluro de alquilo, una amina, una fosfina, un fosfato, un alcohol o un tiol, con la condición de que la especie reactiva y el grupo reactivo combinen para experimentar una reacción que procure conjugados ligados covalentemente.

40 En ciertas realizaciones, el grupo reactivo puede ser una funcionalidad amina primaria y, como tal, el agente terapéutico modificado con amina puede conjugarse con el ligando de afinidad a través de la reacción de un resto carboxilo del ligando. En ciertas otras realizaciones, el grupo reactivo puede ser un alcohol enlazado con el ligando a través de un grupo fosfato.

El ligando, también llamado ligando de afinidad, incluye ácidos grasos, esteroides, compuestos aromáticos pequeños o una combinación de los mismos. Pueden encontrarse ejemplos de moléculas de unión a albúmina en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. número 2010/0172844, publicada el 8 de julio de 2010.

5 Por ejemplo, en ciertas realizaciones el ligando de afinidad es un ácido graso incluyendo, pero sin limitación, miristoílo, litocolicoílo, docosanilo, lauroílo, esteoroílo, palmitoílo, oleílo o linoleílo. En otras realizaciones, el ligando de afinidad es una molécula lipófila tal como un esteroide o esteroide modificado incluyendo colesterol, ácido cólico, ácido litocólico o ácido quenodesoxicólico. En otras realizaciones, el ligando de afinidad es una molécula de alta afinidad seleccionada de ácido 4-p-yodofenilbutírico y análogos o derivados del mismo. En aún otras realizaciones, el agente terapéutico comprende ARNip, el ligador comprende tetraetilenglicol y el ligando comprende colesterol.

10 En ciertas realizaciones, los complejos de producto terapéutico-albúmina pueden prepararse por sonicación de agente terapéutico modificado con ligando con albúmina o lípido en presencia de perfluorocarburo o mezclando burbujas preformadas con agentes terapéuticos modificados con ligando. En ciertas realizaciones, estas moléculas pueden enlazarse con agentes terapéuticos de interés durante la síntesis de agente terapéutico. Por ejemplo, pueden usarse fosforamiditas de colesterol para incorporar colesterol durante la síntesis de ADN o ARN en un sintetizador de ácido nucleico, o después de la síntesis incorporando un resto reactivo.

15 En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un ODN modificado que puede prepararse enzimáticamente usando trifosfatos de nucleósido modificados; modificados con el ligando mismo o con una funcionalidad reactiva para modificación después de la síntesis con el ligando. El enlazamiento de ligando puede ser en uno o ambos extremos, interno a la secuencia de ácido nucleico o en múltiples posiciones, dependiendo del uso del ODN. En ciertas realizaciones, cuando el ODN es ARNip, el enlazamiento puede ser a través de la posición 3' OH.

En ciertas realizaciones, además del ligando, el agente terapéutico, incluyendo cuando el agente terapéutico es ODN, puede modificarse selectivamente para protegerlo de las nucleasas. En ciertas realizaciones, la modificación estabilizante puede incluir modificación de fosforotioato o modificación de 2'-OMe.

25 En ciertas realizaciones, los complejos de microburbujas pueden incubarse con células o el tejido de interés o inyectarse en el cuerpo, preferiblemente por vía intravenosa, y cavitarse entonces con energía ultrasónica en el sitio deseado y en un momento predeterminado o durante la imagenología en vivo.

30 En ciertas realizaciones, el complejo de microburbujas puede observarse durante el trayecto sistémico en la circulación sanguínea por imagenología de diagnóstico de ultrasonidos normal. Cuando la burbuja llega a la diana de tejido, en este caso el tumor, se envían al tumor una serie de ondas de energía acústica por pulsos. Esto crea cavitación inercial en la microburbuja que colapsa la microburbuja. La cavitación de la microburbuja ocurre cuando la energía acústica se localiza máximamente. Esta dirección se consigue con la sonda de ultrasonidos mediante parámetros relacionados con la fuerza de índice mecánico, la distancia acústica ultrasónica óptima y las dimensiones del barrido acústico ultrasónico. La fuerza generada puede formar entonces potencialmente microporos en la membrana plasmática celular. Típicamente, se administra la energía por pulsos a una frecuencia de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 MHz.

35 Estos microporos, junto con la fuerza de microchorro creada por la cavitación inercial, pueden facilitar la entrada de ODN en el entorno citoplasmático celular. Por ejemplo, cuando el ODN es ARNip, el ARNip en el entorno intracelular utilizará la maquinaria del hospedador para silenciar el ARNm y más tarde la síntesis de proteína. De forma similar, cuando el mensaje del ARNm actúa como una proteína promotora de la angiogénesis, incluyendo factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la reducción de la expresión de VEGF en un tumor puede detener o retardar el crecimiento tumoral. Después de la cavitación de microburbujas, se expelle del cuerpo el gas denso del centro de la microburbuja y se metaboliza la cubierta de albúmina y se excreta mediante la ruta de eliminación hepática.

40 En una realización ejemplar, puede mezclarse un bolo de complejo de microburbuja a una relación óptima a partir de investigaciones terapéuticas previas. Una vez se establece la mezcla del complejo, se inyecta sistémicamente el fármaco en bolo por vía venosa.

45 Por ejemplo, en el uso de un bolo de ARNip-microburbuja, puede monitorizarse el bolo en la cinética sanguínea del primer paso. La resonancia de microburbuja y por tanto el contraste ultrasónico potenciado pueden monitorizarse con una sonda ultrasónica usando niveles de diagnóstico bajos de energía acústica. Durante la circulación, el bolo llega a una diana orgánica. La perfusión de tejido cardiovascular puede ayudar a suministrar el bolo a los microvasos profundos con diámetros de lumen pequeños. Al suministrar energía acústica por pulsos, puede suministrarse suficiente energía para que la microburbuja experimente cavitación inercial. Una vez se completa la cavitación de la microburbuja, pueden suministrarse los contenidos del ARNip a través de la membrana plasmática y en la célula enferma. En el entorno celular citoplasmático, el ARNip puede tener un efecto terapéutico.

50 Durante la cavitación de microburbuja, puede ocurrir la entrada de ARNip en la célula mediante diversos mecanismos. Por ejemplo, el ARNip puede entrar en la célula por: una fuerza de microchorro de la microburbuja colapsada que puede empujar el ARNip al citoplasma. Como alternativa, el mecanismo puede incluir energía de microchorro o energía de sonoluminiscencia que crea microporos temporales en la membrana plasmática para permitir la difusión pasiva del ARNip en la célula, o durante la resonancia de microburbuja antes de la cavitación

real, los choques de la microburbuja con la membrana plasmática pueden empujar el ARNip a la célula.

Como tal, el mecanismo de suministro de microburbujas tiene aplicaciones potenciales en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, que pueden incluir cáncer, enfermedades inflamatorias, infecciosas, cardiovasculares, metabólicas, autoinmunitarias, y del sistema nervioso central. Muchas de estas enfermedades no pueden tratarse eficazmente actualmente debido a los mecanismos moleculares de orientación no accesibles a fármacos de molécula pequeña convencionales y anticuerpos monoclonales.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1. Complejo de microburbuja-ARNip

La FIG. 1 es una ilustración representativa de la unión de ARNip a microburbujas encapsuladas de albúmina formando un complejo de microburbuja-ARNip.

El ARNip diana para silenciamiento de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) se sintetizó mediante tecnologías de IDTDNA. IDTDNA proporcionaba modificaciones lipídicas tales como colesterol-TEG al ARNip (col-ARNip), así como conjugación con tinte.

Hebra codificante: 5'-Cy3/GCAUUUGUUUGUCCAAGAUmUmU/3'-lípidio (SEQ ID NO: 1)

Hebra anticodificante: 5'/mAmArA rUrCrU rUrGrG rArCrA rArArC rArArA rUrGrC/3' (SEQ ID NO: 2)

El tinte de cianina, Cy3, en el ARNip tiene una longitud de onda de excitación de 550 nm y un pico de emisión de 580 nm. El ARNip se ha marcado con un tinte cy3 para una fácil visualización del ARNip durante los ensayos de unión y otras técnicas de caracterización. Se centrifugó Optison™ (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido, albúmina 10 mg/ml); se desechó la capa superior y se usó la disolución de albúmina en exceso en la inferior para los estudios de unión. Se disolvió polvo de seroalbúmina humana (HSA) liofilizada (Sigma Aldrich, St. Louis MO) en 1x disolución salina tamponada con fosfato (PBS) para elaborar una solución madre de 10 mg/ml. Se prepararon diluciones tanto de Optison como de la disolución de albúmina nativa con 1x PBS. Se preparó la solución de HSA desnaturalizada calentando la disolución de HSA nativa a 80 °C durante 20 minutos.

Reacción de unión:

Se prepararon las soluciones madre de cy3-ARNip y cy3-ARNip-colesterol 20 µM en agua exenta de ARNasa y se almacenaron a -20 °C. Se mezclaron 4 pmol de disoluciones de cy3-ARNip y 2 pmol de colesterol-ARNip con cantidades variables de disolución de Optison, HSA nativa y disolución de HSA desnaturalizada, en el intervalo de 0 a 50 pmol. El tampón de reacción era 1x PBS, pH 7,4. Se incubó la mezcla de reacción en la oscuridad a 25 °C durante 45 minutos. Después de la incubación, se mezclaron diez µl de mezclas de ARNip con 2 µl de tampón de muestra Novex® Hi-Density TBE (5X) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Electroforesis en gel:

Se cargaron todas las reacciones en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 6 % preformados (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se desarrolló el gel a 100 V durante 45 min en 0,5X tampón de desarrollo Novex TBE (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se sometieron a imagenología los geles que contenían ADN, proteína o ambos con fluorescencia de cy3 usando un escáner Typhoon (Typhoon™9410, GE Healthcare).

Resultados:

La fluorescencia de Cy3 enlazado a ARNip puede visualizarse como bandas de ARNip distintas en el gel. Cuando se desarrolló una mezcla de ARNip y disolución de albúmina en el gel, la movilidad del ARNip unido a albúmina es más lenta que en ARNip libre, dando como resultado dos bandas en el gel. En ensayos preliminares, se usó el tinte Sypro ruby del kit EMSA (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) para observar las bandas de albúmina en el gel. Se muestra un ejemplo en la FIG. 2, que es un ensayo de desplazamiento en gel de una mezcla de ARNip conjugado con colesterol (2 pmol) y cantidades variables de Optison (0, 9, 22 y 46 pmol para i, ii, iii y iv respectivamente). La imagenología de fluorescencia del gel muestra bandas distintas para ARNip (secciones de banda inferiores) y albúmina (secciones de banda superiores).

Cy3-ARNip

Cuando se desarrolló la mezcla de cy3-ARNip y HSA nativa/Optison en el gel, no se visualizaba ARNip unido para concentraciones crecientes de albúmina. No había una unión significativa de cy3-ARNip con HSA nativa ni disolución de Optison. Esto se muestra en la FIG. 3, que es una imagen de fluorescencia de un gel para Cy3-ARNip (4 pmol) mezclado con concentraciones variables de Optison o HSA nativa, que no muestra desplazamiento en el ensayo en gel. Las bandas oscuras en el gel son la fluorescencia de cy3 en el ARNip. No hay unión significativa de cy3-ARNip tanto a Optison como a HSA nativa.

Col-ARNip

La FIG. 4 muestra las imágenes en gel para la unión de col-ARNip con Optison, HSA nativa y HSA desnaturalizada. Col-ARNip se unía tanto a HSA nativa como a disolución de Optison, mientras que la unión disminuía significativamente para la misma cantidad de HSA desnaturalizada. Se estimó manualmente la intensidad de fluorescencia de ARNip en cada carril trazando un recuadro alrededor de las bandas. Se restó el fondo equivalente al valor de intensidad media del gel del valor de intensidad de cada banda de ARNip. Se calcularon las intensidades de fluorescencia de ARNip unido en un amplio intervalo de concentraciones de albúmina. Se calculó la fluorescencia relativa, R, como:

$$R = (\text{Funido-Flibre}) / \text{Flibre} \quad (1)$$

La Funido es la intensidad de fluorescencia de la banda de ARNip unido y la Flibre es la intensidad de fluorescencia de la banda de ARNip libre. Se representó la fluorescencia relativa frente a la concentración de albúmina. Esto se muestra en la FIG. 5, que es una comparación gráfica de las propiedades de unión de colesterol-ARNip a Optison y HSA nativa como se describe a continuación.

A una concentración baja de albúmina que oscila de 0 a 15 μM , se visualizó la dependencia lineal de la concentración de albúmina de la fluorescencia unida. La FIG 5, gráfica A, muestra que, a este intervalo de concentración, la cantidad de col-ARNip unido a la disolución de Optison era mayor que la unión a HSA nativa. Para estimar las constantes de unión, se usó una concentración de albúmina mayor para permitir la saturación de la cantidad de ARNip unido a albúmina. Se determina la fracción unida, x, como:

$$x = (\text{Funido-Flibre}) / (\text{Fsat-Flibre}) \quad (2)$$

La Fsat es la intensidad de fluorescencia máxima de ARNip unido en condiciones saturantes.

Se representó la fracción unida frente a concentraciones de albúmina crecientes, como se muestra en la FIG. 5, gráfica B, y se ajustaron los puntos de datos a la siguiente ecuación de equilibrio:

$$x = n \cdot [\text{albúmina}] / (kd + [\text{albúmina}]) \quad (3)$$

kd es la constante de disociación, n es el número de sitios de unión y [albúmina] es la concentración de albúmina total para las muestras respectivas. Se resolvió la ecuación 3 usando un ajuste no lineal para determinar kd y n para la unión de col-ARNip tanto a Optison como a HSA nativa (Tabla 1). Se utilizó la herramienta Solver de Microsoft Excel para este ajuste no lineal, y se encontró que la suma de errores cuadráticos (SSE) era de 0,07 y 0,06 para Optison y HSA nativa, respectivamente. La constante de unión de col-ARNip era similar tanto para Optison como para HSA nativa.

Ejemplo 2. Suministro de ARNip a células tumorales

Cultivo celular:

Se cultivaron células de carcinoma mamario de rata MATBIII y de glioblastoma humano U-87 en medio 5A de McCoy (modificado) (1X) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (ATCC, Manassas, VA) respectivamente. Se suplementaron ambas disoluciones de medio con suero bovino fetal termodesactivado (FBS) al 10 % (Fisher Scientific, Springfield, NJ) y penicilina-estreptomina al 1 % (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Se mantuvieron las células a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂.

Sonicación de células enlazadas con sustrato:

Se hicieron crecer células MATB-III y U-87 en unidades Opticel de 10 ml de capacidad (Nalge Nunc International, Rochester, NY) hasta 90 % de confluencia. Se reemplazó el medio en Opticell por 10 ml de medio reciente que contenía 40 pmol de cy3-ARNip o colesterol-ARNip. Se dejó la Opticell en la incubadora durante 24 horas a 37 °C. Separadamente, se trataron las células con disolución de ARNip mezclada con microburbujas de Optison (300 μl) o un reactivo de transfección lipídica (90 μl) (RNAitect, Qiagen, Valencia, CA). Para las mezclas de ARNip/Optison, se usaron generadores de imágenes Vivid i con una sonda de sector cardíaco (3S) para romper las microburbujas y suministrar el fármaco de ARNip de las microburbujas. Se inmovilizó la Opticell en un baño de agua y se enlazó la sonda de ultrasonidos con un brazo móvil que cubría toda la longitud de la Opticell. Se sumergió la punta de la sonda en agua y la distancia entre la sonda y la superficie de la Opticell era de 3 cm, lo que permitía la sonicación de toda la anchura de la Opticell. Se trataron las microburbujas en la Opticell con un índice mecánico IM >1,3 de sonicación continua. La sonda se movía a una velocidad de 1 m/s por toda la longitud de la Opticell. Después de la sonicación, se incubaron las células durante 24 horas a 37 °C. De forma similar, se mantuvieron también las células tratadas con RNAitect en la incubadora durante 24 horas. Después de la incubación, se generaron imágenes de las células usando un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Imager.Z1, Carl Zeiss). El filtro usado para cy3 era DsRed/Cy3 (546 ex/620 em). En la región de interés (ROI) de las imágenes fluorescentes, se midió la fluorescencia celular y se calcularon los valores medios de fluorescencia celular. Se usó ImageJ para procesar las imágenes y calcular las intensidades de fluorescencia.

Los datos se reseñan como media + 1,0 error estándar (EE) para N= 4. Se evaluó la significación estadística de las

diferencias entre los grupos usando la prueba de t de dos muestras y se llevaron a cabo los análisis estadísticos usando Minitab® 12 (Minitab Inc, State College, PA, EE.UU.).

Resultados:

Se ilustra el efecto del sistema de suministro en la FIG. 6 para células U-87 incubadas con cy3-ARNip o col-ARNip. El suministro de ARNip en las células tumorales se representa por la fluorescencia celular media de cy3. Para cada grupo, se reseñan los valores de fluorescencia media y errores estándares. La sonicación celular potenciaba sustancialmente la penetración de cy3-ARNip en la célula. Debido a los efectos de la sonoporación, la fluorescencia celular media para células tratadas con Optison/ultrasonidos era un 39 % mayor que para células no tratadas. Para colesterol-ARNip, había un aumento del 53 % de la fluorescencia celular media después del tratamiento con Optison/ultrasonidos. Se evaluaron las diferencias significativas entre los grupos usando pruebas de t de dos muestras ($p = 0,032$ para cy3-ARNip y $p = 0,059$ para colesterol-ARNip).

De forma similar para células MATBIII, se comparó el efecto del tratamiento con Optison/ultrasonidos con un reactivo de transfección lipídica comercialmente disponible. Se trataron las células con Cy3-ARNip o col-ARNip en combinación con RNAiVect o suministro por Optison/ultrasonidos y se muestran los resultados en las FIG. 7 y 8. La FIG. 7 muestra imágenes representativas de las células después del tratamiento. La FIG. 8 reseña la fluorescencia celular media para todos los grupos con los errores estándares representados como barras de error. Para cy3-ARNip, la fluorescencia celular media era mayor para el tratamiento con Optison/ultrasonidos (prueba de t de dos muestras, $p = 0,007$). Eso es debido principalmente a la sonoporación de las células en presencia de microburbujas. No había una diferencia significativa entre RNAiVect y suministro por Optison/ultrasonidos de col-ARNip en células. Aunque la fluorescencia celular media era similar, se encontró que el reactivo de transfección lipídico era tóxico para las células tumorales, como se evidencia por la forma irregular de las células en la FIG. 7. Debería señalarse que se usó la misma cantidad de reactivo de transfección y ARNip en ambos de ARNip no modificado y colesterol-ARNip. Aunque el reactivo de transfección era tóxico en ambos casos, era mayor para col-ARNip.

Ejemplo 3. Se evaluaron estudios de unión preliminares de conjugados de producto terapéutico-ácido graso con microburbujas usando conjugados de fluoresceína-ácido graso.

Método de conjugación:

Se tomó el éster de NHS de ácido graso (2 equivalentes, 5,37 mg de éster de NHS de ácido mirístico o 6,38 mg de éster de NHS de ácido esteárico en una mezcla 50:50 de diclorometano (100 μ l) y se mezcló con una disolución de fluoresceína-cadaverina (FL-cadaverina, 5 mg, 1 equivalente en 50 μ l de DMSO). Se añadió a esto diisopropiletilamina (3,8 equivalentes) y se agitó con vórtice la mezcla, dando una solución transparente. Se guardaron las muestras en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de 4,5 horas, se comprobó la reacción por HPLC y se encontró que era completa. Se observó un gran desplazamiento del tiempo de retención para ambos conjugados (tiempos de retención: FL-cadaverina 4,7 min, FL-estearato de cadaverina 12,1 minutos y FL-miristato de cadaverina 9,9 min, columna X-Bridge Shield RP 18, columna de 4,6 x 50 mm, tamaño de partícula 5 μ m, método de gradiente: 0-100 % de B en 15 min y 100 % de B durante 5 min, disolvente A TEAA 0,1 M, pH 7,0 y disolvente B acetonitrilo al 100 %, caudal 1 ml/min) como se esperaba. Se diluyó el producto bruto con DMSO a ~2 ml y se purificó en un purificador AKTA usando una columna Xterra MS C18, 19 x 100 mm y un gradiente de 0-100 % de B en 18,75 volúmenes de columna a un caudal de 10 ml/min. El disolvente A y B eran como se describen anteriormente para el método analítico. Se recogió el producto en múltiples fracciones y se analizó cada fracción por HPLC analítica. Se usó solo la fracción más pura en cada caso (~90 % de pureza) para los estudios de unión (el material de partida mismo era ~86 % puro, permaneciendo probablemente un regioisómero con las mismas propiedades espectrales). Se concentró esta fracción hasta sequedad a temperatura ambiente. Se suspendió el residuo en agua (~2 ml) y se extrajo con diclorometano (3x2 ml). Se combinaron los extractos orgánicos, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron hasta sequedad.

Ensayo de polarización de fluorescencia

Se preparó la solución madre de miristato de fluoresceína en 1x PBS. Se mantuvo baja la concentración de fluoresceína para el ensayo de polarización de fluorescencia, a 126 nM. Se añadieron concentraciones variables de Optison o disoluciones de HSA, en el intervalo de concentraciones de albúmina de 0 a 15 μ M, a la disolución de miristato de fluoresceína. El tampón de reacción era 1x PBS a pH 7,4. Se incubó la mezcla de reacción en la oscuridad a 25 °C durante 15 minutos. Después de la incubación, se midieron los cambios en los valores de anisotropía brutos de la fluoresceína usando un lector de microplacas (SpectraMax 5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Se midieron las muestras en placas de 96 pocillos de Corning (placa negra con fondo transparente) (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Se excitó la fluoresceína a 470 nm y se midió la emisión a 540 nm. Se calculó la fracción unida (x) usando la misma ecuación que antes (Ecuación 2), pero reemplazando los valores de fluorescencia por los valores de anisotropía. Se representó entonces la fracción unida calculada frente a la concentración de albúmina como se muestra en la FIG. 9. Se reseñan los datos como media + 1,0 errores estándares (EE) para N=3. Se usó la ecuación 3 para determinar k_d y n para la unión de miristato de fluoresceína tanto a Optison como a HSA nativa (Tabla 2).

Esto se representa también en la FIG. 10, que muestra la fluoresceína unida a Optison (0, 8,40 y 200 pmol para i, ii, iii y iv respectivamente) visualizada en el gel como bandas oscuras para miristato de fluoresceína (FIG 10A) (63 pmol) y estearato de fluoresceína (FIG. 10B) (180 pmol).

- 5 Cuando se probaron las propiedades de unión a albúmina de fluoresceína sin la conjugación con miristato, no se observaron cambios significativos en la anisotropía. Es bien conocido que los ácidos grasos tienen propiedades de unión más fuertes que el colesterol, y se confirma aquí también con las menores constantes de disociación, k_d , observadas para el conjugado de miristato de fluoresceína (Tabla 1 y Tabla 2).

Tabla 1: Número de sitios de unión y constantes de disociación para la unión de colesterol-ARNip a Optison y HSA nativa

	Optison	HSA nativa
Número de sitios de unión, n	1,16	1,13
Constante de disociación, k_d (μM)	7,16	6,4

- 10 Tabla 2: Número de sitios de unión y constantes de disociación para la unión de miristato de fluoresceína a Optison y HSA nativa

	Optison	HSA nativa
Número de sitios de unión, n	1,03	1,02
Constante de disociación, k_d (μM)	0,238	0,378

- 15 Por lo tanto, conjugar un ácido graso tal como miristato con un compuesto terapéutico puede aumentar la unión de dicho compuesto terapéutico con las microburbujas de cubierta de albúmina. La constante de disociación de la unión de miristato de fluoresceína a Optison era menor que la de la unión a HSA nativa. Esto sugiere mejores propiedades de unión hidrófoba de la cubierta de microburbuja de las que tiene la albúmina tanto nativa como parcialmente desnaturalizada.

Ejemplo 4

Estabilidad de ARNip *in vivo*:

- 20 La estabilidad de los compuestos terapéuticos tales como ARNip es muy baja una vez se inyectan en el cuerpo. Se estudió una comparación entre la inyección subcutánea y en la vena de la cola de una mezcla de microburbujas de albúmina y ARNip nativo (sin conjugados).

- 25 Se obtuvieron ratones nu/nu de once a catorce semanas de edad (peso corporal ~ 30 g) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Se albergaron los animales de acuerdo con la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" adoptada por los Institutos Nacionales de la Salud. Se inocularon por vía subcutánea células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) en el flanco derecho de ratones anestesiados ($3,5 \times 10^6$ células/100 μl /ratón).

- 30 El cuarto día después de la inoculación, se trataron los ratones con mezclas de microburbujas de ARNip anti-VEGF (Sigma Life Sciences, St. Louis, MO), una dosis de ARNip de 1,0 mg/kg para inyecciones subcutáneas y una dosis de 2,0 mg/kg para inyecciones en la vena de la cola. La mezcla de inyección contenía 100 μl de disolución de microburbujas y 100 μl de ARNip en agua exenta de ARNasa. Después de la inyección, se sonicaron los tumores usando generadores de imágenes Vivid i con una sonda de sector cardíaco (3S). Se suministraron las energías de forma pulsátil con el IM de pico a 1,3. El grupo de control no recibió tratamientos.

- 35 Después de 24 horas del día de tratamiento, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tumores. Se congelaron los tumores inmediatamente y se almacenaron a -20 °C. Se descongelaron los tumores a temperatura ambiente el día de la medida de VEGF. Se lisaron entonces los tumores en tampón RIPA (con inhibidores de proteasa añadidos) usando un tubo de matriz de lisis (tubo de matriz de lisis A, RP Biomedical). Se diluyó entonces el lisado recogido de las muestras y se midió la proteína total usando un kit de proteína (kit de ensayo de proteína con reactivo BCA de Pierce) y el VEGF usando un kit ELISA (kit ELISA de VEGF de ratón, RayBiotech, Norcross, GA).

- 40 Se reseñan los resultados en la Tabla 3 como media de pg de VEGF/mg de proteína para los grupos de control y los diferentes tratamientos. La inyección subcutánea de mezcla de microburbujas con ARNip 1,0 mg/kg daba como resultado una disminución de aproximadamente un 39 % del VEGF cuando se compara con el grupo de control (prueba de t de dos muestras, $p = 0,0096$). Aunque había solo una diferencia menor entre el grupo de control y la inyección en la vena de la cola de 2,0 mg/kg de mezclas de microburbujas de ARNip, esto puede ser debido a la falta o unión menos eficaz del ARNip no modificado a la microburbuja.

Tabla 3: Efecto del suministro de ARNip a tumores; media de pg de VEGF/mg de proteína total.

Condiciones	Media de pg de VEGF/mg de proteína	Error estándar	IC del 95 %	N
Control	296,19	24,89	48,79	5
Optison/ARNip SQ 1 mg/kg	181,97	24,38	47,78	7
Optison/ARNip TV 2 mg/kg	255,10	51,06	100,07	3

La invención puede representarse en otras formas específicas sin apartarse de las características esenciales de la misma. Las realizaciones anteriores han de considerarse por lo tanto en todos los aspectos como ilustrativas en lugar de limitantes de la invención descrita en la presente memoria. El alcance de la invención está por tanto indicado por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por la descripción anterior.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MOHAN, PRAVEENA LIM, HAE WON LOWERY, LISA BURCZAK, JOHN DONALD ROTHMAN, JAMES EDWARD SOOD, ANUP

5 <120> Complejos de microburbujas y métodos de uso
 <130> 250944-1
 <140> 13/235,890
 10 <141> 19-09-2011
 <160> 2
 <170> PatentIn versión 3.5
 15 <210> 1
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 1
 25 gcuuuuuuu guccaagauu u 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 35 <400> 2
 aaauuugga caaacaauug c 21

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de microburbujas que comprende:
una microburbuja que tiene una cubierta externa que comprende una mezcla de albúmina nativa y desnaturalizada y un núcleo hueco que encapsula un gas perfluorocarburo;
- 5 un agente terapéutico seleccionado de un grupo que comprende un agente quimioterapéutico de molécula pequeña, péptido, carbohidrato, oligonucleótido, citotoxina, inhibidor de la síntesis de proteína o combinación de los mismos;
un ligador bifuncional que tiene un extremo enlazado con el agente terapéutico y el otro enlazado con un ligando mediante reacción de un grupo reactivo en dicho ligando; y
- 10 en el que el ligando está unido a la cubierta externa de la microburbuja mediante interacciones hidrófobas.
2. El complejo de la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico es un oligonucleótido.
3. El complejo de la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido es un ADN o ARN de origen natural o modificado.
4. El complejo de la reivindicación 3, en el que el ARN es un ARN interferente pequeño.
- 15 5. El complejo de la reivindicación 1, en el que el ligador bifuncional comprende un oligo- o poliaminoácido, péptido, sacárido, nucleótido, resto orgánico que tiene aproximadamente 1 a 250 átomos de carbono o una combinación de los mismos.
6. El complejo de la reivindicación 1, en el que el ligador bifuncional comprende tetraetilenglicol (TEG) o polietilenglicol.
- 20 7. El complejo de la reivindicación 1, en el que el grupo reactivo comprende un éster activado, fosforamidita, isocianato, isotiocianato, aldehído, cloruro de ácido, cloruro de sulfonilo, maleimida, haluro de alquilo, amina, fosfina, fosfato, alcohol o tiol.
8. El complejo de la reivindicación 1, en el que el ligando es un ácido graso, esteroide o una combinación de los mismos.
- 25 9. El complejo de la reivindicación 1, en el que el ligando es ácido 4-yodofenilbutírico o un análogo o derivado del mismo.
10. El complejo de la reivindicación 1, en el que la cantidad de albúmina desnaturalizada a nativa está en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 30 % en peso.
11. El complejo de la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico comprende ARNip, el ligando comprende tetraetilenglicol y el ligando comprende colesterol.
- 30 12. El complejo de microburbujas como se define en la reivindicación 1 para uso en un método de suministro de un agente terapéutico a una diana de tejido, comprendiendo dicho método las etapas de:
proporcionar dicho complejo de microburbujas;
administrar el complejo de microburbujas a un sujeto, en el que el sujeto es la fuente de la diana de tejido y
- 35 administrar energía ultrasónica al sujeto, en el que dicha energía es suficiente para causar la cavitación del complejo de microburbujas en la diana de tejido.
13. El complejo de microburbujas para uso de la reivindicación 12, en el que la diana de tejido está *in vivo* y administrar el complejo de microburbujas comprende la inyección intravenosa o intraperitoneal del complejo de microburbujas.
- 40 14. El complejo de microburbujas para uso de la reivindicación 12, que comprende además la etapa de visualizar el complejo de microburbujas en la diana de tejido antes de administrar la energía ultrasónica para cavitación del complejo de microburbujas.
15. El complejo de microburbujas para uso de la reivindicación 14, en el que la visualización y administración de la energía ultrasónica se efectúan instantáneamente.
- 45 16. El complejo de microburbujas para uso de la reivindicación 12, en el que la diana de tejido está *in vitro*.

17. El complejo de microburbujas para uso de la reivindicación 12, en el que el agente terapéutico comprende ARNip, el ligador comprende tetraetilenglicol y el ligando comprende colesterol.

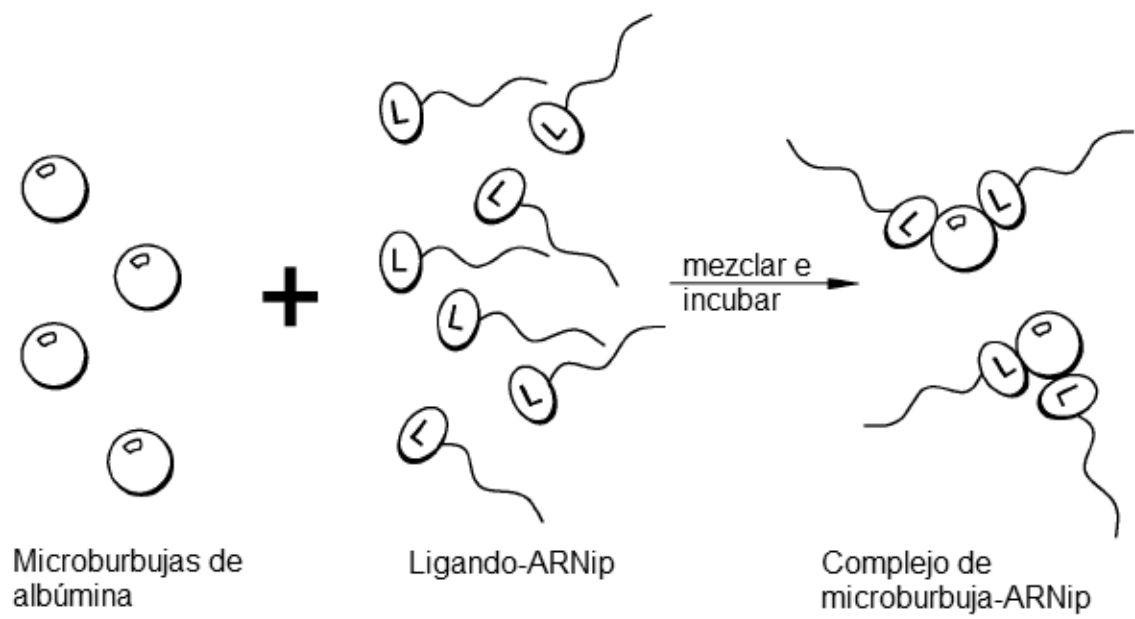


Fig. 1

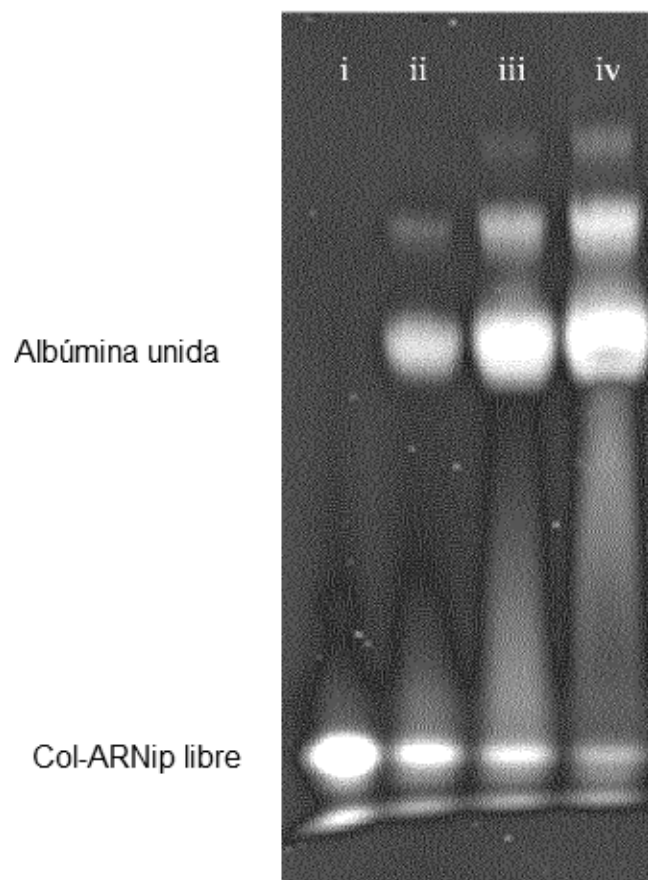


Fig. 2

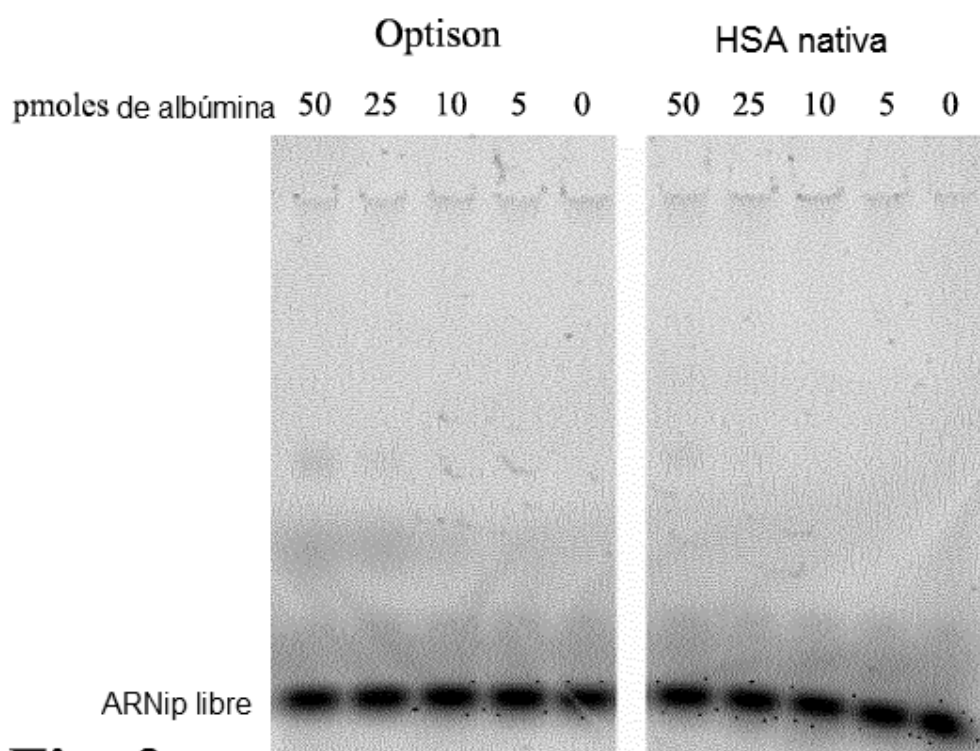


Fig. 3

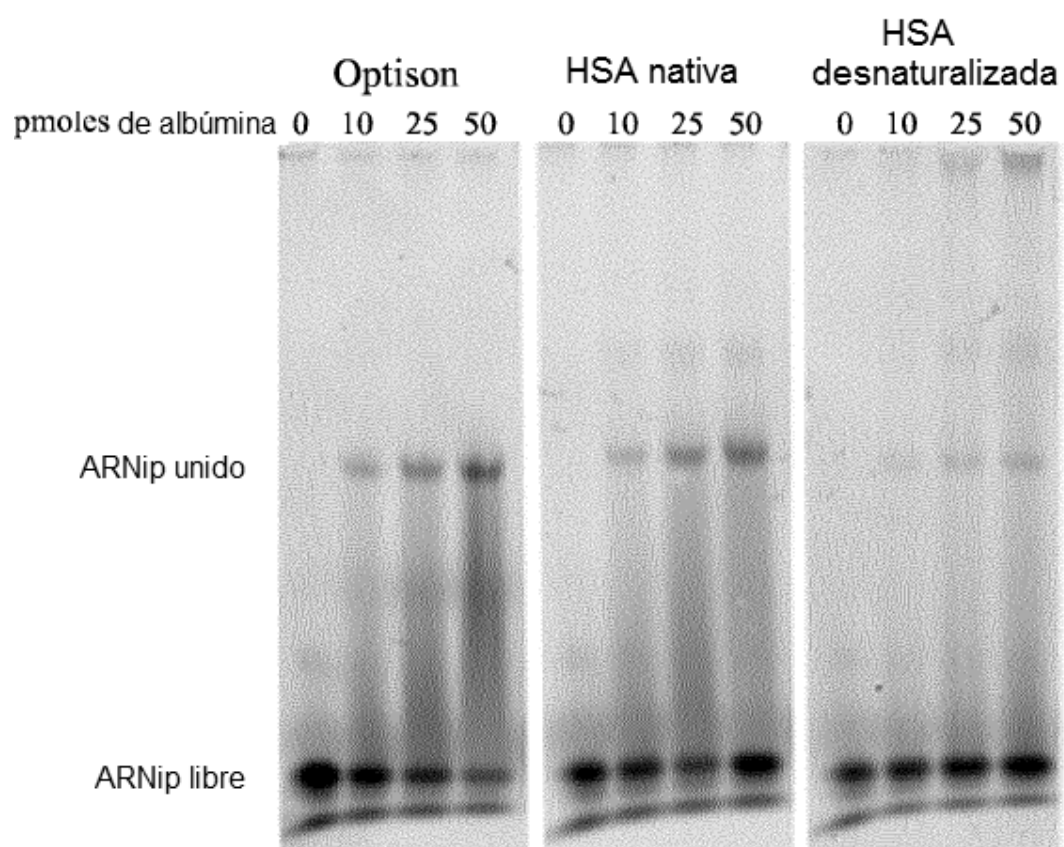


Fig. 4

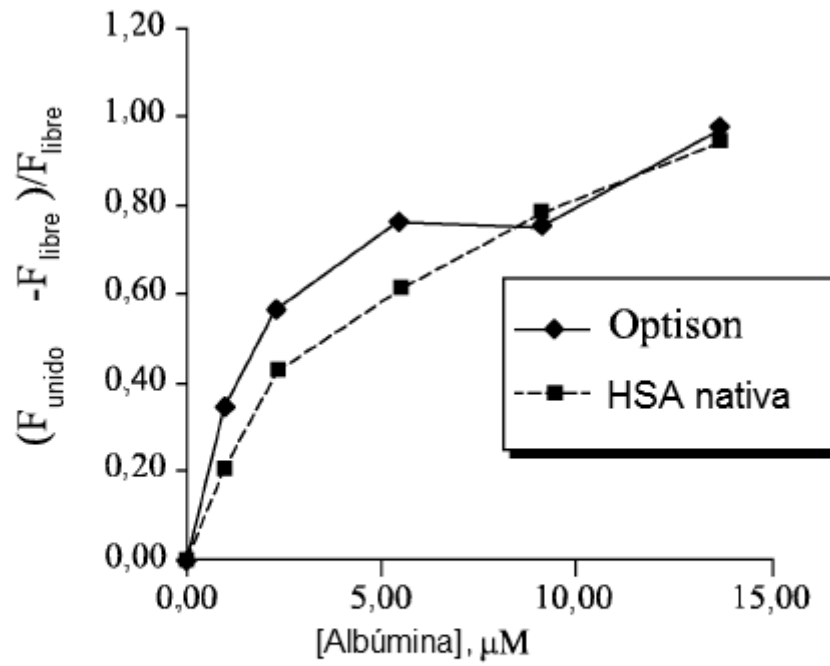


Fig. 5A

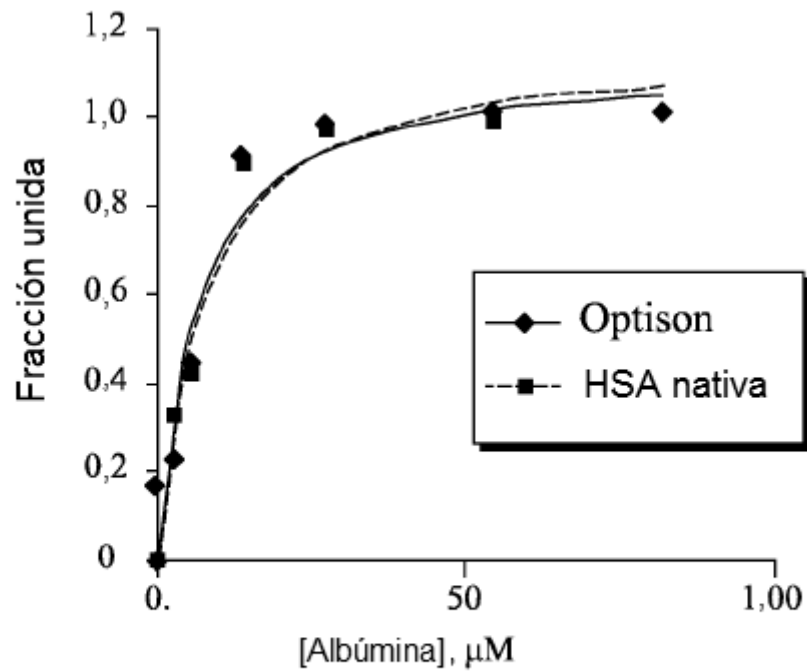


Fig. 5B

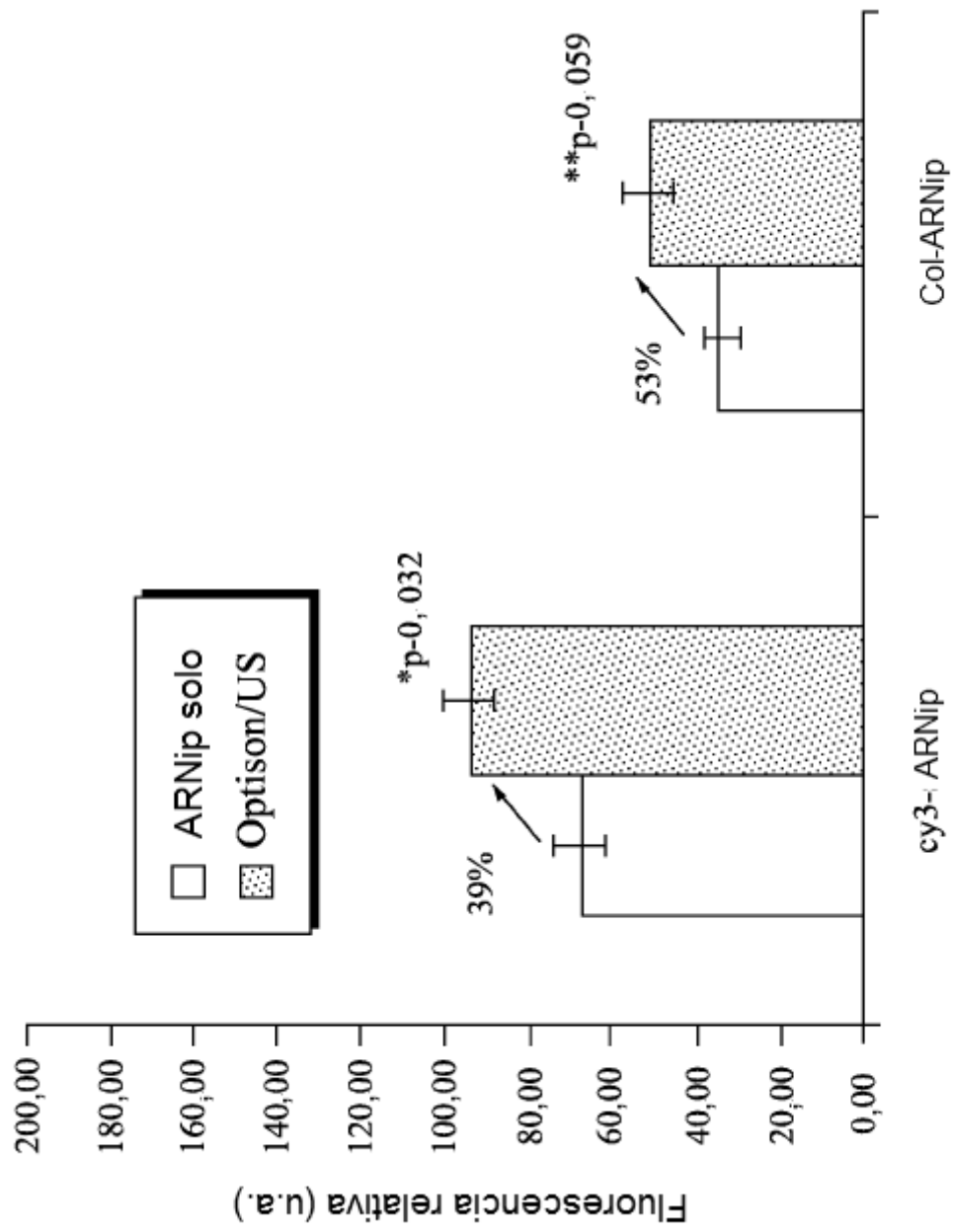


Fig. 6

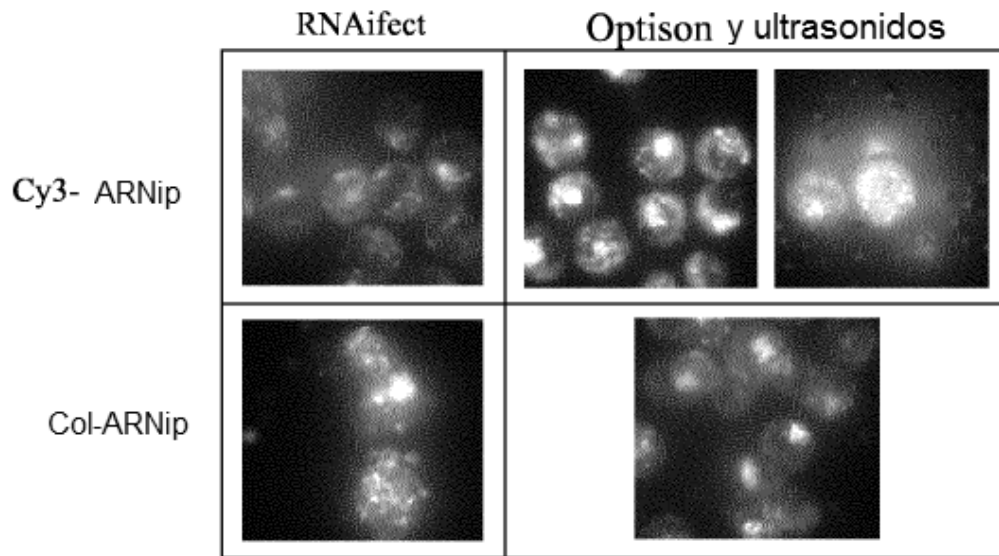


Fig. 7

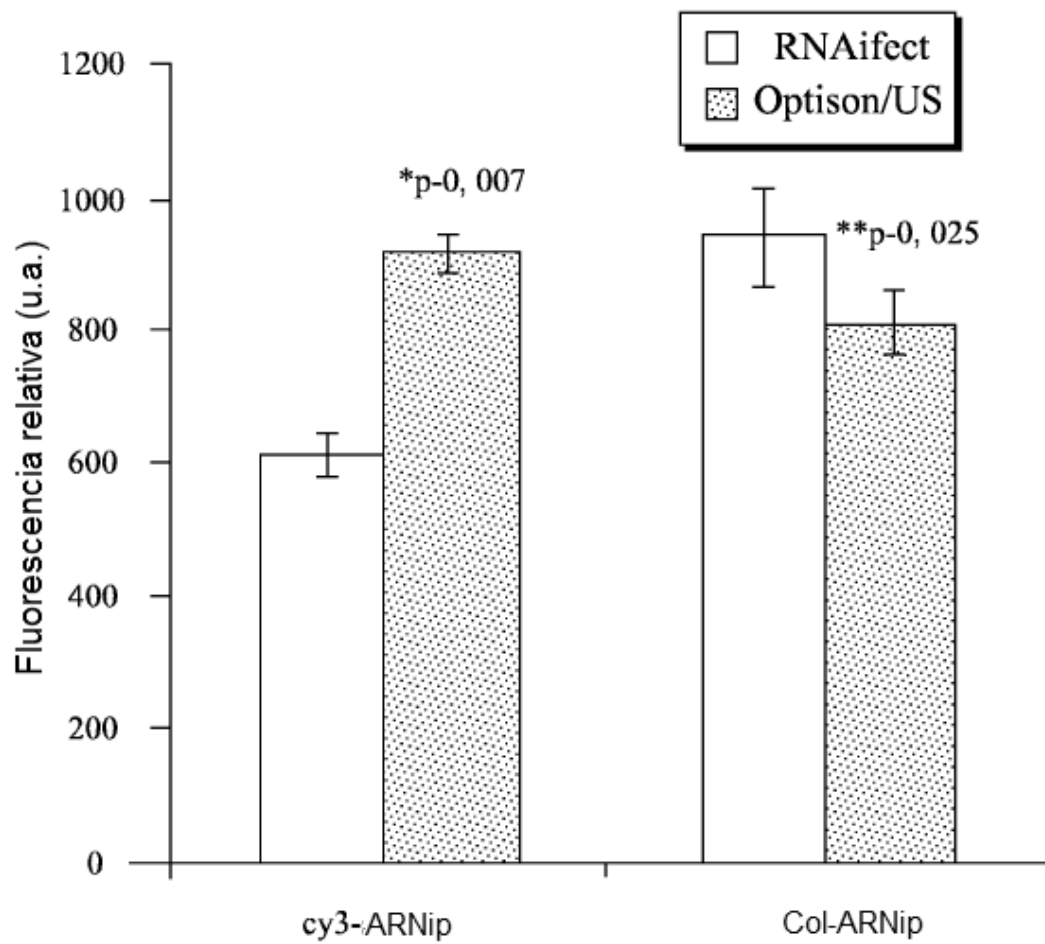
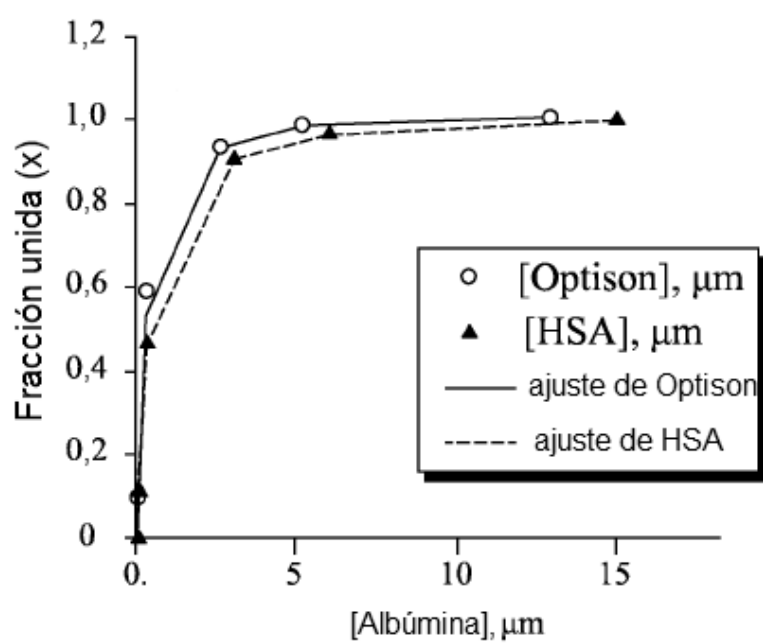
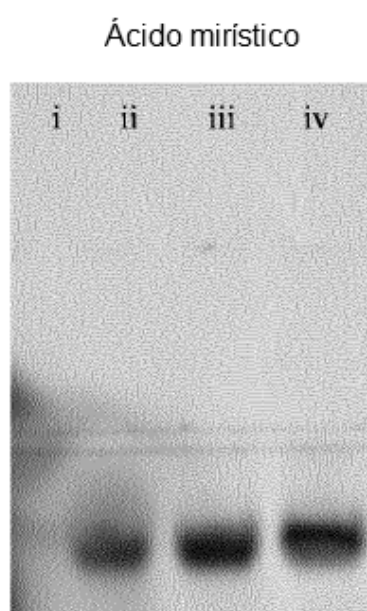
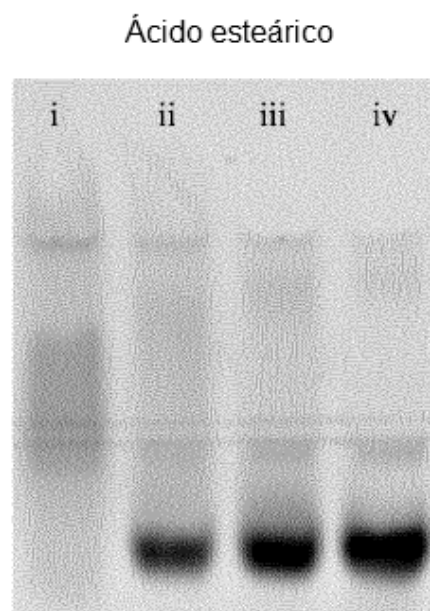


Fig. 8

**Fig. 9****Fig. 10A****Fig. 10B**