(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 672 211**

(51) Int. CI.:

A61K 49/18 (2006.01)
B82Y 15/00 (2011.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/EP2014/051348**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114724**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14701522 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2948185**

(54) Título: **Magnetoemulsión vectorizada**

(30) Prioridad:

23.01.2013 FR 1350584

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2018

(73) Titular/es:

GUERBET (100.0%)
15 Rue des Vanesses
93420 Villepinte, FR

(72) Inventor/es:

ROBIC, CAROLINE y
PORT, MARC

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Magnetoemulsión vectorizada

La invención concierne a nuevos sistemas optimizados de tipo nanoemulsiones, denominados en ocasiones magnetoemulsiones, y a su utilización como agentes de contraste, particularmente en RMN.

La administración de productos de contraste contribuye a mejorar la resolución de las imágenes de RMN obtenidas mediante esta técnica, y la precisión del diagnóstico. Así, el efecto del contraste puede ser acentuado por la presencia, en el entorno de los órganos sometidos a examen, de diversas especies magnéticas, por ejemplo, paramagnéticas, ferromagnéticas o superparamagnéticas.

En el ámbito de la obtención de imágenes diagnósticas, un gran número de investigaciones se han relacionado con la elaboración de nuevos productos de contraste que se dirijan a una región de interés para permitir ayudar en el diagnóstico de diferentes patologías, particularmente del cáncer, y para permitir también un seguimiento de la eficacia del tratamiento de estas patologías. Para ello, el objetivo de los diferentes equipos de investigación, que han trabajado con estas problemáticas, era la obtención de imágenes de una gran calidad. Esto no es realizable más que con la utilización de un agente de contraste vectorizado, con una elevada sensibilidad.

Actualmente, son sobre todo los productos de contraste en el campo de la medicina nuclear (por ejemplo, los trazadores de la TEP (tomografía de emisión de positrones o PET en inglés) los que han sido, o que son, estudiados por estas problemáticas de seguimiento del tratamiento, debido a la excelente sensibilidad de estos trazadores.

Estos métodos de obtención de imágenes tienen el inconveniente de que el paciente es, por lo tanto, expuesto a radiaciones, y que requieren una logística restrictiva para la protección del paciente y la fabricación del radiotrazador (por la intermediación, por ejemplo, de un ciclotrón).

Las sustancias paramagnéticas comprenden algunos metales tales como el hierro, el manganeso, el gadolinio en estado iónico u organometálico. Las sustancias de contraste ferromagnéticas comprenden generalmente partículas de agregación magnética de un tamaño micrométrico o submicrométrico, es decir, no inferior a 100-200 nm, por ejemplo, partículas de ferritas, entre las cuales particularmente la magnetita (Fe_3O_4), la maghemita (γ-Fe_2O_3) y otros compuestos minerales magnéticos de elementos de transición que se comportan como imanes permanentes. Las partículas superparamagnéticas son habitualmente partículas de ferrita muy pequeñas, entre las cuales particularmente la magnetita (Fe_3O_4), la maghemita (γ-Fe_2O_3) y otros compuestos minerales magnéticos de elementos de transición, con un tamaño inferior a aproximadamente 100-150 nm. Contrariamente a las partículas ferromagnéticas, las partículas superparamagnéticas ya no se comportan como pequeños imanes autónomos debido al hecho de que su tamaño es inferior a un valor crítico, es decir, se alinean en una dirección preferente únicamente cuando son sometidas a un campo magnético externo. Las partículas superparamagnéticas presentan ventajosamente una densidad de eficacia más elevada con respecto a las partículas ferromagnéticas. Las soluciones coloidales de nanopartículas ferromagnéticas o ferromagnéticas en un disolvente o en agua se denominan “ferrofluidos”.

No obstante, la ausencia de sensibilidad en la técnica de obtención de imágenes por RMN supone siempre un problema. Las imágenes obtenidas con ciertos productos de contraste, como estas partículas superparamagnéticas, pueden por lo tanto no ser suficientes para permitir un diagnóstico rápido y preciso, o para juzgar la eficacia de un tratamiento de una patología. Para mejorar esta sensibilidad, teóricamente es necesario proporcionar unos productos de contraste más concentrados, pero esto puede dar lugar a unos productos menos tolerables por el paciente.

Los nanosistemas a los cuales pertenecen las nanoemulsiones permiten acumular agentes de contraste en este tipo de estructura. En función del tipo de nanosistema utilizado, esta acumulación puede ser más o menos importante, lo que influye directamente en la calidad de las imágenes obtenidas.

Si estos productos de contraste son unos productos que se dirigen a unos receptores en particular, también pueden aparecer problemas complementarios de afinidad de estos productos de contraste frente a estos receptores y/o de accesibilidad a estos receptores y/o de densidad de estos receptores.

Desde hace algunos años se proponen emulsiones de nanopartículas con una base de hierro, de tipo USPIO (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide), nanoemulsiones también denominadas en ocasiones “magnetoemulsiones”, que comprenden, en algunos casos, biovectores que les permiten permiten dirigirse a unos receptores en particular. Estas nanoemulsiones todavía no permiten resolver de una forma satisfactoria el problema de la ausencia de sensibilidad de la técnica de RMN, ya que su capacidad de carga de hierro es limitada y porque su afinidad con respecto a estos receptores objetivo es baja.

El documento WO 2005/014051 describe unas emulsiones que comprenden nanogotitas, utilizables como agente de contraste o para la liberación de agentes terapéuticos. Estas nanogotitas, formadas por un aceite acoplado a átomos

que tienen un número Z importante y en particular superior a 36 (como el itrio, el circonio, la plata o el oro), están recubiertas por una capa lipídica y están acopladas a un biovector. El documento US 2010/0297019 describe unas gotitas que comprenden un núcleo metálico en una sustancia oleosa y una capa exterior formada por un compuesto anfifílico. La sensibilidad de este producto de contraste no es suficiente en el caso en el que la patología objetivo dé lugar a una baja expresión de los receptores.

En Mandai et al. (*Langmuir*, vol. 21, nº 9, 2005) se describen unas emulsiones de nanopartículas de hierro formadas, entre otras, por maghemita (α-Fe_2O_3) y por ácido oleico. También aquí, las fases oleosas descritas (el octano en este caso) en este documento no permiten la obtención de una nanoemulsión satisfactoria.

En Jarzyna et al. (Biomaterials, 30, 6947-6954, 2009) se describen emulsiones de nanopartículas de hierro formadas particularmente por magnetita (Fe_3O_4) recubiertas de ácido oleico, estando la fase oleosa de estas emulsiones formada principalmente a partir de aceite de soja (en este caso, un aceite poliinsaturado). Estas nanoemulsiones están acopladas a un fluoróforo Cy5.5, un agente fluorescente perteneciente a las cianinas. Este tipo de compuesto no permite la vectorización de un nanosistema. Esto permite precisamente poder constatar que lo que se ve en las imágenes es visible bajo fluorescencia. Las nanoemulsiones descritas tienen una capacidad reducida de carga de hierro (no más de 15 mmoles de hierro por litro de emulsión) y no permiten, por lo tanto, la obtención de imágenes mediante una RMN con una calidad suficiente.

En Senpan et al. (JACS, vol. 3, nº 12, 3917-3926, 2009) se describen emulsiones de nanopartículas de hierro formadas particularmente por magnetita (Fe_3O_4) recubiertas de ácido oleico, estando la fase oleosa de estas emulsiones formada principalmente a partir de aceite de almendra (igualmente un aceite poliinsaturado). El aceite de almendra no está asimismo adaptado para su utilización en una inyección intravenosa y, a priori, no es utilizable más que en una administración tópica o parenteral. Estas nanoemulsiones son vectorizadas con la ayuda de derivados de la biotina. Además del hecho de que el enlace de este tipo de compuesto es complicado de conseguir desde un punto de vista industrial, las nanoemulsiones descritas en este documento también tienen una capacidad reducida de carga de hierro (no más de 80 mmoles de hierro por litro de emulsión) y no permiten, por lo tanto, la obtención de una sensibilidad óptima en la RMN.

Una dosis importante de estas emulsiones permitiría, en teoría, la obtención de una imagen de una calidad óptima, pero esto desembocaría sin ninguna duda en una saturación del receptor objetivo si este tipo de emulsión estuviera vectorizada. También, la sensibilidad de estos productos de contraste no es, por lo tanto, suficiente, y particularmente en el caso en el que la patología objetivo dé lugar a una baja expresión de los receptores.

Queriendo desarrollar unas nanoemulsiones vectorizadas que permitan la obtención de imágenes mediante RMN de una calidad óptima, se han identificado varias problemáticas:

- si se quieren obtener unas imágenes de una gran calidad, es necesario que las emulsiones puedan acumular en su seno más de 100, incluso más de 120 o más de 140 mmoles de hierro por litro de emulsión, y es necesario que estas emulsiones que comprenden las nanopartículas a base de hierro tengan una buena afinidad y una buena selectividad con respecto al receptor al que se dirigen,
- es necesario que las nanopartículas de hierro tengan una solubilidad óptima en la fase oleosa de forma la emulsión,
- es necesario que los aceites utilizados para la elaboración de estas emulsiones estén en la farmacopea, es decir, que su utilización esté autorizada reglamentariamente para una utilización en estos pacientes,
- es necesario que estas emulsiones sean estables en el tiempo, es decir, que no se agreguen de forma irreversible o que no se produzca una destrucción de la emulsión, por ejemplo, por coalescencia o agregación irreversible de las nanogotitas que la constituyen.

Además, una cantidad de tensioactivo de al menos aproximadamente el 5 % de la composición en peso, se traduce en:

- la formación en la composición, además de las nanogotitas, de micelas (desprovistas de un núcleo oleoso) cuya retirada necesitaría, para una producción a escala industrial, cientos de toneladas de producto de contraste, unas etapas de separación y de purificación complejas y costosas, y por lo tanto, una caída del rendimiento industrial,
- la dificultad, incluso la imposibilidad, de incorporar en las nanogotitas una cantidad apropiada de ligandos de direccionamiento biológico cuyo coste es muy elevado: los tensioactivos lípidos anfifílicos tienen un poder tensioactivo más fuerte que los ligandos de direccionamiento anfifílicos, y preferiblemente formarán una capa alrededor del aceite (y/o la capa de lípidos anfifílicos se forma a partir de estos lípidos antes incluso de que los ligandos de direccionamiento hayan tenido tiempo de integrarse en el seno de esta capa).

De una forma incluso más precisa:

- cuando se alcanza la cantidad máxima de tensioactivos (tensioactivo de tipo Lipoïd® o análogo, ligando de direccionamiento anfifílico, lípido pegilado, dado el caso) alrededor de las nanogotitas, los compuestos anfifílicos

de la solución forman rápidamente micelas, y la solución contiene por lo tanto muchas más micelas que nanogotitas,
- el precio de coste industrial de las nanoemulsiones está representado aproximadamente al menos entre un 80 y un 90 % por el ligando de direccionamiento que se ha hecho anfifílico, por lo tanto, se comprende que una pérdida de ligandos de direccionamiento genere unos sobrecostes industriales demasiado importantes,
- si la cantidad de lípidos anfifílicos tensioactivos (compuestos no vectorizados) es muy importante, los ligandos de direccionamiento anfifílicos no pueden integrarse de una forma satisfactoria en la capa anfifílica alrededor del aceite, lo que genera una pérdida de afinidad muy importante y hace que el producto sea inapropiado para un direccionamiento específico al territorio patológico.

Las nanoemulsiones según la invención son biovectorizadas (por la presencia de un ligando de direccionamiento) ya que están destinadas a la obtención de imágenes moleculares diagnósticas. En la técnica anterior se describen varias formas de vectorizar las emulsiones. Los dos principales modos de vectorización son el injerto de ligandos de direccionamiento sobre uno o varios compuestos de la emulsión después de la síntesis de la emulsión, o el injerto de ligandos de direccionamiento sobre uno o varios compuestos de la emulsión, y después la síntesis de la emulsión que comprende este compuesto y los demás constituyentes (se hablará entonces de la incorporación del ligando de direccionamiento).

En el caso en el que se elige el injerto de ligandos de direccionamiento sobre los compuestos de la emulsión después de la síntesis de la emulsión, se forman impurezas durante el injerto. Esto supone un problema importante ya que estas impurezas están en la emulsión, son difícil, incluso imposible, de eliminar.

En el caso en el que se elige la incorporación de los ligandos de direccionamiento, las nanogotitas de la nanoemulsión presentan, incorporadas en la capa formada por los tensioactivos, uno o varios ligandos de direccionamiento específicos que van a reconocer específicamente, mediante una interacción molecular (afinidad objetivo/ligando), el objetivo biológico (receptor, enzima ...) cuya expresión esta modificada en la zona patológica. Estos ligandos de direccionamiento son denominados igualmente “biovectores” o “ligandos de reconocimiento” por el experto en la materia.

Ahora bien, un problema técnico muy difícil de resolver es precisamente la incorporación de forma apropiada y estable en el tiempo de uno o varios ligandos de direccionamiento para la obtención de imágenes moleculares, en una cantidad suficiente para obtener una especificidad de marcaje, pero no demasiado elevada para evitar un precio de coste industrial demasiado elevado.

En vista de esta compleja técnica anterior, se observa la dificultad de obtener unas nanoemulsiones vectorizadas para la RMN, a la vez químicamente industrializables y estables, biológicamente eficaces y que permitan la obtención de unas imágenes mediante una RMN de una gran calidad.

Se han obtenido unas nanoemulsiones que comprenden partículas superparamagnéticas, encapsuladas en nanogotitas vectorizadas y que resuelven todos los problemas técnicos de la técnica anterior.

En el siguiente texto, los términos “nanogotita”, “gotita de nanoemulsión” o “nanoobjeto” serán equivalentes.

En particular, se han seleccionado unas composiciones optimizadas con unas capacidades mejoradas de carga de hierro que comprenden suficiente tensioactivo para estabilizar el tamaño de las nanogotitas, pero no demasiado para evitar la incorporación insuficiente de los ligandos de direccionamiento.

En las nanoemulsiones según la invención, el ligando de direccionamiento debe poder alojarse en el seno de la interfase de aceite/agua, anclándose a la membrana/película anfifílica de los tensioactivos. No era en absoluto evidente para el experto en la materia encontrar buenos compuestos y unas buenas proporciones entre las cantidades de tensioactivos, del aceite y de los ligandos de direccionamiento, que permitieran la obtención de unas nanoemulsiones con una eficacia mejorada para la obtención de imágenes moleculares y sin una pérdida de ligandos de direccionamiento muy costosa.

A este efecto, la invención concierne, según un primer aspecto, a una composición de nanoemulsión de aceite en agua, particularmente para una RMN, que comprende:

- del 50 al 90 % en peso, ventajosamente del 60 al 85 % en peso, más ventajosamente del 75 al 85 % en peso, aún más ventajosamente del 78 al 82 % en peso de fase acuosa,
- del 9,5 al 49,5 % en peso, ventajosamente del 9,5 al 39,5 % en peso, más ventajosamente del 14,5 al 24,5 % en peso, aún más ventajosamente del 17,5 al 21,5 % en peso de fase lipídica en forma de nanogotitas que comprende:

- un aceite, y
- partículas magnéticas (p) a base de un compuesto de hierro, estando dichas partículas magnéticas (p) recubiertas por uno o varios ácidos grasos C8-C22, ventajosamente C14-C18, más ventajosamente C16-C18, aún más ventajosamente C18,

- del 0,38 al 4,95 % en peso, ventajosamente del 0,5 al 2 % en peso de una mezcla de tensioactivos en la interfase entre las fases acuosa y lipídica, la mezcla de tensioactivos:

  - comprende al menos un lípido anfifílico y al menos un ligando de direccionamiento anfifílico, y
  - representa del 4 al 10 % en peso, ventajosamente del 5 al 8 % en peso con respecto al aceite de la fase lipídica;

caracterizada por que el aceite de la fase lipídica comprende al menos el 70 %, ventajosamente al menos el 80 %, de forma ventajosa al menos el 95 % en peso, particularmente al menos el 97 %, de glicéridos de ácidos grasos saturados C6-C18, ventajosamente C6-C14, más ventajosamente C6-C10 y por que la composición comprende más de 100 mmoles, ventajosamente más de 120 mmoles, aún más ventajosamente más de 140 mmoles de hierro por litro de composición.

De forma ventajosa, en la composición según la invención, el total de los porcentajes de fase acuosa, de fase lipídica y de tensioactivo en la interfase de estas dos fases es igual al 100 %.

Por el término “ácido graso” se entiende la designación de ácidos carboxílicos alifáticos que presentan una cadena carbonada de al menos 4 átomos de carbono. Los ácidos grasos naturales poseen una cadena carbonada de entre 4 y 28 átomos de carbono (generalmente un número par). Se habla de “ácido graso de cadena larga” para una longitud de entre 14 y 22 carbonos, y de cadena muy larga si hay más de 22 carbonos. Por el contrario, se habla de “ácido graso de cadena corta” para una longitud de entre 6 y 10 carbonos, en particular de 8 o 10 átomos de carbono. El experto en la materia conoce la nomenclatura asociada y en particular utiliza:

- Ci-Cp para designar un intervalo de ácidos grasos entre Ci y Cp
- Ci+Cp, el total de los ácidos grasos Ci y de los ácidos grasos Cp

Por ejemplo:

- los ácidos grasos de entre 14 y 18 átomos de carbono se escriben “ácidos grasos C14-C18”
- el total de los ácidos grasos C16 y de los ácidos grasos C18 se escribe C16 +C18.
- para para un ácido graso insaturado, un experto en la materia utilizará la siguiente nomenclatura Ci: X n-N en la que N será la posición del doble enlace en el ácido graso insaturado partiendo del carbono opuesto al grupo ácido, i es el número de átomos de carbono del ácido graso, X es el número de doble enlaces (insaturaciones) de este ácido graso. El ácido oleico será designado, por ejemplo, con la nomenclatura (C18:1 n-9).

La concentración de hierro de la composición de nanoemulsión se mide mediante les técnicas conocidas por el experto en la materia y, por ejemplo, mediante una espectroscopia de emisión atómica. De forma preferente, la composición de nanoemulsión según la invención comprende de 100 a 300 mmoles de hierro por litro de composición, más preferiblemente de 120 a 200 mmoles de hierro por litro de composición, aún más preferiblemente de 140 a 160 mmoles de hierro por litro de composición.

A continuación se proporcionan precisiones sobre los diferentes constituyentes de la composición.

Fase acuosa

La fase acuosa es ventajosamente agua o una solución acuosa farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina o una solución tampón. Particularmente podrá comprender algunos aditivos tales como glicerol o manitol.

Aceite de la fase lipídica

Muy ventajosamente, la fase lipídica está constituida por el aceite y por las partículas magnéticas (p).

Los glicéridos de ácidos grasos saturados del aceite de la fase lipídica se encuentran ventajosamente en forma de triglicéridos de ácidos grasos saturados. El aceite comprende al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80, un 90, un 95, un 97 % en peso de glicéridos de ácidos grasos saturados C6-C10. Este aceite tendrá como ventajas estar bien adaptado a las formulaciones farmacéuticas inyectables de agentes de contraste, no ser sensible a la oxidación (lo que permite así una conservación de varios meses del producto que lo comprende y ninguna alteración en el comportamiento paramagnético del producto para los análisis de imágenes médicas) y sobre todo permitir que la composición de nanoemulsión cuya fase lipídica comprende este aceite o el producto de contraste que comprende esta composición, tenga una muy buena afinidad con respecto al receptor objetivo.

Muy ventajosamente, el aceite comprende menos del 10 %, preferiblemente menos del 5 % de glicéridos de ácidos grasos insaturados, en particular menos del 5 %, y preferiblemente menos del 2 %, menos del 1 % en peso de glicéridos de ácidos grasos insaturados C14-C18 o C14-C22.

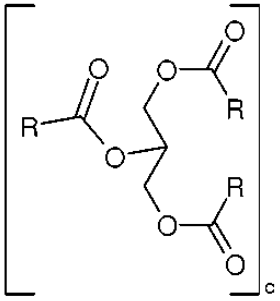
El aceite de la fase lipídica comprende preferiblemente, o puede estar constituido por, una mezcla de diglicéridos y/o de triglicéridos de uno o varios ácidos grasos elegidos entre ácido caprílico, ácido cáprico, ácido linoleico y ácido succínico, o uno de sus derivados.

Por derivados del ácido caprílico, del ácido cáprico, del ácido linoleico, del ácido succínico, se entienden los derivados metilados, hidroperoxilados, hidroxilados, oxilados, epoxilados, metoxilados, halogenados, aminados, cianilados, nitrosilados o tiolados de estos diferentes ácidos grasos.

De forma ventajosa, el aceite de la fase lipídica comprende una mezcla de triglicéridos del ácido caprílico y del ácido cáprico.

De forma ventajosa, el aceite de la fase lipídica comprende más del 80, del 85, del 90, del 95 % en peso de una mezcla de triglicéridos del ácido caprílico y del ácido cáprico.

Por ejemplo, el aceite de la fase lipídica es el aceite de coco o el aceite MIGLYOL®, particularmente de fórmula:



(R = C8 + C10) > 95 %

o uno de sus derivados conocidos, por ejemplo, el aceite MIGLYOL® 810, el aceite MIGLYOL® 812 (triglicérido caprílico/cáprico), el aceite MIGLYOL® 818 (triglicérido caprílico/cáprico/linoleico), el aceite MIGLYOL® 612 (trihexanoato de glicerilo) u otros derivados del dicaprilato dicaprato de propilenglicol MIGLYOL®.

El aceite de coco tiene la siguiente composición:

Naturaleza del ácido graso de los glicéridos de ácidos grasos	Concentración (en % m/m)
Ácido caprílico (C8:0)	6 - 9 %
Ácido cáprico (C10:0)	6-10 %
Ácido láurico (C12:0)	44 - 51 %
Ácido mirístico (C14:0)	13 - 18 %
Ácido palmítico (C16:0)	8-10 %
Ácido esteárico (C18:0)	1 - 3 %
Ácido oleico (C18:1 n-9)	0,5 - 7,5 %
Ácido linoleico (C18:2 n-6)	< 2.5 %

El aceite de la fase lipídica es preferiblemente un aceite MIGLYOL®. Por ejemplo, el aceite Miglyol® 812 tiene la siguiente composición:

Ácido graso de los glicéridos de ácidos grasos	Concentración (m/m)
Ácido caproico (C6:0)	máx. 2 %
Ácido caprílico (C8:0)	del 50 al 65 %
Ácido cáprico (C10:0)	del 30 al 45 %
Ácido láurico (C12:0)	máx. 2 %
Ácido mirístico (C14:0)	máx. 1 %
Ácido linoleico (C18:2 n-6)	-

El aceite Miglyol® 818 tiene la siguiente composición:

Ácidos grasos de los glicéridos de ácidos grasos	Concentración (m/m)
Ácido caproico (C6:0)	máx. 2 %
Ácido caprílico (C8:0)	del 45 al 65 %
Ácido cáprico (C10:0)	del 30 al 45 %
Ácido láurico (C12:0)	máx. 3 %
Ácido mirístico (C14:0)	máx. 1 %
Ácido linoleico (C18:2 n-6)	del 2 al 5 %

Según algunas variantes, el aceite de la fase lipídica es una mezcla de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80, un 90, un 95 % en peso de glicéridos de ácidos grasos saturados de entre 6 y 10 átomos de carbono.

Preferentemente, los glicéridos de ácidos grasos saturados del aceite de la fase lipídica están en forma de mono, di o triglicéridos, preferiblemente en forma de triglicéridos.

De forma preferida, el aceite de la fase lipídica de las emulsiones comprende glicéridos de ácidos grasos saturados cuyos ácidos grasos saturados son las siguientes variantes:

- C6-C18 > 70 % en peso, preferiblemente C6-C18 > 80 % en peso, más preferiblemente C6-C18 > 95 % en peso, y aún más preferiblemente C6-C18 > 98 % en peso, o
- C6-C14 > 70 % en peso, preferiblemente C6-C14 > 80 % en peso, más preferiblemente C6-C14 > 95 % en peso, y aún más preferiblemente C6-C14 > 98 % en peso o
- C8+C10 > 70 % en peso, preferiblemente C8+C10 > 80 % en peso, más preferiblemente C8+C10 > 95 % en peso, y aún más preferiblemente C8+C10 > 98 % en peso o
- C8 del 40 al 70 % en peso, preferiblemente del 50 al 65 % en peso y/o C10 del 20 al 50 % en peso, más preferiblemente del 30 al 45 % en peso, siendo el total C8+C10 superior al 80 % en peso.

Se ha constatado que más allá del 49,5 % en peso de fase lipídica en la composición, ésta adopta un comportamiento y/o una viscosidad demasiado reofluidificante (pasando a ser entonces la viscosidad superior a unos valores de entre 4 y 5 mPa.s) que no están adaptados para una inyección intravenosa.

Se precisa que teniendo en cuenta particularmente el volumen inyectable a los pacientes, del orden de entre 10 y 50 ml, el aceite se utiliza en una cantidad lo suficientemente elevada, de al menos el 9,5 % en peso con respecto al peso de la composición, con el fin de obtener una solución lo suficientemente concentrada a la vez en gotitas y en hierro para obtener una señal de RMN suficiente. Es necesario tener una concentración adaptada a la duración de la inyección, el momento de adquisición de la señal y el tratamiento asociado de los datos por parte del profesional. Una solución muy diluida sería inutilizable para los análisis de imágenes médicas.

Mezcla de tensioactivos en la interfase entre las fases acuosa y lipídica

Se recuerda que el término “tensioactivo” hace referencia a un compuesto que tiene una estructura anfifílica que le confiere una afinidad particular por las interfases de tipo aceite/agua o agua/aceite, lo que le da la capacidad de reducir la energía libre de estas interfases y de estabilizar los sistemas dispersos.

El experto en la materia comprende que la mezcla de tensioactivos en la interfase está representada por el conjunto de los tensioactivos utilizados, es decir, como se explica con detalle en la solicitud: los lípidos anfifílicos, los ligandos de direccionamiento anfifílicos, y dado el caso, otros compuestos tales como lípidos pegilados (lípidos acoplados a PEG). Debido a su estructura anfifílica, los ligandos de direccionamiento anfifílicos juegan el papel de tensioactivo.

En las siguientes páginas se proporcionarán ejemplos de estos compuestos.

Las nanogotitas comprenden, cada una, un número de ligandos de direccionamiento anfifílico del orden de entre 100 y 5000, particularmente de entre 500 y 4000, particularmente de entre 1800 y 3500 (por ejemplo, 2000), lo que permite un direccionamiento eficaz según la afinidad y la multivalencia del ligando de direccionamiento. Los resultados biológicos obtenidos gracias a las nanoemulsiones según la invención muestran además que los ligandos de direccionamiento están ventajosamente repartidos en el conjunto de la superficie externa de las nanogotitas, lo que se traduce por una multivalencia optimizada de los ligandos de direccionamiento.

Los ligandos de direccionamiento anfifílicos representan ventajosamente del 0,01 al 10 % mol/mol de la cantidad total de tensioactivos de la mezcla de tensioactivos, más ventajosamente del 0,05 al 5 %, particularmente del 0,05 al 3 %.

Por un porcentaje (%) “mol/mol” de la cantidad total de tensioactivo, se entiende el número de moles de ligando de direccionamiento anfifílico por 100 moles de tensioactivos totales de la mezcla de tensioactivos.

El producto de contraste inyectado que comprende las composiciones de nanoemulsiones descritas tiene una afinidad ventajosamente del orden de entre 1 pM y 100 nM, particularmente de entre 1 pM y 50 nM, ventajosamente de entre 1 pM y 100 pM (la afinidad por el ligando de direccionamiento anfifílico, aproximadamente de entre 1 nM y 1 µM, se divide por el número de ligandos de direccionamiento por nanogotita).

De forma preferida, la mezcla de tensioactivos en la interfase entre las fases acuosa y lipídica de la nanoemulsión según la invención comprende del 80 al 96,95 % mol/mol de lípido anfifílico, del 3 al 15 % mol/mol de lípido pegilado y del 0,05 al 5 % mol/mol de un ligando de direccionamiento anfifílico.

Partículas metálicas (p)

Por "partículas a base de un compuesto de hierro", se entiende, en el sentido de la presente descripción, partículas que comprenden o están constituidas por un compuesto de hierro, que comprende generalmente hierro (III), generalmente un óxido o un hidróxido de hierro.

Como norma general, las partículas magnéticas (p) están compuestas total o parcialmente por hidróxido de hierro; óxido de hierro hidratado; ferritas; óxidos de hierro mixtos tales como óxidos de hierro mixtos de cobalto, de níquel, de manganeso, de berilio, de magnesio, de calcio, de bario, de estroncio, de cobre, de cinc o de platino; o una mezcla de éstos.

En el sentido de la presente solicitud, el término "ferrita" designa los óxidos de hierro de fórmula general [x Fe_2O_3 y MO_z], en la que M designa un metal magnetizable bajo el efecto de un campo magnético, tal como Fe, Co, Ru, Mg, Mn, pudiendo ser el metal magnetizable eventualmente radioactivo.

De forma preferente, las partículas magnéticas (p) de las composiciones de la invención comprenden una ferrita, particularmente la maghemita (γFe_2O_3) o la magnetita (Fe_3O_4), o incluso ferritas mixtas de cobalto (Fe_2CoO_4) o de manganeso (Fe_2MnO_4). En este marco, se prefieren muy particularmente las partículas magnéticas (p) compuestas total o parcialmente por una ferrita, y preferiblemente esencialmente (es decir, más del 90 %, preferiblemente más del 95 %, aún más preferiblemente más del 98 % en peso), de maghemita o de magnetita o de una mezcla de éstas.

Las partículas magnéticas (p) son preferiblemente partículas magnéticas ácidas.

Las partículas magnéticas (p) de las composiciones según la invención presentan en su superficie sitios hidroxilados protonados en medio ácido (es decir, un medio que tiene un pH de entre 1 y 3,5, preferiblemente de entre 2 y 3) que se corresponde más precisamente con la especie $Fe\text{-}OH_2^+$ resultante de una interacción muy fuerte entre un ion Fe^{3+} de la superficie de la partícula y una molécula de agua ácida (H_3O^+). Estos protones pueden ser considerados como constitutivos de la partícula a partir de los trabajos de J. Lyklema et al., *Materials Science Researc,* 1984, 17, págs. 1-24.

Según una variante particularmente preferida, las partículas magnéticas (p) son superparamagnéticas.

Las partículas magnéticas (p), antes de ser recubiertas por uno o varios ácidos grasos, poseen entonces, preferiblemente, un diámetro hidrodinámico de entre 5 y 200 nm, incluso mejor de entre 5 y 60 nm o de entre 5 y 20 nm.

De forma muy ventajosa, las partículas magnéticas (p) a base de un compuesto de hierro están recubiertas por un ácido graso insaturado, preferiblemente monoinsaturado, aún más preferiblemente por ácido oleico (C18:1 n-9).

Este ácido graso tiene como ventaja hacer óptima la solubilización de las partículas magnéticas en los aceites de la fase lipídica según la invención.

Otras características de las nanoemulsiones

Las gotitas de las nanoemulsiones según la invención tienen un tamaño lo suficientemente pequeño como para permitirles circular en los medios biológicos sin la degradación del producto, hasta el objetivo del ligando de direccionamiento anfifílico que se ha insertado en las nanogotitas gracias a su grupo lipófilo. El tamaño de las nanogotitas es típicamente de entre 30 y 300 nm, ventajosamente de entre 50 y 250 nm, particularmente de entre 100 y 220 nm, en particular de entre 180 y 210 nm. El tamaño de las nanoemulsiones se mide mediante la utilización del método de PCS (véanse los detalles a continuación).

Además, las formulaciones obtenidas son isoosmolares (es decir, que su osmolaridad es idéntica a la del plasma), lo que evita molestias para el paciente durante la inyección. Además, la cantidad de ligandos de direccionamiento

injertados en las nanogotitas está bien adaptada para las imágenes de RMN. La composición es, además, capaz de soportar la esterilización con calor, típicamente en el autoclave.

Modos de realización preferidos

Según los modos de realización preferidos, la composición de nanoemulsión según la invención tiene la composición en peso:

1) del 50 al 90 % en peso, ventajosamente del 60 al 85 % en peso, más ventajosamente del 75 al 85 % en peso, aún más ventajosamente del 78 al 82 % en peso de fase acuosa,
2) del 9,5 al 49,5 % en peso, ventajosamente del 9,5 al 39,5 % en peso, más ventajosamente del 14,5 al 24,5 % en peso, aún más ventajosamente del 17,5 al 21,5 % en peso de fase lipídica,
3) del 0,38 al 4,95 % en peso de la mezcla de tensioactivos (preferiblemente del 4 al 10 % de la fase lipídica), preferiblemente del 0,5 al 2 % en peso de la mezcla de tensioactivos, mezcla de tensioactivos que comprende del 90 al 99,99 %, ventajosamente del 95 al 99,95 %, más ventajosamente del 97 al 99,95 % en mol/mol de lípido anfifílico, y del 0,01 al 10 % mol/mol, ventajosamente del 0,05 al 5 %, más ventajosamente del 0,05 al 3 % de ligando de direccionamiento anfifílico,
precisándose que el total de los porcentajes de 1), 2) y 3) es igual al 100 %.

Según los modos de realización preferidos, la nanoemulsión tiene la composición en peso:

1) del 50 al 90 % en peso, ventajosamente del 60 al 85 % en peso, más ventajosamente del 75 al 85 % en peso, aún más ventajosamente del 78 al 82 % en peso de fase acuosa,
2) del 9,5 al 49,5 % en peso, ventajosamente del 9,5 al 39,5 % en peso, más ventajosamente del 14,5 al 24,5 % en peso, aún más ventajosamente del 17,5 al 21,5 % en peso de fase lipídica,
3) del 0,38 al 4,95 % en peso de la mezcla de tensioactivos, mezcla de tensioactivos que comprende del 95 al 99,95 % mol/mol de lípido anfifílico y del 0,05 al 5 % mol/mol, particularmente del 0,05 al 3 % mol/mol de ligando de direccionamiento anfifílico,
precisándose que el total de los porcentajes de 1), 2) y 3) es igual al 100 %.

Según algunas realizaciones preferidas, la nanoemulsión tiene la composición en peso:

1) del 50 al 90 %, preferiblemente del 60 al 85 %, ventajosamente del 75 al 85 %, más ventajosamente del 78 al 82 %, particularmente del 79 al 81 % en peso de fase acuosa,
2) del 9,5 al 49,5 %, preferiblemente del 9,5 al 39,5 %, ventajosamente del 14,5 al 24,5 %, más ventajosamente del 17.5 al 21.5 % en peso de fase lipídica que comprende un aceite, aceite que comprende al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80, un 90, un 95 % en peso de glicéridos de ácidos grasos saturados C6-C14, preferiblemente C6-C10,
3) del 0,38 al 4,95 %, ventajosamente del 0,38 al 3,95 %, más ventajosamente del 0,5 al 1,5 % en peso de la mezcla de tensioactivos,
precisándose que el total de los porcentajes de 1), 2) y 3) es igual al 100 %.

Según algunas realizaciones preferidas, la mezcla de los tensioactivos comprende (en % mol/mol de la cantidad total de tensioactivos):

3.1) del 50 al 99,99 %, ventajosamente del 65 al 97,95 %, más ventajosamente del 77 al 97,95 %, aún más ventajosamente del 80 al 96,95 % de lípido anfifílico,
3.2) del 0,01 al 10 %, ventajosamente del 0,05 al 5 %, aún más ventajosamente del 0,05 al 3 % de ligando de direccionamiento anfifílico,
3.3) del 0 al 40 %, ventajosamente del 2 al 30 %, más ventajosamente del 2 al 20 %, aún más ventajosamente del 3 al 15 % de lípido pegilado, precisándose que el total de los porcentajes de 3.1), de 3.2) y de 3.3) es igual al 100 %.

En particular, son ventajosos los siguientes modos de realización:

% en peso de la fase acuosa con respecto a la composición (1)	% en peso de la fase lipídica con respecto a la composición (2)	% en peso de la mezcla de tensioactivos con respecto a la fase lipídica (3)	% en peso de la mezcla de tensioactivos con respecto a la composición (4) (*)	Concentración de hierro (mmoles/litro de composición)
50 - 90	9,5 - 40	4 - 10 de (2)	[0,38 - 4] %	100 - 300
70 - 90	9,5 - 29.5	4 - 10 de (2)	[0,38 - 2,95] %	100 - 300
75 - 85	14 - 25	4 - 10 de (2)	[0,56 - 2,5] %	100 - 300
78 - 82	17 - 21	4 - 10 de (2)	[0,68 - 2,1] %	100 - 300
75 - 85	14 - 25	5 - 8 de (2)	[0,7 - 2] %	100 - 300
78 - 82	17 - 21	5 - 8 de (2)	[0,85 - 1,68] %	100 - 300

Precisándose que el total (1) + (2) + (4) = 100 %
(*) los intervalos de la columna 4 se corresponden con los porcentajes de la columna 3 multiplicados por los porcentajes de la columna 2 (los más bajos con los más bajos y los más altos con los más altos). Por ejemplo, el intervalo [0,38 - 4] se corresponde con un 4 % (porcentaje precisado en la columna 3) x 9,5 (porcentaje precisado en la columna 2) = 0,38 %, y 10 % (porcentaje precisado en la columna 3) x 40 (porcentaje precisado en la columna 2) = 4 %. Estos intervalos son particularmente preferidos en la medida en que permiten la obtención de un tamaño de las nanogotitas de la emulsión de entre 150 y 300 nm, y en particular de entre aproximadamente 180 y 210 nm.

El tamaño y la estabilidad de las nanogotitas de la emulsión son muy satisfactorios, así como la viscosidad (del orden de entre 1 y 3 mPa.s). Su comportamiento es Newtoniano, lo que constituye una ventaja importante para las soluciones farmacéuticas inyectables.

Por ejemplo, tenemos los intervalos de proporciones siguientes de los constituyentes.

% en peso de la fase acuosa (1)	% en peso de la fase lipídica (2)	% en peso de la mezcla de tensioactivos con respecto a la fase lipídica (3)	Contenido en % (mol/mol) de lípido anfifílico en la mezcla de tensioactivos	Contenido en % (mol/mol) de lípido pegilado en la mezcla de tensioactivo	Contenido en % (mol/mol) de ligando de direccionamiento anfifílico en la mezcla de tensioactivos	Concentración de hierro (mmoles/litro de composición)
del 75 al 85, preferentemente del 78 al 82, preferentemente de 78,6	del 14 al 25, preferentemente del 17 al 21, preferentemente de 20	del 5 al 10, preferentemente del 5 al 8, preferentemente de 7,2	del 95 al 99,95	0	del 0,05 al 5, preferentemente del 0,05 al 3	del 100 al 300, preferentemente del 120 al 200, preferentemente del 140 al 160
del 75 al 85, preferentemente del 78 al 82, preferentemente de 78,6	del 14 al 25, preferentemente del 17 al 21, preferentemente de 20	del 5 al 10, preferentemente del 5 al 8, preferentemente de 7,2	del 80 al 96,95	del 3 al 15, preferentemente del 5 al 15	del 0,05 al 5, preferentemente del 0,05 al 3	del 100 al 300, preferentemente del 120 al 200, preferentemente del 140 al 160
del 75 al 85, preferentemente del 78 al 82, preferentemente de 78,6	del 14 al 25, preferentemente del 17 al 21, preferentemente de 20	del 5 al 10, preferentemente del 5 al 8, preferentemente de 7,2	del 90 al 99,95	del 0 al 5	del 0,05 al 5, preferentemente del 0,05 al 3	del 100 al 300, preferentemente del 120 al 200, preferentemente del 140 al 160

Siendo el total de los contenidos en lípidos anfifílicos, lípidos pegilados, ligandos de direccionamiento anfifílicos, en la mezcla de tensioactivos, del 100 %.

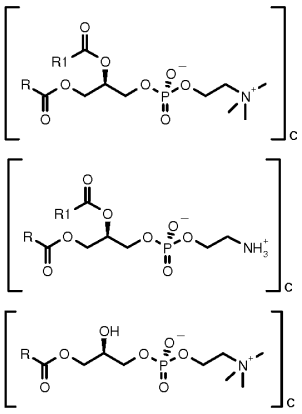
Lípidos anfifílicos

Los lípidos anfifílicos comprenden una parte hidrófila y una parte lipófila. Generalmente se eligen entre los compuestos cuya parte lipófila comprende una cadena saturada o insaturada, lineal o ramificada que tiene entre 8 y 30 átomos de carbono.

Pueden elegirse entre los fosfolípidos, los colesteroles, los lisolípidos, las esfingomielinas, los tocoferoles, los glicolípidos, las estearilaminas, las cardiolipinas de origen natural o sintético; las moléculas compuestas por un ácido graso acoplado a un grupo lipófilo mediante una función éter o éster, tales como los ésteres de sorbitano, como por ejemplo, los monooleato y monolaurato de sorbitano; los lípidos polimerizados; los ésteres de azúcar tales como los mono- y dilaurato, mono- y dipalmitato, mono- y diestearato de sacarosa; pudiendo ser los lípidos anfifílicos utilizados solos o en mezclas.

Ventajosamente, el lípido anfifílico es un fosfolípido, preferiblemente elegido entre: fosfatidilcolina (denominada también lecitina), dioleoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol. La lecitina es un lípido anfifílico preferido.

Ventajosamente, el lípido anfifílico es un lipoide, particularmente la EPC (Egg Phosfatidil Cholina y sus derivados, conocidos particularmente a partir de Avanti Polar Lipids) o el lipoid® S75 de fórmula:



(R y R1 = C_8 + C_{10}) > 95%

	Proporciones (m/m)
Fosfatidilcolina (+ LPC)	del 68 al 73 %
Fosfatidiletanolamina	del 7 al 10 %
Lisofosfatidilcolina	< del 3 %
Fósforo	del 3,4 al 3,7 %

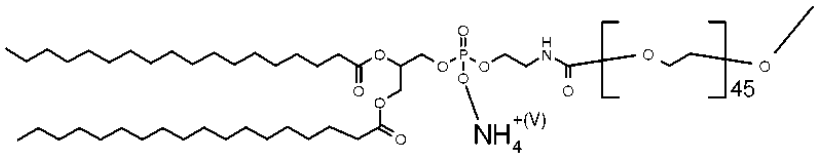
Según un modo de realización particular, todo o parte del lípido anfifílico puede poseer una función reactiva, tal como un grupo maleimida, tiol, amina, éster, oxiamina o aldehído. La presencia de funciones reactivas permite el injerto de compuestos funcionales en la interfase.

Lípidos pegilados

Para la fase lipídica se podrán utilizar, además del lípido anfifílico y del ligando de direccionamiento anfifílico, de una forma no obligatoria, y en particular con el fin de actuar sobre el carácter fugaz del producto en el organismo (es decir, que permite retrasar la eliminación del producto por parte del sistema reticuloendotelial), los lípidos pegilados, es decir, portadores de grupos óxido de polietileno (PEG), tales como polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG-PE). Por “polietilenoglicol” PEG, en el sentido de la presente solicitud, se designan de forma general los compuestos que comprenden una cadena -CH_2-(CH_2-O-CH_2)$_k$-CH_2OR_3 en la que k es un número entero que varía entre 2 y 100 (por ejemplo, 2, 4, 6, 10, 50), y R_3 se elige entre H, alquilo o -(CO)Alk, designando aquí el término "alquilo" o "Alk" un grupo alifático hidrocarbonado, lineal o ramificado, que tiene aproximadamente entre 1 y 6 átomos de carbono en la cadena. El término “polietilenglicol” tal y como se emplea aquí, engloba particularmente los compuestos aminopolietilenoglicoles. Como ejemplo de lípido pegilado, se mencionarán particularmente los PEG 350, 750, 2000, 3000, 5000, modificados mediante la adición de grupos anfifílicos para insertarse en el seno de la capa de tensioactivos de la nanogotitas, particularmente:

- 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-350]
- 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-550],
- 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-750],

Particularmente se utilizará el lípido pegilado:



Ligandos de direccionamiento anfifílicos

Las nanoemulsiones son vectorizadas con la ayuda de ligandos de direccionamiento anfifílicos. La nanoemulsión comprende al menos un ligando de direccionamiento a una zona patológica anclado a la nanogotita, típicamente gracias al grupo lipófilo del ligando de direccionamiento anfifílico.

Las nanoemulsiones tienen además la ventaja de poder controlar el tipo y la cantidad de ligandos de direccionamiento anfifílicos, y particularmente de poder incorporar diferentes ligandos de direccionamiento anfifílicos.

Por ejemplo, una nanogotita comprenderá:

- un ligando de direccionamiento anfifílico que permite el acceso a una zona fisiológica patológica, por ejemplo, que comprende un ligando de direccionamiento de paso a través de la BHE (barrera hematoencefálica)
- otro ligando de direccionamiento anfifílico que permite el direccionamiento a un marcador biológico objetivo sobreexpresado por ciertas células de esta zona patológica.

Las interacciones moleculares entre el ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico y el marcador biológico objetivo permiten la captación de las nanogotitas en la zona patológica, y la obtención de imágenes por RMN resultantes, lo que permite la localización precisa de la zona patológica.

Ventajosamente, el número de ligandos de direccionamiento anfifílicos por gotita de nanoemulsión es de al menos 50, y típicamente del orden de 500, de 1000, de 2000, de 3000, de 5000, de 10.000.

La medición del ligando de direccionamiento anfifílico puede efectuarse, por ejemplo, mediante una espectrometría de masas MALDI-TOF. El número de ligandos de direccionamiento anfifílicos por gotita de nanoemulsión se calcula a partir de los resultados de las mediciones del diámetro hidrodinámico (Z ave) obtenidas mediante una PCS, del volumen de aceite en la emulsión y de la concentración de ligandos de direccionamiento anfifílicos obtenida mediante el siguiente método.

Como ligandos de direccionamiento preferidos del ligando de direccionamiento anfifílico, se mencionarán los ligandos de objetivos biológicos cuya expresión está modificada en una zona patológica (un tumor, por ejemplo), con respecto a la zona sana. De una forma muy preferente, se pueden mencionar, como objetivo biológico que entra en esta definición, las integrinas y particularmente la integrina αVβ3, que es el receptor de la vitronactina y que está, de hecho, compuesta por dos partes: la integrina alfa V y la integrina beta 3 (CD61). Esta integrina αVβ3 constituye un objetivo de elección para la obtención de imágenes en oncología, dado que es débilmente expresada en los tejidos sanos, pero está sobreexpresada durante los fenómenos de angiogénesis, como es el caso en la mayoría de los cánceres, por parte de los nuevos vasos, y en particular por parte de las células endoteliales.

Ventajosamente, como ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico se utiliza al menos un ligando de direccionamiento elegido entre: los péptidos (ventajosamente de menos del 20 aminoácidos, más ventajosamente de entre 5 y 10 aminoácidos), los pseudopéptidos, los peptidomiméticos, los aminoácidos, los agentes de direccionamiento a las integrinas (péptidos y pseudopéptidos, particularmente peptidomiméticos), las glicoproteínas, las lectinas, los derivados pteroicos o aminopteroicos, los derivados del ácido fólico y antifólico, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, los esteroides, los oligonucleótidos, las secuencias de ácido ribonucleico, las secuencias de ácido desoxirribonucleico, las hormonas, las proteínas eventualmente recombinantes o mutadas, los mono- o polisacáridos, los compuestos con un esqueleto de benzotiazol, benzofurano, estirilbenzoxazol / tiazol / imidazol / quinolina, estirilpiridina y los compuestos derivados, y sus mezclas. Los péptidos, los derivados del ácido fólico y antifólico, los agentes de direccionamiento a las integrinas (péptidos y pseudopéptidos, particularmente peptidomiméticos), los agentes de direccionamiento a receptores celulares o a enzimas (particularmente de direccionamiento a cinasas, particularmente a la cinasa de tirosina; a metaloproteasas; a caspasas ...) son particularmente referidos.

Se entiende por la designación de "peptidomimético" un compuesto que no está constituido por un encadenamiento regular de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos, sino que mimetiza la actividad biológica de un péptido.

Se entiende por la designación de “pseudopéptido”, cualquier análogo práctico que comprende al menos una modificación del enlace peptídico nativo -[CO-NH]-.

Por “derivados pteroicos o aminopteroicos”, se entienden los compuestos funcionalizados a partir del ácido pteroico o aminopteroico y o modificados por grupos bioisósteros como se describe en el documento WO 2004/112839, en el documento WO 2007/042504, en el documento US 2005/0227985 y en el documento WO 2010/102238.

Por “derivados del ácido fólico y antifólico”, se entienden los compuestos funcionalizados a partir del ácido fólico o del ácido antifólico y o modificados por grupos bioisósteros como se describe en el documento WO 2004/112839, en el documento WO 2007/042504, en el documento US 2005/0227985 y en el documento WO 2010/102238. Estos derivados incluyen particularmente ácido folínico, ácido pteropoliglutámico y las pteridinas ligandos del receptor de folato como las tetrahidropterinas, los dihidrofolatos, los tetrahidrofolatos y sus análogos desaza y didesaza. Estos análogos “desaza” y “didesaza” son unos análogos que tienen un átomo de carbono sustituido por uno o dos átomos de nitrógeno en la estructura del ácido fólico o del ácido antifólico. Por ejemplo, los análogos desaza incluyen los análogos 1-desaza, 3-desaza, 5-desaza, 8-desaza, and 10-desaza de folato. Los análogos didesaza incluyen, por ejemplo, los análogos 1,5-didesaza, 5,10-didesaza, 8,10-didesaza, and 5,8-didesaza de folato. Como otros derivados del ácido fólico también pueden mencionarse la aminopterina, la ametopterina (metotrexato), el N(10)-metilfolato, el 2-desamino-hidroxifolato, los análogos desaza como la 1-desazametopterina o la 3-desazametopterina y el ácido 3',5’-dicloro-4-amino-4-desoxi-N(10)-metilpteroilglutámico (diclorometotrexato).

Por “compuestos derivados de estirilpiridina”, se entienden los compuestos obtenidos a partir de la estirilpiridina y que portan al menos una cadena funcionalizada en uno de los dos núcleos aromáticos de ésta.

Según algunos modos de realización ventajosos, el ligando de direccionamiento (es decir, la parte que permite el direccionamiento) del ligando de direccionamiento anfifílico, se elige entre la siguiente lista (los documentos y las referencias entre paréntesis son ejemplos y no una lista limitante):

1) Los ligandos de direccionamiento que se dirigen a los receptores del VEGF y de la angiopoyetina (descritos en el documento WO 01/97850), los polímeros tales como la polihistidina (documento US 6,372,194), los polipéptidos que se dirigen a la fibrina (documento WO 01/09188), los péptidos de direccionamiento a las integrinas (documento WO 01/77145, documento WO 02/26776 para la alfaV-beta3, documento WO 02/081497, por ejemplo, RGDWXE), los pseudopéptidos y los péptidos de direccionamiento de las metaloproteasas MMP (documento WO 03/062198, documento WO 01/60416), los péptidos que se dirigen, por ejemplo, al receptor KDR/Flk-I entre los cuales R-X-K-X-H y R-X-K-X-H, o los receptores Tie-1 y 2 (documento WO 99/40947, por ejemplo), los glicósidos de sialil Lewis (documento WO 02/062810 y “Müller et al, Eur. J. Org. Chem, 2002, 3966-3973), los antioxidantes tales como el ácido ascórbico (documento WO 02/40060), los ligandos de direccionamiento de la tuftsina (por ejemplo, el documento US 6,524,554), de direccionamiento a los receptores de proteínas G GPCR, en particular la colecistocinina (documento WO 02/094873), las asociaciones entre un antagonista de la integrina y un mimético de la guanidina (documento US 6,489,333), las quinolonas que se dirigen a la alfav beta3 o 5 (documento US 6,511,648), las benzodiazepinas y los análogos que se dirigen a las integrinas (documento US 2002/0106325, documento WO 01/97861), los imidazoles y análogos (documento WO 01/98294), los péptidos RGD (documento WO 01/10450), los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (FGF, TGFb, GV39, GV97, ELAM, VCAM, inducibles por el TNF o las IL (documento US 6,261,535), las moléculas de direccionamiento modificadas por la interacción con el objetivo (documento US 5,707,605), los agentes de direccionamiento a depósitos amiloides (documento WO 02/28441, por ejemplo), los péptidos escindidos catopsinas (documento WO 02/056670), la mitoxantrona o la quinona (documento US 6,410,695), los polipéptidos que se dirigen a las células epiteliales (documento US 6,391,280), los inhibidores de las proteasas de cisteínas (documento WO 99/54317), los ligandos de direccionamiento descritos en: el documento US 6,491,893 (GCSF), el documento US 2002/0128553, el documento WO 02/054088, el documento WO 02/32292, el documento WO 02/38546, el documento WO 03/006059, el documento US 6,534,038, el documento WO 01/77102, el documento EP 1 121 377, en Pharmacological Reviews (52, nº 2, 179; los factores de crecimiento PDGF, EGF, FGF...), en Topics in Current Chemistry (222, W. Krause, Springer), en Bioorganic & Medicinal Chemistry (11, 2003, 1319-1341; los derivados de tetrahidrobenzacepinonas que se dirigen a la alfaV-beta3).

2) Los inhibidores de la angiogénesis, particularmente los ensayados en ensayos clínicos o ya comercializados, particularmente:

- los inhibidores de la angiogénesis que implican a los receptores FGFR o VEGFR tales como SU101, SU5416, SU6668, ZD4190, PTK787, ZK225846, los compuestos azaciclos (documento WO 02/44156, documento WO 02/059110);
- los inhibidores de la angiogénesis que implican a las MMP tales como el BB25-16 (marimastat), el AG3340 (prinomastat), el solimastat, el BAY12-9566, el BMS275291, el metastat, el neovastat;
- los inhibidores de la angiogénesis que implican a las integrinas tales como el SM256, el SG545, las moléculas de adhesión que bloquean el EC-ECM (tales como el EMD 121-974 o la vitaxina);
- los medicamentos con un mecanismo de acción antiangiogénico más indirecto, tales como el carboxiamidotriazol, el TNP470, la escualamina, el ZD0101;
- los inhibidores descritos en el documento WO 99/40947, los anticuerpos monoclonales muy selectivos para la unión al receptor KDR, los análogos de la somatostatina (documento WO 94/00489), los péptidos de unión a la selectina (documento WO 94/05269), los factores de crecimiento (VEGF, EGF, PDGF, TNF, MCSF, interleucinas); los ligandos de direccionamiento para el direccionamiento al VEGF descritos en Nuclear Medicine Communicacións, 1999, 20;
- los péptidos inhibidores del documento WO 02/066512.

3) los ligandos de direccionamiento capaces de dirigirse a los receptores: CD36, EPAS-1, ARNT, NHE3, Tie-1, 1/KDR, FIM, Tek, neuropilina-1, endoglina, pleyentropina, endosialina, Axl., alPi, a2ssl, a4P1, a5pl, ef B4 (efrina), el receptor de la laminina A, el receptor de la neutrofilina 65, el receptor de la leptina OB-RP, el receptor de la quimiocina CXCR-4 (y otros receptores citados en el documento WO99/40947), la LHRH, la bombesina/GRP, los receptores de la gastrina, el VIP, la CCK.

4) los ligandos de direccionamiento de tipo inhibidores de la cinasa de tirosina.

5) los inhibidores de receptor GPIIb/IIIa conocidos elegidos entre: (1) el fragmento fab de un anticuerpo monoclonal del receptor GPIIb/IIIa, Abciximab, (2) las pequeñas moléculas peptídicas y peptidomiméticas inyectadas por vía intravenosa, tales como el eptifibatide y el tirofiban.

6) los péptidos antagonistas de los receptores del fibrinógeno (documento EP 0 425 212), los péptidos ligandos de los receptores IIb/IIIa, los ligandos del fibrinógeno, los ligandos de la trombina, los péptidos capaces de dirigirse a la placa de ateroma, las plaquetas, la fibrina, los péptidos a base de hirudina, los derivados a base de guanina que se dirigen al receptor IIb/IIIa.

7) otros ligandos de direccionamiento o fragmentos biológicamente activos de ligandos de direccionamiento conocidos por el experto en la materia como medicamentos, con acción antitrombótica, antiagregante plaquetar, antiaterosclerótica, antireestenótica, anticoagulante.

8) otros ligandos de direccionamiento o fragmentos biológicamente activos de ligandos de direccionamiento que se dirigen a las alfa V beta3, descritos en asociación con los DOTA en la patente US 6 537 520, elegidos entre los siguientes: mitomicina, tretinoína, ribomustina, gemcitabina, vincristina, etopósido, cladribina, mitobronitol, metotrexato, doxorrubicina, carbocuona, pentostatina, nitracrina, zinostatina, cetrorelix, letrozol, raltitrexed, daunorrubicina, fadrozol, fotemustina, tomalfasina, sobuzoxano, nedaplatina, citarabina, bicalutamida, vinorelbina, vesnarinona, aminoglutetimida, amsacrina, proglumida, acetato de eliptinio, ketanserina, doxifluridina, etretinato, isotretinoína, estreptozocina, nimustina, vinlosina, flutamida, drogenil, butocina, carmofur, razoxano, sizofilan, carboplatino, mitolactol, tegafur, ifosfamida, prednimustina, picibanilo, levamisol, tenipósido, improsulfano, enocitabina, lisurida, oximetolona, tamoxifeno, progesterona, mepitiostano, epitiostanol, formestano, interferón-alfa, interferón-2 alfa, interferón-beta, interferón-gamma, colony stimulating factor-1, colony stimulating factor-2, denileucina diftitox, interleucina-2, leutinizing hormone releasing factor.

9) algunos ligandos de direccionamiento que se dirigen a tipos particulares de cáncer, por ejemplo, los péptidos que se dirigen al receptor ST asociado al cáncer colorrectal, o el receptor de la taquicinina.

10) los ligandos de direccionamiento que utilizan los compuestos de tipo fosfinas.

11) los ligandos de direccionamiento para un direccionamiento a la P-selectina, a la E-selectina; por ejemplo, el péptido de 8 aminoácidos descrito por Morikawa et al, 1996, 951, así como diferentes azucares.

12) la anexina V o los ligandos de direccionamiento que se dirigen a los procesos apoptóticos.

13) cualquier péptido obtenido mediante tecnologías de direccionamiento tales como *fage display*, modificado eventualmente por aminoácidos no naturales (http//cemlibrary.bri.nrc.ca), por ejemplo, los péptidos surgidos de los bancos de *fage display*: RGD, NGR, CRRETAWAC, KGD, RGD-4C, XXXY*XXX, RPLPP, APPLPPR.

14) otros ligandos de direccionamiento peptídicos conocidos por un direccionamiento a las placas de ateroma, mencionados particularmente en el documento WO 2003/014145 y particularmente la VCAM

15) las vitaminas.

16) los ligandos de receptores hormonales, entre los cuales hormonas y esteroides.

17) los ligandos de direccionamiento que se dirigen a los receptores opioides.

18) los ligandos de direccionamiento que se dirigen a los receptores TKI.

19) los antagonistas LB4 y VnR.

20) los compuestos nitriimidazoles y bencilguanidinas.

21) los ligandos de direccionamiento recordados en Topics in Current Chemistry, vol. 222, 260-274, Fundamentals of Receptor-based Diagnostic Metallopharmaceuticals, particularmente:

- los ligandos de direccionamiento para un direccionamiento a los receptores peptídicos sobreexpresados en los tumores (receptores de la LHRH, la bombesina/GRP, receptores del VIP, receptores de la CCK, receptores de la taquicinina, por ejemplo), particularmente los análogos de somatostatina o de bombesina, los péptidos derivados de octreótido eventualmente glicosilados, los péptidos VIP, los alfa-MSH, los péptidos CCK-B
- los péptidos elegidos entre: los péptidos cíclicos RGD, fibrina-cadena alfa, CSVTCR, tuftsina, fMLF, YIGSR (receptor: laminina).

22) los oligosacáridos, los polisacáridos y los derivados de osas, los derivados que se dirigen a los receptores Glut (receptores de osas).

23) los ligandos de direccionamiento utilizados para los productos de tipo *smart*.

24) los marcadores de la viabilidad miocárdica (tetrofosmina y hexakis2metoxi-2metilpropilisonitrilo).

25) los trazadores del metabolismo de los azúcares y las grasas.

26) los ligandos de receptores de neurotransmisores (receptores D, 5HT, Ac, GABA, NA).

27) los oligonucleótidos.

28) el factor tisular

29) los ligandos de direccionamiento descritos en el documento WO 03/20701, en particular el PK11195 ligando del receptor periférico de las benzodiazepinas.

30) los péptidos que se unen a la fibrina, particularmente las secuencias peptídicas descritas en el documento WO 03/11115.

31) los inhibidores de la agregación de las placas amiloides (descritos, por ejemplo, en el documento WO 02/085903).

32) los farmacóforos, compuestos de direccionamiento de la enfermedad de Alzheimer, en particular los compuestos que comprenden los esqueletos de tipo benzotiazol, benzofuranos, estirilbenzoxazoles / tiazoles / imidazoles / quinolina, estirilpiridinas.

33) los farmacóforos, compuestos de direccionamiento obtenidos a partir de esqueletos químicos con actividad farmacológica descritos en el documento US2007098631, particularmente las fórmulas de las páginas 4 a 10 y de las páginas 13-14), particularmente los compuestos de la tabla de la página 4 en la columna titulada “scafolds and derivatives”: bifenilo; arilpiperidina; arilpiperazina; 1,4 dihidropiridina dihidropirimidona; 1,4 benzodiazepin-2-ona; 1,5 benzodiazepin2-ona; 1,4-benzodiazepin-2,5 dionas; pirrolo2,1-c 1,4 benzodiazepinas 5,11 dionas; 1,4 benzotiazepin-5-onas; 5,11-dihidrobenzo pirido 3,2b 1,4 diazepin-6-onas benzopirano; cromona; benzopiranona;

cumarina, piranocumarina; benzopiperazinonas; quinazolinona; quinazolindiona; quinoxalinona; imidazoquinoxalina; indol; bencimidazol, benzofurano, benzotiofeno.

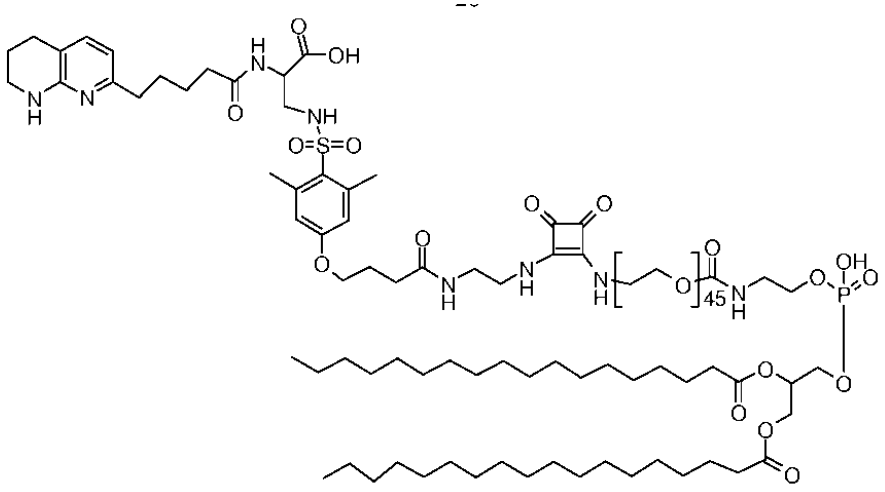
34) los ligandos de direccionamiento a las integrinas, particularmente los compuestos no peptídicos miméticos de péptidos RGD, y en particular los compuestos de tetrahidro naftiridina descritos, por ejemplo, en: J Med. Chem., 2003, 46, 4790-4798, Bioorg. Med. Chem. Letters, 2004, 14, 4515-4518, Bioorg. Med. Chem. Letters, 2005, 15, 1647-1650.

35) los ligandos de direccionamiento a la MUC5AC, particularmente los fragmentos de anticuerpos, los péptidos y los compuestos no peptídicos miméticos de péptidos.

36) los ligandos de un objetivo asociado a la angiogénesis, particularmente de un objetivo elegido entre 4N1K, AGF ("angiopoietin-related growth factor" en inglés), Angiogenina (ANG), Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2, Angiostatina, ARP4 ("angiopoietin-related protein 4" en inglés), bFGF ("basic fibroblast growth factor" en inglés), CD31 (PECAM-1), CD34, CD97, CD146 (MUC18), CEC ("circulating endothelial cells" en inglés), CEP ("circulating endothelial precursor cells" en inglés), Colagenasa-1 (CI), COX-2 (Ciclooxigenasa-2), E7820, EG-1 ("endothelial-derived gene-1" en inglés), el dominio B extra (ED-B) de la Fibronectina, Endoglina (CD105), ESAF ("Endothelial cell stimulating angiogenesis factor" en inglés), Factor VIN (factor antihemofílico A), FIM ("Fms-like tyrosine kinase 1" en inglés), Integrina α1α2, Integrina α2β1, Integrina α3β1, Integrina α5β1, Integrina αvβ3, Integrina α6β4, Integrina α9β1, Integrina-β1, KDR, N-Cadherina, Nestina, NG2 proteoglicano, PSMA ("prostate-specific membrane antigen" en inglés), PV-1 ("Plasmalemmal vesicle associated protein-1" en inglés), S100A13, Sindecano-1, T-Cadherina, TEM-5 ("Tumor endothelial marker 5" en inglés), TEM-8 ("Tumour endothelial marker-8" en inglés), Trombospondina-1 (TSP1), Trombospondina-2 (TSP2), Thy-1, Tie-1, Tie-2, Tn-C (Tenascina-C), TP (fosforilasa de timidina), VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule-1" en inglés), VE-cadherina, VEGF, VWF ("von Willebrand Factor" en inglés) y los inhibidores de la angiogénesis recordados en el anterior párrafo 2).

En particular, para estos compuestos de tetrahidro naftiridina, puede utilizarse cualquier compuesto de naftiridina conocido a partir de la técnica anterior (particularmente los del documento WO 2009/114776), estando descrita la utilización de los compuestos de naftiridina como ligando de direccionamiento para la obtención de imágenes médicas en el documento WO 2007/042506 página 13 líneas 30-34.

El ligando de direccionamiento del ligando del direccionamiento anfifílico preferente según la invención se elige entre los péptidos y/o los peptidomiméticos y/o los ligandos de direccionamiento de las integrinas (por ejemplo, de la integrina αVβ3). De forma ventajosa, el ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un peptidomimético. De forma muy ventajosa, el ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un compuesto peptidomimético de direccionamiento a las integrinas, y en particular, un compuesto peptidomimético de direccionamiento a las integrinas elegido entre los compuestos que comprenden un grupo naftiridina. De forma aún más ventajosa, el ligando de direccionamiento anfifílico es un compuesto peptidomimético de direccionamiento a las integrinas de fórmula:



o una de sus sales, por ejemplo, en forma de fosfato de amonio.

Este peptidomimético de RGD tiene como propiedad dirigirse a la integrina αVβ3.

Los ligandos de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico para el reconocimiento del objetivo en un medio biológico se sitúan esencialmente en el lado de la superficie externa de las nanogotitas, insertándose el grupo lipófilo del ligando de direccionamiento anfifílico en la capa de tensioactivo.

El ligando de direccionamiento anfifílico se escribe ventajosamente en la forma: Bio - L - Lipo en la que:

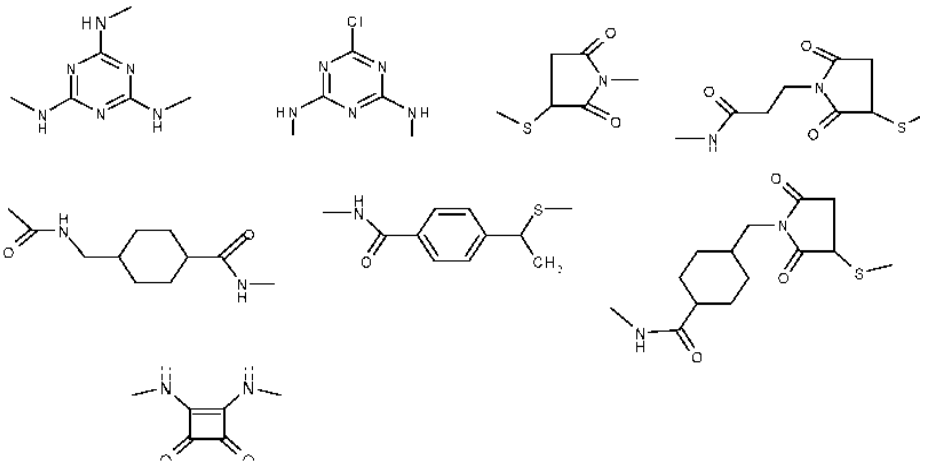
- Bio es el ligando de direccionamiento (particularmente uno de los ligandos de direccionamiento mencionado más arriba) localizado en la superficie externa de las nanogotitas,
- Lipo es un grupo lipófilo que se inserta en el seno de la capa de tensioactivo,
- L es un grupo de enlace que une Bio y Upo, ventajosamente elegido entre:

■ un enlace simple, escuarato, alquileno C1-6, PEG, por ejemplo, CH_2-$(CH_2$-O-$CH_2)_k$-CH_2 con k = entre 1 y 10, $(CH_2)_3$-NH, NH-$(CH_2)_2$-NH, NH-$(CH_2)_3$-NH, , $(CH_2)_n$, $(CH_2)_n$-CO-, -$(CH_2)_n$NH-CO- con n = entre 2 y 10, $(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-CO-, $(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-NH-CO- con q = 1-10 y r = 2-10, $(CH_2)_n$-CONH-, $(CH_2)_n$-CONH-PEG, $(CH_2)_n$-NH-, -OOC-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-COO-; -OOC-$(CH_2)_2$-CO_2-$(CH_2)_2$-OCO-$(CH_2)_2$-COO-; -OOC-CH(OH)-CH(OH)-COO-; -OOC-$(CH_2)_n$-COO-; -NH-$(CH_2)_n$-NH-, con n = 0-20; NH-$(CH_2)_n$-CO_2; NH-CH_2-$(CH_2$-O-$CH_2)_n$-CO_2 con n = entre 1 y 10,

■ P1-I-P2, idénticas o diferentes, eligiéndose P1 y P2 independientemente entre O, S, NH, un enlace simple, CO_2, NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH, SO_2NH-, $NHSO_2$-, escuarato

con I = alquileno, alcoxialquileno, polialcoxialquileno (particularmente PEG), alquileno interrumpido por uno o varios escuaratos, por uno o varios arilos, ventajosamente fenilos, o por uno o varios grupos elegidos entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, - (CO)NH-, -O(CO)- y -(OC)O-, alquenileno o alquinileno, estando dichos alquenileno o alquinileno eventualmente interrumpidos por uno o varios grupos elegidos entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, -(CO)NH-, -O(CO)-, o -(OC)O-.

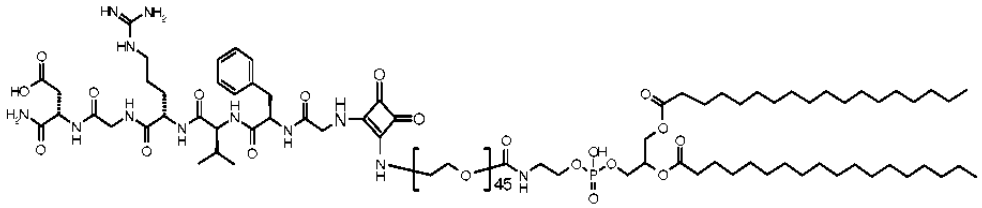
Los enlaces covalentes L o I entre Bio y Lipo son ventajosamente del tipo -CONH-, - COO-, -NHCO-, -OCO-, -NH-CS-NH-, -C-S-, -N-NH-CO-, -CO-NH-N-, -CH_2-NH-, -N-CH_2-, -N-CS-N-, -CO-CH_2-S-, -N-CO-CH_2-S-, -N-CO-CH_2-CH_2-S-, -CH=NH-NH-, -NH-NH=CH-, - CH=N-O-, -O-N=CH- o que responden a las siguientes fórmulas:

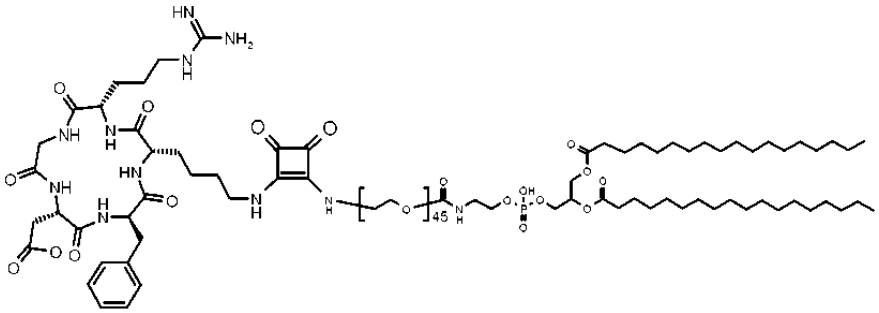


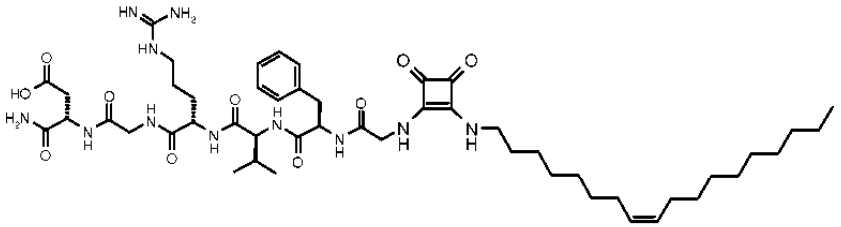
Cuando los grupos divalentes mencionados más arriba como posibles grupos L o I no son simétricos, se sobreentiende que el grupo Bio- o Bio-P1- puede ser injertado a la derecha o a la izquierda de dicho grupo covalente. Por ejemplo, cuando se escribe que L representa un grupo -COO-, el ligando de direccionamiento puede ser Bio-COO-Lipo o Lipo-COO-Bio.

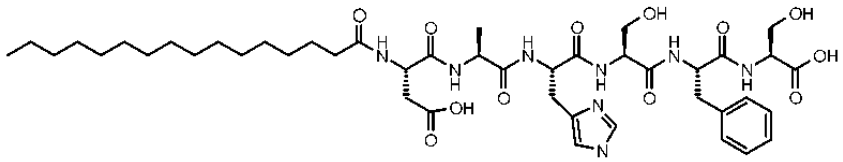
Se presentan algunos ejemplos de ligandos de direccionamiento anfifílicos (a continuación: péptidos, derivados del ácido fólico, derivados de la naftiridina), que se han hecho anfifílicos mediante el anclaje a la superficie externa de la nanogotita.

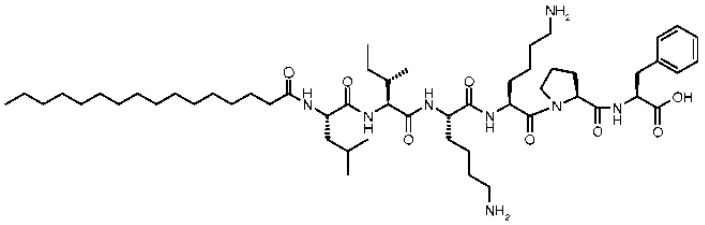
La solicitud presenta algunos ejemplos ilustrativos de su síntesis.

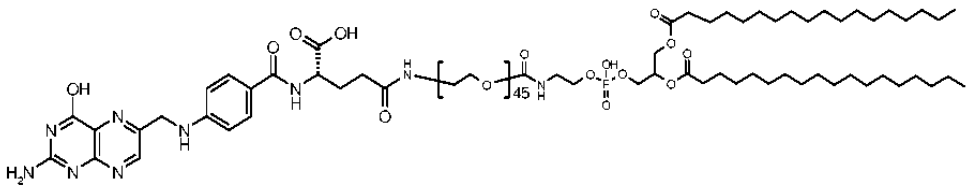


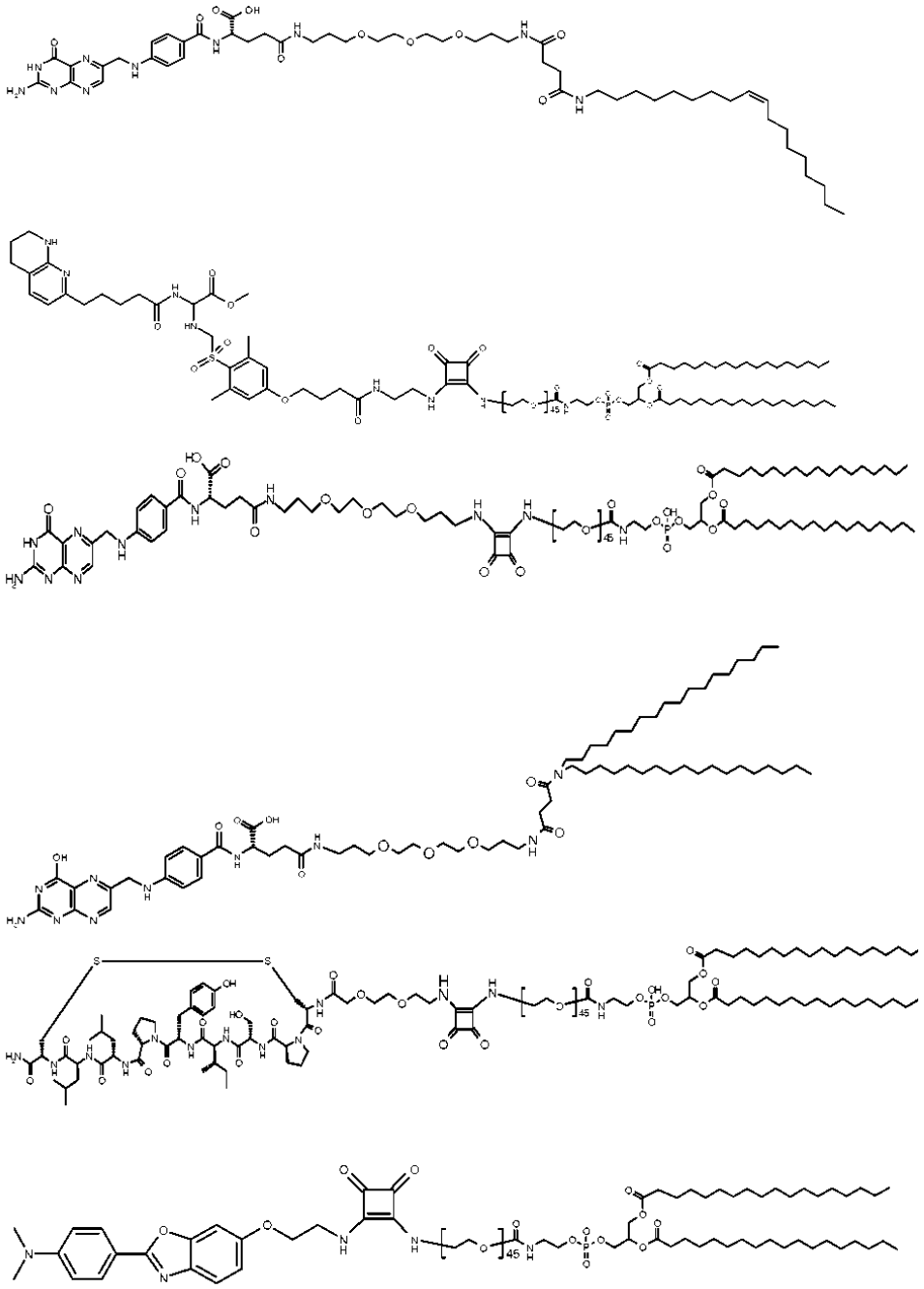












Cómo se explica en la solicitud, las composiciones se utilizan esencialmente para la obtención de imágenes diagnósticas. No obstante, se pueden preparar nanoemulsiones que comprenden además los ligandos que comprenden un agente terapéutico. Las nanogotitas comprenderán entonces por un lado un ligando de direccionamiento anfifílico para alcanzar el objetivo biológico (la zona patológica), y por otro lado un ligando que comprende un agente terapéutico para el tratamiento terapéutico. La invención concierne así también a las composiciones descritas anteriormente, que comprenden un agente terapéutico, para su utilización en el tratamiento de enfermedades, particularmente cancerosas, neurodegenerativas, vasculares.

Según algunos modos de realización, la mezcla de tensioactivos comprende además al menos un agente de furtividad anfifílico, ventajosamente un derivado de PEG, un derivado de gangliósido (residuos osídicos esterificados típicamente con ácido siálico o NAC), un polisacárido (particularmente dextrano o uno de sus derivados conocidos). Estos agentes de furtividad son integrados sin alterar la afinidad de la nanogotita por el objetivo biológico.

Procedimiento de preparación de una nanoemulsión según la invención

Según otro aspecto, la invención concierne a un procedimiento de preparación de una composición tal como la definida más arriba, que comprende las etapas de:

a) solubilización de las partículas magnéticas (p) a base de un compuesto de hierro, recubiertas por uno o varios ácidos grasos C8-C22, en un aceite que comprende al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80, un 90, un 95, un 97 % en peso de glicéridos de ácidos grasos saturados C6-C18, ventajosamente C6-C14, y muy ventajosamente C6-C10, para formar una fase lipídica,
b) mezcla de la fase lipídica obtenida a la etapa a) y de una fase acuosa que comprende la mezcla de los tensioactivos, de manera que se formen nanogotitas,
c) recuperación de la nanoemulsión obtenida.

Preferentemente, la solubilización de la etapa a) es total. Por “solubilización total”, se entiende que después de la mezcla del aceite y de las partículas magnéticas (p) a base de un compuesto de hierro, previamente recubiertas por uno o varios ácidos grasos C8-C22, habría un ausencia de un agregado visible a simple vista en la fase lipídica formada.

Las partículas magnéticas (p) a base de un compuesto de hierro son recubiertas por uno o varios ácidos grasos C8-C22, por ejemplo, mediante la dilución de las partículas magnéticas en una solución alcalina (una solución de sosa (NaOH) a $5 \cdot 10^{-3}$ M, por ejemplo) y la adición de un amplio exceso (de entre 50 y 300, preferiblemente de entre 50 y 150 equivalentes) de uno o varios ácidos grasos C8-C22, tales como los descritos más arriba, que conduce a una precipitación de las partículas magnéticas.

La etapa a) de solubilización en el aceite de las partículas magnéticas (p) se lleva a cabo generalmente mediante una agitación a una temperatura superior a 60 ºC, preferiblemente superior a 80 ºC, aún más preferiblemente superior a 90 ºC, véase superior a 100 ºC.

La agitación durante la etapa de solubilización a) puede realizarse durante entre 10 y 40 horas, preferiblemente durante entre 15 y 30 horas, aún más preferiblemente durante 24 horas.

La mezcla de tensioactivos (lípido anfifílico, ligando de direccionamiento anfifílico y lípido pegilado, dado el caso) se añade generalmente a la fase acuosa (definida más arriba) mediante una dispersión, por ejemplo, con la ayuda de ultrasonidos, denominado también mediante sonicación.

Durante la etapa b), la nanoemulsión se obtiene ventajosamente mediante una emulsificación en un microfluidificador. La nanoemulsión así obtenida se utiliza entonces para la administración al paciente, dado el caso después de la incorporación de diversos aditivos farmacéuticos. Igualmente puede ser filtrada. Las nanoemulsiones obtenidas pueden ser liofilizadas, dado el caso, con la utilización de agentes antiaglutinantes.

Típicamente, se obtienen las siguientes características (obtenidas gracias a los métodos analíticos indicados al comienzo de la parte de Ejemplos, a continuación), pudiendo variar según las composiciones precisas de las emulsiones y su procedimiento de preparación:

- diámetro hidrodinámico (Z ave): de entre 150 y 220 nm, preferiblemente de entre 185 y 200 nm, aún más preferiblemente de entre 190 y 200 nm.
- índice de polidispersidad (Poly σ): de entre 0,01 y 0,1, preferiblemente de entre 0,03 y 0,08, aún más preferiblemente de entre 0,04 y 0,06.
- concentración de hierro (mmoles/litro de composición): de entre 100 y 300 preferiblemente de entre 120 y 200, aún más preferiblemente de entre 140 y 160.
- concentración de las gotitas en la nanoemulsión: de entre 80 y 200 nM, preferiblemente de entre 90 y 120 nM.
- relaxividad a 60 MHz (medio acuoso / 37 ºC)
    - r1 (mM^{-1} (Fe) s^{-1}): de entre 0,5 y 4, preferiblemente de entre 0,8 y 2, aún más preferiblemente 1.
    - r2 (mM^{-1} (Fe) s^{-1}): de entre 180 a 250, preferiblemente de entre 190 a 220, aún más preferiblemente de 210.
- osmolalidad: 280 - 320 mOsm/kg.
- estabilidad en una solución farmacéutica: superior a 6 meses.
- estabilidad en Seronorm™ (estabilidad biológica): superior a 24 h.
- número de partículas magnéticas por gotita de nanoemulsión: más de 90, preferiblemente más de 100, aún más preferiblemente más de 140.
- número de ligandos de direccionamiento anfifílico por gotita de nanoemulsión: entre 100 y 5000, particularmente entre 500 y 4000, ventajosamente entre 1800 y 3500, aún más ventajosamente entre 2500 y 3500.

De forma global, las nanoemulsiones para RMN obtenidas:

- tienen una eficacia superior a la de las emulsiones conocidas actualmente en términos de la señal para la obtención de imágenes clínicas (de RMN en particular) en el paciente,
- tienen una afinidad con respecto a los receptores a los que se dirigen superior a la de otras emulsiones no conformes a la presente invención,
- son capaces de incorporar los ligandos de direccionamiento de zonas patológicas en la superficie de las nanogotitas, en una cantidad apropiada y sin ninguna pérdida de afinidad molesta para su objetivo biológico,
- son suficientemente estables químicamente como para ser producidas y conservadas durante un largo tiempo (entre varios meses y varios años), en particular sin problemas de coalescencia entre las propias gotitas,
- son suficientemente estables *in vivo* como para no ser degradadas,
- están adaptadas en el plano de la farmacocinética,
- están realizadas con aceites recogidos en la farmacopea.

Producto de contraste que comprende la composición de nanoemulsión según la invención

Según otro aspecto, la invención concierne a un producto de contraste, preferiblemente para RMN, que comprende la composición de nanoemulsión tal como la descrita más arriba.

El producto de contraste es administrado preferiblemente por vía intravascular, según el paciente examinado, por ejemplo, para una composición que presenta una concentración de hierro de 145 mM, a razón de entre 50 y 180, preferiblemente de entre 80 y 120, muy preferiblemente de entre 90 y 110, aún más preferiblemente de 100 µmoles de hierro por kg de paciente, lo que se corresponde con unos volúmenes de entre 0,34 y 1,24, preferiblemente de entre 0,55 y 0,83, aún más preferiblemente de 0,7 ml de producto de contraste por kg de paciente.

El producto de contraste puede ser formulado con la ayuda de los aditivos conocidos recordados, por ejemplo, en el documento US 6,010,682, particularmente para una administración mediante inyección intravenosa. Particularmente, puede comprender agentes espesantes, sacáridos o polisacáridos, glicerol, dextrosa, cloruro de sodio y/o antimicrobianos.

Utilización de las composiciones de nanoemulsiones y de los productos de contraste según la invención

La invención concierne también a las composiciones descritas anteriormente para su utilización en el diagnóstico de enfermedades, particularmente cancerosas, inflamatorias, neurodegenerativas o vasculares, particularmente cardiovasculares.

La invención concierne a un método de obtención de imágenes de cuerpo entero o de una parte del cuerpo de un individuo que comprende que comprende una etapa de obtención de una o varias imágenes de cuerpo entero o de una parte del cuerpo de un individuo mediante una técnica de obtención de imágenes médicas, en la que dicho cuerpo entero con dichas partes de un cuerpo de un individuo comprenden la composición definida más arriba o el producto de contraste definido más arriba (preferiblemente en una cantidad eficaz) y en la que la o las imágenes están asociadas a partículas magnéticas a base de un compuesto de hierro contenidas en la composición definida más arriba o en el producto de contraste definido más arriba.

Según un modo de realización, el método de obtención de imágenes según la invención no incluye una etapa de inyección o de administración invasiva de la composición o del producto de contraste al individuo.

Según otro modo de realización, el método de obtención de imágenes según la invención comprende una etapa previa de inyección o de administración de la composición o del producto de contraste al individuo, preferiblemente una inyección por vía intravascular.

Está método permite una adquisición dinámica visualizando las fases de levantamiento en el transcurso del tiempo de la zona de interés y de *wash out*.

Los datos clínicos obtenidos podrán permitir ayudar a un médico a determinar si el paciente debe recibir o no un tratamiento terapéutico dado, por ejemplo, un tratamiento antiangiogénico.

Así, la invención concierne igualmente a:

- la composición cuyo ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un ligando de un objetivo asociado a la angiogénesis tal como el definido más arriba, o
- el producto de contraste que comprende una composición cuyo ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un ligando de un objetivo asociado a la angiogénesis tal como el definido más arriba,

destinada a ser utilizada en un método de evaluación "*in vivo*" de la angiogénesis en un individuo que comprende las etapas que consisten en:

a) obtener una o varias imágenes de cuerpo entero o de una parte del cuerpo de un individuo mediante una técnica de obtención de imágenes médicas, en la que dicho cuerpo entero o dichas partes del cuerpo de un individuo comprenden:

- la composición cuyo ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un ligando de un objetivo asociado a la angiogénesis tal como el definido más arriba, o
- el producto de contraste que comprende una composición cuyo ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un ligando de un objetivo asociado a la angiogénesis tal como el definido más arriba,

y en la que la o las imágenes están asociadas a las partículas magnéticas a base de un compuesto de hierro contenidas en dicha composición o en dicho producto de contraste;

b) evaluar la angiogénesis en el cuerpo entero o en la parte del cuerpo del individuo a partir de la o las imágenes obtenidas a la etapa a).

El método de obtención de imágenes definido más arriba también puede permitir la evaluación de la eficacia de un tratamiento, particularmente de un tratamiento antiangiogénico, preferiblemente de un tratamiento anticanceroso, y de forma aún más preferente de un tratamiento anticanceroso antiangiogénico (del tipo Avastin®, por ejemplo).

Así, la invención concierne igualmente a:

- la composición cuyo ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un ligando de un objetivo asociado a la angiogénesis tal como el definido más arriba, o
- el producto de contraste que comprende una composición cuyo ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un ligando de un objetivo asociado a la angiogénesis tal como el definido más arriba,

para su utilización en un método de evaluación de la eficacia de un tratamiento antiangiogénico que comprende las etapas que consisten en:

a) evaluar la angiogénesis en un individuo que ha recibido un tratamiento antiangiogénico, mediante el método definido más arriba;
b) comparar la angiogénesis evaluada según la etapa a) con una referencia de la angiogénesis en el individuo antes del tratamiento antiangiogénico.

La referencia puede ser el nivel previo a cualquier tratamiento antiangiogénico en el individuo (nivel de base) o a una etapa anterior del tratamiento terapéutico.

El tratamiento antiangiogénico es considerado como eficaz si se observa una disminución o un mantenimiento de la angiogénesis con respecto a la referencia, ineficaz si se observa un aumento de la angiogénesis con respecto a la referencia.

El método, según un modo de realización, no incluye una etapa de administración de un tratamiento antiangiogénico.

En un modo de realización, el método de evaluación de la eficacia de un tratamiento antiangiogénico definido más arriba comprende:

a) la evaluación de la angiogénesis en un individuo para la determinación del nivel de base mediante el método definido más arriba,
b) la administración de un tratamiento antiangiogénico a dicho individuo, preferiblemente mediante una inyección por vía intravascular,
c) la evaluación de la angiogénesis después de dicho tratamiento en el individuo para la determinación del nivel después del tratamiento mediante el método definido más arriba,
d) la comparación entre el nivel después del tratamiento y el nivel de base.

En los métodos definidos más arriba, las imágenes se obtienen preferiblemente mediante una resonancia magnética nuclear (o RMN) o imágenes de MPI (*Magnetic Particle Imaging*).

Por “cantidad eficaz” se entiende una cantidad de composición de nanoemulsiones o de producto de contraste que comprende esta composición de nanoemulsión, que permite la obtención de las imágenes mediante la técnica de obtención de imágenes médicas utilizada.

Los ejemplos que figuran a continuación se presentan a título ilustrativo de la invención.

Descripción de las figuras:

Figura 1: esquema de la estructura de un ejemplo de nanoemulsión según la invención.
1 designa una partícula magnética (p) a base de un compuesto de hierro y recubierta por uno o varios ácidos grasos C8-C22.
2 designa la fase lipídica que comprende el aceite según la invención.
3 designa un lípido anfifílico.
4 designa un lípido pegilado.
5 designa un ligando de direccionamiento anfifílico (o “biovector” anfifílico).
3, 4 y 5 designan los compuestos utilizados como tensioactivo en la nanoemulsión.

Figura 2: valor medio de R2* del tumor extraído de la placa R2*, una hora después de la inyección.

En un color gris oscuro rayado aparecen los valores medios de los R2* obtenidos y sus desviaciones típicas para los tumores una hora después de la inyección, bien de la emulsión E1, bien de su control E1T.

En blanco aparecen los valores medios de los R2* obtenidos y sus desviaciones típicas en la zona contralateral al tumor.

Los triángulos negros se corresponden con los puntos R2* de los tumores.

EJEMPLOS:

Generalidades

En lo sucesivo, las abreviaturas M, M teórica, N y M/z, ES^+, ES^-, kD y COM, Z ave, XRD, Poly σ, TA, m_{obt} y Rdt tienen los siguientes significados:

M: concentración molar (mol/l).
M teórica: masa molecular teórica.
N: normalidad.
M/z: masa sobre carga determinada mediante una espectrometría de masas.
ES^+: electroionización en modo positivo.
ES": electroionización en modo negativo.
kD: unidad de masa molecular (kiloDalton)
CCM: cromatografía en capa fina
Z ave: diámetro hidrodinámico medido mediante una PCS en modo unimodal
XRD = diámetro de la partícula (p) estimado mediante una difractometría de rayos X
Poly σ: polidispersidad medida mediante una PCS.
TA: temperatura ambiente
m_{obt}: masa del producto obtenido
Rdt: rendimiento

Medición del hierro total:

La concentración de hierro de la composición de la nanoemulsión se mide mediante una espectrometría de emisión atómica de plasma con acoplamiento inductivo (ICP-AES, *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy),* después de una mineralización en HNO_3 al 65 % (equipo Optima™ 8300DV de Perkin Elmer o equivalente).

Tamaño de las partículas / gotitas:

Diámetro hidrodinámico de las gotitas de nanoemulsión (Z ave):

Determinado mediante una PCS (aparato Malvern Nano ZS, láser a 633 nm a 173 º) sobre una muestra diluida a ~ 1 milimolar con agua PPI filtrada a través de 0.22 µm.
PCS = *Photon Correlación Spectroscopy* = técnica por difusión de la luz dinámica - Referencia: R. Pécora en *J. of Nano. Res.* (2000), 2, págs. 123-131.

Diámetro de la partícula magnética (p)

Determinado mediante una difractometría de rayos X (o XRD de “*X Ray difraction*”) con ayuda de un detector curvo INEL CPS-120. El soporte lógico del tratamiento y la medición es Fityk®, las imágenes son modeladas según los "*split Pearson VII*".

Análisis estructurales:

Para el análisis cualitativo, por espectrometría de masas MALDI-TOF: espectrómetro de masas acoplado a una fuente de ionización láser asistida por una matriz (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) y un analizador del tiempo de vuelo (TOF, *Time-of-Flight Mass Spectrometry*). La muestra se diluye inicialmente a 1/50 en tetrahidrofurano (THF), después la mezcla se diluye a 1/10 en la matriz (DHB = ácido 2,5-dihidroxibenzoico a 20 mg/ml en THF) antes del análisis mediante el Voyager DE STR de PerSeptive Biosystems o equivalente.

Para el análisis cuantitativo, por LC/UV/Corona (cromatografía liquida con un instrumento UltiMate3000 (Dionax) acoplado a un detector Corona (Dionax)).

Mediciones de la relaxividad:

Los tiempos de relajación T1 y T2 se han determinado mediante los procedimientos habituales con un aparato Minispec 120 (Bruker) a 20 Mhz (0,47 T) y a 37 ºC. El tiempo de relajación longitudinal T1 se ha medido utilizando una secuencia de inversión Recuperación, y el tiempo de relajación transversal T2 se ha medido mediante una técnica de CPMG.

Las velocidades de relajación R1 (= 1/T1) y R2 (= 1/T2) han sido calculadas para las diferentes concentraciones de metal total (variando entre $0,1 \cdot 10^{-3}$ y $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) en una solución acuosa a 37 ºC. La correlación entre R1 o R2 en función de la concentración es lineal, y la pendiente representa la relaxividad r1 (R1/C) o r2 (R2/C) expresadas en (1 / segundo) x (1 / mmol/l), es decir, ($mM^{-1} \cdot s^{-1}$).

Medición del ligando de direccionamiento anfifílico RGD:

La medición del ligando de direccionamiento anfifílico se ha efectuado mediante una espectrometría de masas MALDI-TOF: espectrometría de masas acoplada a una fuente de ionización láser asistida por una matriz (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation)* y un analizador del tiempo de vuelo (TOF, *Time-of-Flight Mass Spectrometry).* La muestra se ha diluido previamente a 1/50 en tetrahidrofurano (THF), después la mezcla se ha diluido a 1/10 en la matriz (DHB = ácido 2,5-dihidroxibenzoico a 20 mg/ml en THF) antes del análisis mediante el Voyager DE STR de PerSeptive Biosystems o equivalente.

Ejemplo 1: preparación de las nanopartículas magnéticas (p) recubiertas de ácido oleico

1. Síntesis de las nanopartículas magnéticas a base de hierro

Se ha introducido una solución de 36 g (0,181 mol) de $FeCl_2 \cdot 4\ H_2O$, 20 ml de HCl al 37 % en 150 ml de H_2O en una mezcla constituida por 3 litros de agua y 143 ml (0,302 mol) de $FeCl_3$ al 27 %. Se han introducido 250 ml de NH_4OH al 25 % rápidamente con una fuerte agitación. El conjunto se ha agitado 30 min. Los líquidos se han eliminado por decantación magnética. El ferrofluido se ha lavado 3 veces seguidas con 2 litros de agua.

El ferrofluido se ha puesto en agitación 15 min con 200 ml de HNO_3 [2 M], el sobrenadante se ha eliminado por decantación magnética. El ferrofluido nítrico se ha llevado a reflujo con 600 ml de agua y 200 ml de $Fe(NO_3)_3$ [1 M] durante 30 min. El sobrenadante se ha eliminado por decantación magnética.

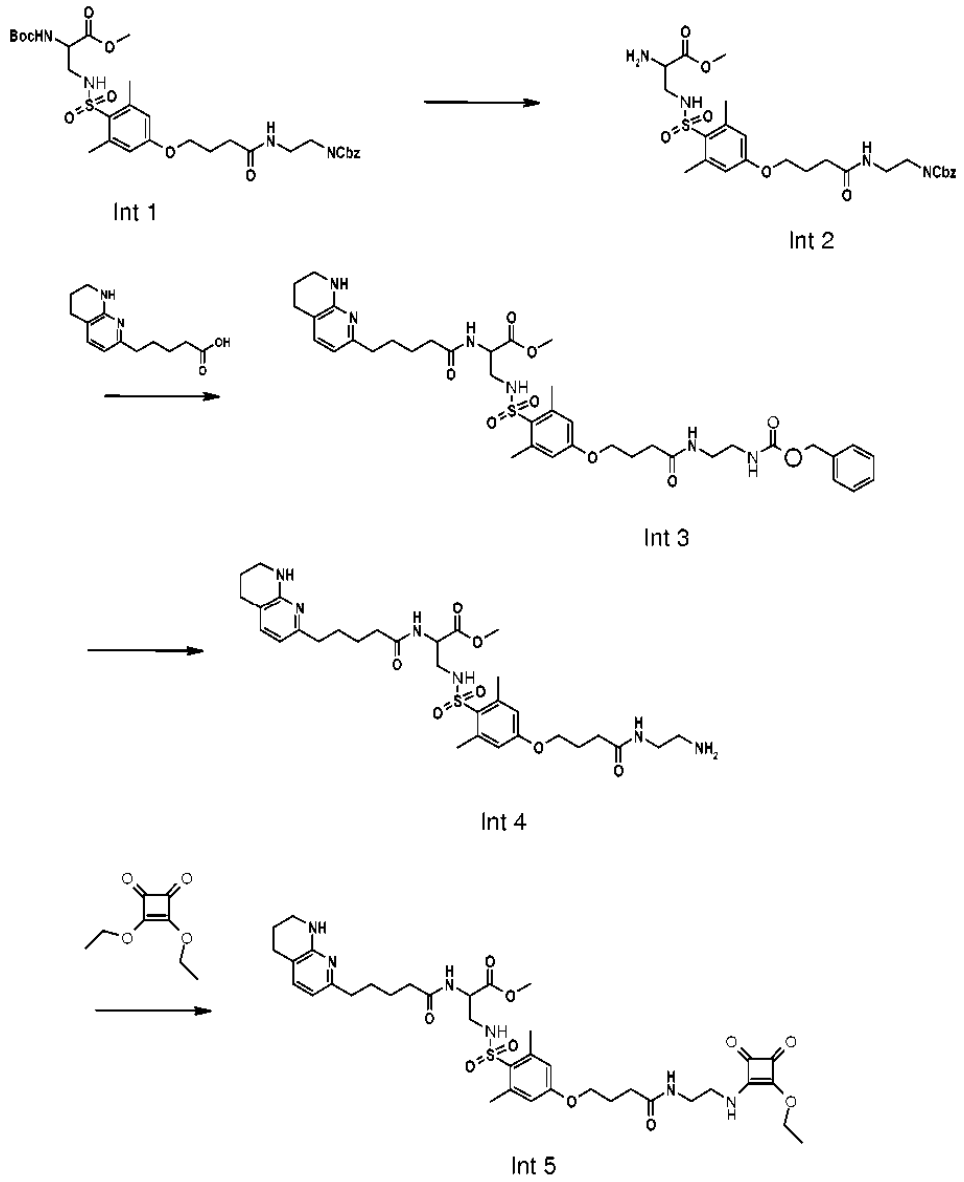
El ferrofluido nítrico se ha lavado 3 veces con 3 litros de acetona, después se ha recogido con 400 ml de agua. La solución se ha evaporado a vacío hasta un volumen final de 250 ml.

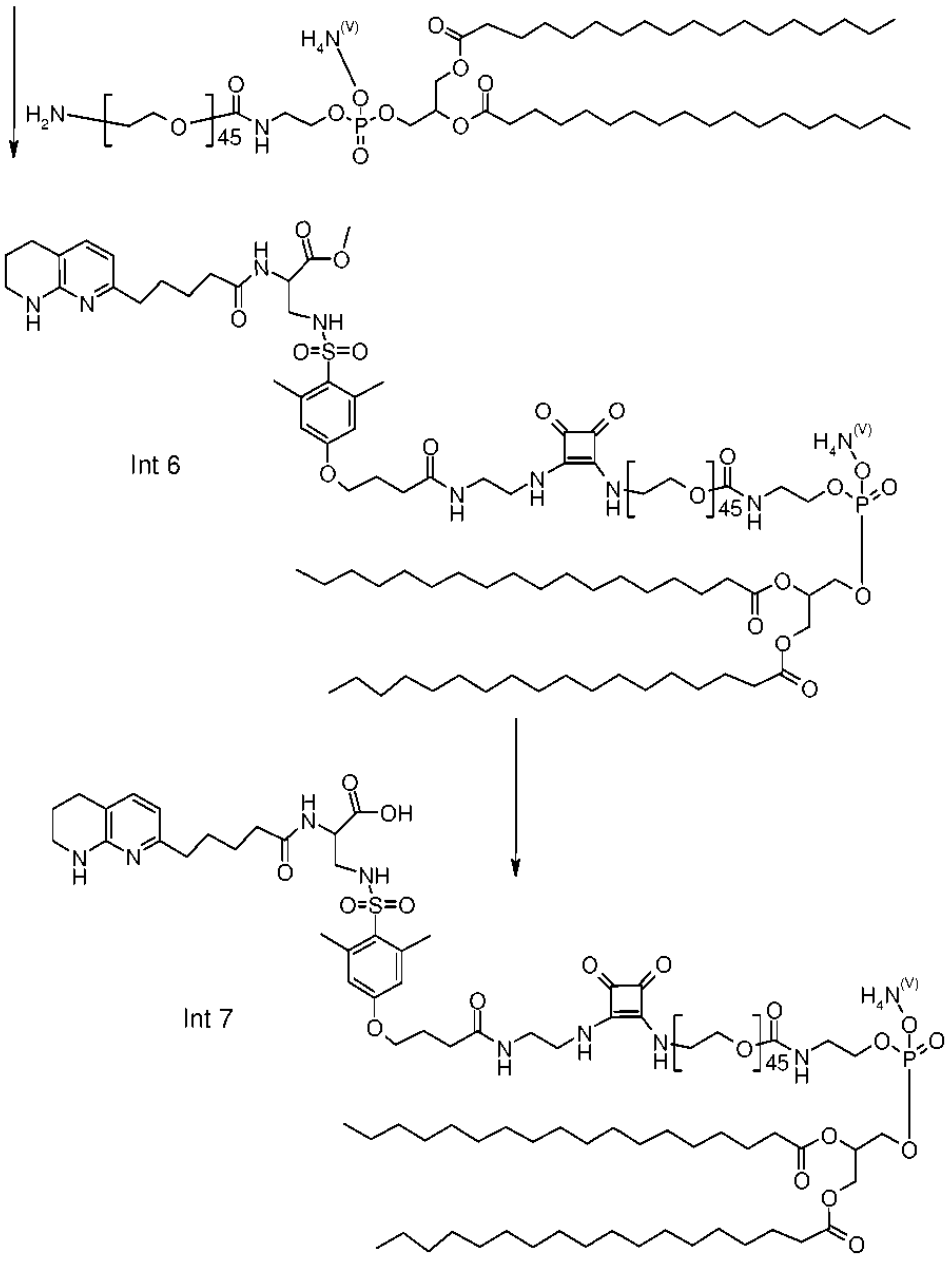
Concentración M/l	Z ave nm	Poly σ	Diámetro por XRD
4,85	40 nm	0,22	8,0 nm

2. Revestimiento ("*coating*") de las nanopartículas magnéticas a base de hierro se han diluido 46 ml de la solución de nanopartículas magnéticas ([Fe] = 1,14 M/l, es decir, $7,24 \cdot 10^{-4}$ M) preparada como se indica más arriba en 500 ml de NaOH ($5 \cdot 10^{-3}$ M). A esta solución se han añadido 60 g de ácido oleico, es decir, $212 \cdot 10^{3}$ M (292 equivalentes molares). El conjunto se ha agitado rápidamente durante 1 h a la temperatura ambiente, después se ha puesto en decantación sobre placas imantadas. El floculado se ha lavado tres veces con 500 ml de acetona, si no se ha solubilizado a continuación en el aceite, y se ha almacenado en una suspensión de acetona.

Ejemplo 2: síntesis de un ligando de direccionamiento anfifílico cuyo ligando de direccionamiento es un peptidomimético de RGD; ejemplo de compuesto de naftiridina

Esquema de síntesis:





Etapa 1:

Se ha disuelto 1 g del Int 1 en 5 ml de CH_2Cl_2. Al medio se han añadido 5 ml de TFA. Se ha dejado 3 h a la TA, después se ha evaporado a sequedad. Se ha recogido en 2 x 40 ml de éter iso, después se ha recuperado un aceite que se ha secado mediante una evaporación.
m_{obt}, = 0,8 g; Rdt = 90 %; $C_{26}H_{36}N_{408}S$; MALDI-TOF: modo positivo, m/z = 564

Etapa 2:

Reactivos	Cantidades	Disolventes
Int 2	M = 0.564 g (0.001 ml)	DMF, V = 10 ml
Ácido tetrahidronaftiridin-2-pentanoico	M = 0.235 g (0.00023 ml)	
HOBT	M = 0.131 g	
DIPEA	M = 0.286 g	
EDCI	V = 0.2 ml	
Int. 3		

Se ha disuelto el ácido en DMF, después se ha introducido el HOBT y la EDCI y se ha dejado 1 h bajo argón.

Se ha añadido el int 2 y la DIPEA; se ha dejado 18 h a la TA bajo argón. Después de la evaporación, el aceite se ha recogido en CH_2Cl_2 y se ha lavado con una solución diluida de Na_2CO_3; después de la evaporación, se obtiene un aceite.
m_{obt} = 0,600 g; Rdt = 77 %; $C_{39}H_{52}N_6O_9S$; M/Z = 780

Etapa 3:

Reactivos	Cantidades	Disolventes
Int 3	M = 0.6 g (0.0077 ml)	MeOH, V = 30 ml
Pd/C al 10 %	1 punta de espátula	
Int. 4		

Se ha disuelto el int 3 en metanol y se ha introducido la solución en el autoclave de 125 ml; se ha añadido el catalizador y se ha dejado 3 h bajo presión de hidrógeno (P = 5 bar) a 30 ºC.

Después de la filtración del catalizador y de una evaporación, se ha obtenido un aceite que se ha lavado con 50 ml de éter iso.
m_{obt} = 0,300 g; Rdt = 60 %; $C_{31}H_{46}N_6O_7S$; HPLC = 90 %; M/Z = 646

Etapa 4:

Reactivos	Cantidades	Disolventes
Int 4	M = 0.300 g (0.000442 ml)	DMSO, V = 10 ml TEA, V = 0.25 ml
Escuarato de dietilo	M = 0.286 g	
Int. 5		

Se ha disuelto el int 4 en DMSO, después se ha añadido el escuarato de dietilo y algunas gotas de TEA; el producto se deja 1 noche a la temperatura ambiente bajo argón, después se vierte en éter: entonces se obtiene una pasta de color blanco.
m_{obt} = 0,330 g; Rdt = 97 %; $C_{37}H_{50}N_6O_{10}S$; M/Z = 770

Etapa 5:

Reactivos	Cantidades	Disolventes
Int. 5	M = 0.330 g (0.00043 ml)	DMSO, V = 10 ml
DSPE-PEG_{2000}-NH_2	M = 1.07 g (0.000385 ml)	
Solución saturada de Na_2CO_3	M = 0.131 g	
Int. 6 e Int 7		

Se ha disuelto el int 5 y la DSPE-PEG2000-NH_2 en el DMSO, se han añadido 3 gotas de la solución saturada de Na_2CO_3 y 2 ml de H_2O. El medio de reacción se ha agitado a la temperatura ambiente durante 48 h y se ha precipitado en éter. La pasta obtenida se ha solubilizado en metanol y después se ha purificado sobre sílice, eluyente CH_2Cl_2. Después de haber reunido y evaporado las fracciones conformes: obtención de cristales.

Nota: el producto obtenido está en la forma ácida por la ruptura del éster de metilo por la presencia de Na_2CO_3. Por lo tanto, se ha obtenido directamente el Int 7.
m_{obt} = 0,170 g; Rdt = 17 %; $C_{166}H_{308}N_9O_{63}PS$; M/Z = 3500

Ejemplo 3: síntesis de una emulsión que contiene las nanopartículas magnéticas (p) del ejemplo 1 y el ligando de direccionamiento anfifílico del ejemplo 2

Las nanopartículas magnéticas a base de un compuesto de hierro (sintetizadas en el Ejemplo 1) se han solubilizado totalmente en 60 g de aceite Miglyol® 812 a 92 ºC durante 20 h. La solubilización total de dichas nanopartículas magnéticas se ha observado visualmente, constatando la ausencia de un agregado visible a simple vista. Después de volver a la temperatura ambiente, la solución se ha almacenado o se ha utilizado para elaborar las emulsiones.
Los tensioactivos (278,4 mg de Egg PC (Lipoid GmbH), 55,8 mg de DSPE-PEG-2000 (Lipoid GmbH) y 27,9 mg del ligando de direccionamiento anfifílico del ejemplo 2) se han dispersado con ayuda de ultrasonidos en 20 ml de agua al 2,5 % m/m de glicerol.

Se han añadido 5 g de aceite Miglyol® 812 que comprende las nanopartículas y se ha preemulsionado en la “Ultra-Turrax®” a una velocidad de 25.000 rpm (T 25).

El volumen de la preemulsión, antes de la microfluidificación, era de aproximadamente 25 ml. La preemulsión se ha finalizado a continuación en el microfluidificador (Microfluidics M-110-S) reciclando durante 3 a 4 minutos a una presión de aproximadamente 1200 bar, lo que se corresponde con aproximadamente 25 pases en la celda de emulsión.

La emulsión se ha filtrado a través de 0,45 µ. El volumen emulsión recuperado era de aproximadamente 22 ml.

Características de la nanoemulsión obtenida:

Parámetros medidos	Resultados
Concentración de gotitas en la nanoemulsión	88 nM
Número de partículas magnéticas por gotita de aceite	150 es decir, aproximadamente 10^6 Fe (una partícula magnética de maghemita de 8 nm de diámetro posee aproximadamente 10.000 moléculas de Fe)
Concentración de Fe (mM)	143
Número de ligandos de direccionamiento anfifílico (peptidomimético RGD, compuesto del ejemplo 2) por gotita de nanoemulsión	3500
Diámetro hidrodinámico (Z ave)	190 nm

Esta emulsión se denomina E1 en los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 4: mediciones de la relaxividad

Se han realizado mediciones de la relaxividad con relaxómetros Minispec® (Bruker Optics, Alemania) a 60 MHz.

La solución madre se ha diluido 5 puntos del intervalo con agua milli Q con el fin de poder estudiar la linealidad de las velocidades de relajación en función de la concentración. El intervalo de concentraciones era de entre 0.12 y 1.15 mM de Fe.

La medición de la relaxividad se ha efectuado a 37 ºC. La medición del Fe se ha realizado mediante una espectroscopia de emisión atómica en todos los puntos del intervalo.

Los resultados eran los siguientes:

Emulsión	60 MHz	
	r1 ($mM^{-1}s^{-1}$)	r2 ($mM^{-1}s^{-1}$)
E1 (según la invención)	1	210

Ejemplo 5: determinación de la estabilidad de la emulsión

Se ha ensayado la estabilidad de la emulsión E1 según el ejemplo 3. Se han realizado mediciones del tamaño mediante PCS a los 3, 6 y 9 meses. Los resultados se proporcionan en la siguiente tabla.

T 0		t = 3 meses		t = 6 meses		t = 9 meses	
Z ave (nm)	Poly σ	Z ave (nm)	Poly σ	Z ave (nm)	Poly σ	Z ave (nm)	Poly σ
193	0.059	192	0.043	191	0.06	187	0.064

Ejemplo 6: prueba de toxicidad de la emulsión E1 del ejemplo 3

Prueba *in vivo*

Se ha efectuado la siguiente prueba *in vivo*:

Con ratones “swiss” de aproximadamente 25 g: inyección IV caudal control manual a 2 ml/min en isovolumen (200 µl/animal, es decir, 6-7 ml/kg) y seguimiento durante 14 días: medición de los parámetros hepáticos, renales, hematológicos los J1, J2, J7 y J14, e histológicos de los órganos el J14.

A las 24 h: anestesia con isoflurano, extracción sublingual para análisis hematológico con el autómata MS4, y después exsanguinación con una jeringa + agujas heparinizadas.

Sintomatología: no hay mortalidad constatada ni signos clínicos perjudiciales a las dosis y los intervalos probados.

Hematología: análisis hematológico normal.

Evolución del peso de los ratones después de la inyección: no hay ninguna variación ponderal significativa.

Conclusión: después del análisis de los resultados obtenidos en la hematología, así como las diferentes observaciones clínicas y *post-mortem* de los ratones, puede concluirse la ausencia de un efecto tóxico de la nanoemulsión según la invención. El examen histológico de los órganos no ha mostrado ninguna anomalía tisular.

Ejemplo 7: medición de la afinidad (IC50) de las nanoemulsiones según la invención y de otras emulsiones no conformes (comparativas)

La medición de la IC50 de las emulsiones se ha realizado con células HUVEC que sobreexpresan la αvβ3 mediante mediciones de competición con Equistatina ^{125}I.

Materiales

- el tampón de *binding* tenía la siguiente composición: tris 20 mM (pH 7,4), $NaCl_2$ 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM, 0,5 % de BSA.

La Equistatina (PM = 5417,12 Da) ha sido proporcionada por Bacem en forma liofilizada (ref. H- 9010 — 100 µg). Se ha recogido a 1 mg/ml en agua / TFA al 0,1 %.

El precursor yodado, 125I-SIB, tiene una actividad de 2 mCi/mol. Les caractéristicas del tampón de fosfato y del tampón de borato eran las siguientes, respectivamente: 10 mM a pH 7,2 y 0.53 M a pH 8,5. La albumina bovina, el acetonitrilo y el ácido tricloroacético (TCA) fueron proporcionados por Sigma.

Al compuesto ^{125}I-SIB (1400 µCi - 551,8 MBq) recubierto en un tubo de vidrio se han añadido sucesivamente 15 µg de equistatina (15 µl) y el tampón de borato (0,2 M final). Esta mezcla de reacción se ha incubado 30 min con agitación, a la temperatura ambiente. El rendimiento del acoplamiento se ha determinado mediante una CCM en TCA al 10 %. La solución de marcaje se ha purificado a continuación mediante gel de filtración en una columna PD10-Séphadex G25 saturada previamente con PBS / BSA al 0,5 %.

- Las características de la solución de equistatina-^{125}ISIB eran las siguientes:

Cº = 1,245 µM - 6,751 µg/ml
AS = 16,02 µCi/µg

Los productos probados se presentan en la siguiente tabla.

Características de los productos probados

Producto	Concentración de gotitas en la nanoemulsión (nM)	Concentración de hierro (mM)
E1T	95	127
E1	88	143
E1’	83	140
E1”	82	138.6
E1’”	79	141.3
E2	209	150
E3	115	129
E3T	120	131

Intervalo de concentraciones probadas (en moles de gotitas de nanoemulsión)

Equistatina	entre 3 µM y 0,027 nM
E1T	entre 31.67 nM y 1 aM *
E1	entre 88 nM y 3 aM
E1’	entre 80 nM y 3 aM
E1”	entre 82 nM y 3 aM
E1’’’	entre 82 nM y 3 aM
E2	entre 69.67 nM y 1 fM
E3	entre 115 nM y 3 aM
E3T	entre 120 nM y 3 aM

*aM: significa attomolar (10^{-18} M)
**fM: significa femtomolar (10^{-15} M)

Las emulsiones E1T, E1', E1", E1'", E2, E3 y E3T han sido preparadas de la misma forma que la emulsión E1 según la invención, pero con las siguientes diferencias:

- E1T y E3T están desprovistas del ligando de direccionamiento anfifílico preparado según el protocolo del Ejemplo 2.
- E1', E1" y E1'" se diferencian principalmente de la emulsión E1 por su porcentaje de ligando de direccionamiento anfifílico preparado según el protocolo del Ejemplo 2.
- en E2, el aceite Miglyol® se ha sustituido por aceite de coco.
- en E3 y E3T, el aceite Miglyol® se ha sustituido por aceite de soja.

El aceite de coco entra en la definición de los aceites de la fase lipídica según la invención (% de ácidos grasos saturados C6-C18 del 14 %). El aceite de soja, por el contrario, no entra en esta definición (% de ácidos grasos saturados C6-C18 del 14 %).

El aceite de soja tiene la siguiente composición

Naturaleza del ácido graso de los glicéridos de ácidos grasos	Concentración (en %)
Ácido palmítico (C16:0)	10 %
Ácido esteárico (C18:0)	4 %
Ácido oleico (C18:1 n-9)	23 %
Ácido linoleico (C18:2 n-6)	51 %
Ácido alfa-linolénico (C-18:3 n-3)	7-10 %

- Las células HUVEC han sido cultivadas y amplificadas en medio EBM-2 enriquecido con aditivos EGM-2 (Lonza). Antes de la realización de las mediciones de afinidad, las células HUVEC se han tratado con PMA con el fin de generar una sobreexpresión de la integrina αvβ3. Después de este tratamiento, las células se han tripsinizado y se ha realizado una suspensión celular a $4 \cdot 10^6$ células/ml en *tampon binding*.

Métodos

La suspensión de las HUVEC se ha distribuido en una placa 96 pocillos de fondo cónico, a razón de $2 \cdot 10^5$ células en 50 µl en tampón de *binding*. Se han añadido cincuenta µl por pocillo de las soluciones de concentración creciente de equistatina o de los productos. El control positivo se ha realizado mediante la adición de tampón de *binding* sin competidor. El conjunto de los puntos de concentración se ha realizado por duplicado. La placa se ha incubado 2 h a la temperatura ambiente con agitación. Después, se han distribuido cincuenta µl de la solución de equistatina-^{125}I-SIB a 3 nM en cada pocillo, y la placa se ha incubado de nuevo 2 h a la temperatura ambiente con agitación. Las mezclas de reacción se han transferido a ampollas que contienen 200 µl de un cojín de densidad compuesto por parafina y ftalato de dibutilo (10/90). Los microtubos se han centrifugado a continuación a 12.000 rpm durante 3 min. Los tubos se han congelado finalmente en nitrógeno líquido, después se han seccionado con el fin de contar el sedimento celular y el sobrenadante con el contador gamma. Después se ha trazado una curva de competición en la que la fijación relativa de la equistatina^{125}I-SIB se ha determinado a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Radioactividad fijada en presencia del competidor (cpm)}}{\text{Fijación relativa de la equistatina-I}^{125}\text{-SIB}} = \text{Radioactividad de la muestra de control (cpm) x 100}$$

Los datos han sido analizados con la ayuda del programa informático GrafPad Prism® 5.0 que determina los valores de la IC_{50} para cada producto a partir de la curva de competición.

Resultados

Producto probado	% de ligando de direccionamiento anfifílico con respecto a la cantidad total de tensioactivo (mol/mol)	IC50 (pM de gotitas de la nanoemulsión)
Equistatina	-	700
Blanco E1T	0	861.000
E1 (según la invención)	2	2
E1' (según la invención)	1	4
E1" (según la invención)	0.2	12
E1'" (según la invención)	0.05	91
E2 (según la invención)	1	33,18
E3	1	2278
Blanco E3T	0	120.000

Se ha observado una muy buena afinidad por el receptor αvβ3 por parte de las emulsiones de USPIO según la invención. La afinidad de la emulsión E1 que comprende un 2 % (mol/mol con respecto a la cantidad total de tensioactivo) del ligando de direccionamiento anfifílico es netamente superior a la del blanco (E1T), de entre aproximadamente 4 y 5 log, y se presenta con una relación dosis/respuesta dependiente del contenido en ligando de direccionamiento anfifílico RGD.

Por el contrario, una emulsión cuya fase lipídica comprende un aceite no conforme al de la presente invención (en este caso, el aceite de soja), no proporciona un resultado satisfactorio en términos de afinidad. Es mucho menos afín que la equistatina.

Ejemplo 8: resultados de la RMN

A- Estudio de la especificidad de direccionamiento a un glioma

1. Material y método

a) Productos probados:

- Emulsión E1 ([Fe] = 143 mM)
- Emulsión E1T ([Fe] = 127 mM

b) Cultivo celular
Se han cultivado células U87-MG (línea celular de glioblastoma humano disponible en el ATCC) a 37 ºC en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO2 y un 95 % de aire en medio de cultivo DMEM con poca glucosa complementado por un 10 % de suero bovino neonatal inactivado y un 1 % de glutamina

Las células para la inyección intracerebral se han obtenido mediante una tripsinización de las células confluyentes y se han puesto en suspensión en PBS estéril a la concentración de 1.108 células por ml.

c) Inducción tumoral
El xenoinjerto se ha efectuado en ratones nmri/nude de seis semanas. El ratón se ha anestesiado con una inyección intraperitoneal de 10 ml/kg de una mezcla de Imalgène 1000, de Rompun al 2 % y de suero fisiológico. Después de una anestesia local con Xilovet y de una desinfección con Betadine, las células cancerosas se han inyectado en el núcleo caudado según una técnica conocida por el experto en la materia. A continuación, el animal se ha colocado en la incubadora hasta su despertar.

d) Inyecciones
Los productos que se van a probar se han inyectado a una dosis de 100 µmol/kg.

Para cada ratón se ha realizado un mapa tridimensional de alta resolución después de la inyección del producto. Esto ha permitido la obtención de un mapa de 46 a 69 minutos.

e) Obtención de imágenes *in vivo*
Se ha realizado una RMN 21 días después de la implantación de las células para detectar la presencia de un posible tumor en los animales inducidos, medir su tamaño y así seleccionar los animales que tienen un tumor lo suficientemente grande (es decir, un diámetro más grande de entre 3 y 5 mm) para experimentar una obtención de imágenes con la inyección de uno de los agentes de contraste atribuidos a los ratones antes de la inducción.

Se ha utilizado un resonador Bruker de 2.35 Tesla. Los ratones se han anestesiado con Isoflurano y se han mantenido a 37 ºC, después se les ha colocado una sonda de RMN en cuadratura (Rapid Biomed).

f) Tratamiento de las imágenes obtenidas y análisis cuantitativo
Las imágenes posteriores a inyección se han analizado gracias a un programa informático de tratamiento de imágenes (“*Post Processus Software*”). Los valores de R2* se han comparado con la parte sana entre los grupos de animales.

2. Resultados

	E1	E1T
Media de R2* tumor	22,3	16,2
Media de R2* contra	16,6	16,2
Desviación típica de R2* tumor	2,5	1,92
Desviación típica de R2* contra	1,2	0,62

Los resultados, igualmente presentados en forma de histograma en la figura 2, muestran un aumento de R2* en el tumor con respecto a la parte sana durante la inyección del producto específico.

De acuerdo con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, los datos siguen una ley normal, lo que permite la utilización de la *test-t* sobre las medias de los R2* en el tumor entre el producto específico y no específico. El resultado es significativo (p = 0,001487).

Los resultados obtenidos en el transcurso de este estudio van en el sentido de una especificidad del direccionamiento *in vivo* a la integrina αvβ3 con la emulsión E1 a 2.35 Tesla y de una diferenciación posible una hora después de la inyección del producto para una dosis de 100 µmol/kg.

La emulsión E1 permite, por lo tanto, la obtención de datos clínicos a partir de los cuales se puede concluir la presencia de un tumor en el cuerpo de un sujeto que ha recibido dicho producto.

B- Seguimiento del tratamiento antiangiogénico con Avastin®

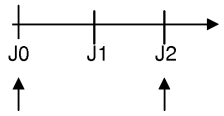
1. Material y método

a) Producto utilizado
Se ha utilizado la emulsión E1 (concentración de hierro = 143 mM) a la dosis de 200 µmol/kg, es decir, 1.4 ml/kg.

b) Obtención de imágenes *in vivo*
Se ha utilizado la misma técnica de obtención de imágenes que para el estudio de la especificidad del direccionamiento al glioma.

21 días después de la inducción, se han seleccionado los ratones según el criterio del tamaño del tumor. Aquellos para los cuales el eje más grande estaba comprendido entre 3 y 5 mm se han conservado (este es el tiempo J0).

Para 13 ratones (7 tratados con Avastin® y 6 con suero fisiológico), la cronología era la siguiente:



Avastin® E1

La obtención de imágenes con la emulsión E1 se ha realizado 2 horas después de la inyección.

c) Tratamiento de las imágenes obtenidas y análisis cualitativo
Se han analizado las imágenes 2 días después del tratamiento y 2 días después de la inyección, gracias a un programa informático de tratamiento de imágenes ("*Post Processus Software*"). Se ha realizado un análisis cualitativo de los mapas R2* sobre el conjunto del volumen tumoral. Cuatro lectores independientes que no conocían el tratamiento administrado han clasificado los animales en dos grupos ("tratados con Avastin®" o "tratados con suero fisiológico") sobre la base de los mapas R2*. A partir de los análisis de los 4 lectores se ha calculado la especificidad y la sensibilidad del método de seguimiento del tratamiento.

2. Resultados

Lector	1	2	3	4	Media
Sensibilidad (%)	86	71	86	71	79
Especificidad (%)	83	83	83	100	88

El modelo experimental ha sido bien validado, con una disminución de la expresión de alfa V beta 3 en los animales tratados con Avastin®.

Así se ha demostrado la eficacia de la emulsión E1 en el seguimiento de un tratamiento, y particularmente de un tratamiento antiangiogénico. Esta emulsión E1 permite un seguimiento más fiable del tratamiento que los otros "biomarcadores" que son el criterio RECIST, la difusión y el Ktrans (datos de comparación existentes pero no presentados).

REIVINDICACIONES

1. Composición de nanoemulsión de aceite en agua, que comprende:

- del 50 al 90 % en peso de fase acuosa,
- del 9,5 al 49,5 % en peso de fase lipídica en forma de nanogotitas que comprende:

  - un aceite, y
  - partículas magnéticas (p) a base de un compuesto de hierro, estando dichas partículas magnéticas (p) recubiertas por uno o varios ácidos grasos C8-C22,

- del 0,38 al 4,95 % en peso de una mezcla de tensioactivos en la interfase entre las fases acuosa y lipídica, la mezcla de tensioactivos:

  - comprende al menos un lípido anfifílico y al menos un ligando de direccionamiento anfifílico, y
  - representa del 4 al 10 % en peso con respecto al aceite de la fase lipídica, caracterizada por que el aceite de la fase lipídica comprende al menos un 70 % de glicéridos de ácidos grasos saturados C6-C18 y por que la composición comprende más de 100 mmoles de hierro por litro de composición.

2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que el ligando de direccionamiento anfifílico representa ente un 0,01 y un 10 % mol/mol de la cantidad total de tensioactivos.

3. Composición según la reivindicación 1 a 2, caracterizada por que los glicéridos de ácidos grasos saturados del aceite de la fase lipídica son triglicéridos de ácidos grasos saturados.

4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el aceite comprende glicéridos de ácidos grasos saturados cuyos ácidos grasos saturados están en las siguientes proporciones:

- C6-C18 > 70 % en peso, o
- C6-C14 > 70 % en peso o
- C8+C10 > 70 % en peso.

5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el aceite comprende una mezcla de diglicéridos y/o de triglicéridos de uno o varios ácidos grasos elegidos entre ácido caprílico, ácido cáprico, ácido linoleico, ácido succínico y uno de los derivados metilados, hidroperoxilados, hidroxilados, oxilados, epoxilados, metoxilados, halogenados, aminados, cianilados, nitrosilados o tiolados de uno de éstos.

6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las partículas magnéticas (p) comprenden o están constituidas por una ferrita elegida entre la maghemita, la magnetita y una mezcla de éstas.

7. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, en la que las partículas magnéticas (p) son superparamagnéticas.

8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que la mezcla de tensioactivos comprende entre un 80 y un 96,95 % mol/mol de lípido anfifílico, entre un 3 y un 15 % mol/mol de lípido pegilado y entre un 0,05 y un 5 % mol/mol de ligando de direccionamiento anfifílico.

9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que el lípido anfifílico es un fosfolípido.

10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que el ligando de direccionamiento anfifílico tiene la fórmula Bio - L- Lipo, en la que:

- Bio es el ligando de direccionamiento localizado en la superficie externa de las nanogotitas,
- Lipo es un grupo lipófilo que se inserta en el seno de la capa de tensioactivos
- L es un grupo de unión que une Bio y Lipo, elegido ventajosamente entre:

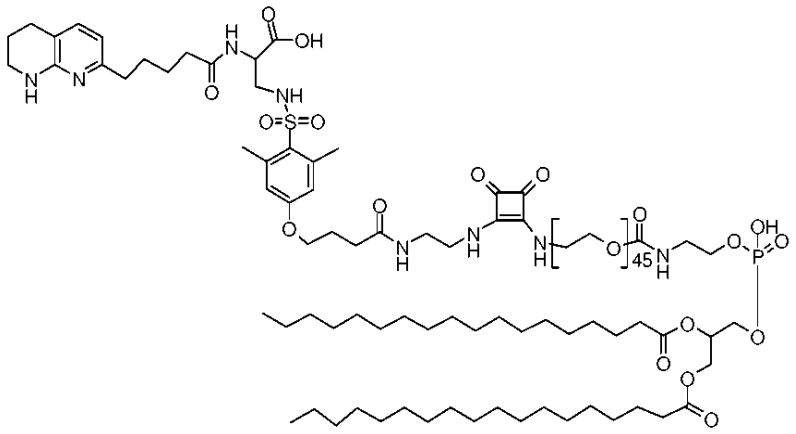
  ■ un enlace simple, escuarato, alquileno C1-6, PEG, por ejemplo, CH_2-$(CH_2$-O-$CH_2)_k$-CH_2 con k = entre 1 y 10, $(CH_2)_3$-NH, NH-$(CH_2)_2$-NH, NH-$(CH_2)_3$-NH, $(CH_2)_n$, $(CH_2)_n$-CO-, -$(CH_2)_n$NH-CO- con n = entre 2 y 10, $(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-CO- , $(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-NH-CO- con q = 1-10 y r = 2-10, $(CH_2)_n$-CONH- , $(CH_2)_n$-CONH-PEG, $(CH_2)_n$-NH-, -OOC-CH_2-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-COO-; -OOC-$(CH_2)_2$-CO_2-$(CH_2)_2$-OCO-$(CH_2)_2$-COO-; -OOC-CH(OH)-CH(OH)-COO-; -OOC-$(CH_2)_n$-COO-; -NH-$(CH_2)_n$-NH-, con n = 0-20; NH-$(CH_2)_n$-CO_2; NH-CH_2-$(CH_2$-O-$CH_2)_n$-CO_2 con n = entre 1 y 10,
  ■ P1-I-P2, siendo P1 y P2 elegidos independientemente entre O, S, NH, un enlace simple, CO_2, NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH, SO_2NH-, NHSO_2-, escuarato

con l = alquileno, alcoxialquileno, polialcoxialquileno (particularmente PEG), alquileno interrumpido por uno o varios escuaratos, por uno o varios arilos, ventajosamente fenilos, o por uno o varios grupos elegidos entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, -(CO)NH-, -O(CO)- y -(OC)O-, alquenileno o alquinileno, estando dichos alquenileno o alquinileno eventualmente interrumpidos por uno o varios grupos elegidos entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, -(CO)NH-, -O(CO)- o -(OC)O-.

11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que el ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico se elige entre: los péptidos, los pseudopéptidos, los peptidomiméticos, los aminoácidos, los agentes de direccionamiento de integrinas, las glicoproteínas, las lectinas, los derivados pteroicos o aminopteroicos, los derivados del ácido fólico y antifólico, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, los esteroides, los oligonucleótidos, las secuencias de ácido ribonucleico, los secuencias de ácido desoxirribonucleico, las hormonas, las proteínas eventualmente recombinantes o mutadas, los mono o polisacáridos, los compuestos con un esqueleto de benzotiazol, de benzofurano, de estirilbenzoxazol / tiazol / imidazol / quinolina, estirilpiridina.

12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que el ligando de direccionamiento del ligando de direccionamiento anfifílico es un ligando de un objetivo asociado a la angiogénesis.

13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada por que el ligando de direccionamiento anfifílico tiene la fórmula:



o una de sus sales.

14. Procedimiento de preparación de una composición según las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las etapas de:

a) solubilización de las partículas magnéticas (p) a base de un compuesto de hierro recubiertas por uno o varios ácidos grasos C8-C22 en un aceite que comprende al menos un 70 % en peso de glicéridos de ácidos grasos saturados C6-C18 para formar una fase lipídica,
b) mezcla de la fase lipídica obtenida en la etapa a) y de una fase acuosa que comprende la mezcla de tensioactivos, de manera que se formen nanogotitas,
c) recuperación de la nanoemulsión obtenida.

15. Producto de contraste que comprende la composición de nanoemulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Producto de contraste que comprende la composición de nanoemulsión según la reivindicación 12 o 13.

17. Método de obtención de imágenes de un cuerpo entero o de una parte del cuerpo de un individuo que comprende una etapa de obtención de una o varias imágenes de un cuerpo entero o de una parte del cuerpo de un individuo mediante una técnica de obtención de imágenes médicas, en la que dicho cuerpo entero o dicha parte del cuerpo de un individuo comprende la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o el producto de contraste según la reivindicación 15 o 16, y en la que la o las imágenes están asociadas a partículas magnéticas a base de un compuesto de hierro contenidas en la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o en el producto de contraste según la reivindicación 15 o 16.

18. Composición según la reivindicación 12 o 13 o producto de contraste según la reivindicación 16 destinado a ser utilizado en un método de evaluación "*in vivo*" de la angiogénesis en un individuo que comprende las etapas que consisten en:

a) obtener una o varias imágenes de un cuerpo entero o de una parte del cuerpo de un individuo mediante una técnica de obtención de imágenes médicas, en la que dicho cuerpo entero o dicha parte del cuerpo de un individuo comprende la composición según la reivindicación 12 o 13 o el producto de contraste según la reivindicación 16, y en la que la o las imágenes están asociadas a partículas magnéticas a base de un compuesto de hierro contenidas en la composición según la reivindicación 12 o 13 o en el producto de contraste según la reivindicación 16;
b) evaluar la angiogénesis en el cuerpo entero o en una parte del cuerpo de un individuo a partir de la o las imágenes obtenidas en la etapa a).

19. Composición según la reivindicación 12 o 13 o producto de contraste según la reivindicación 16 para su utilización en un método de evaluación de la eficacia de un tratamiento antiangiogénico que comprende las etapas que consisten en:

a) evaluar la angiogénesis en un individuo que haya recibido un tratamiento antiangiogénico, mediante un método tal como el definido en la reivindicación 18;
b) comparar la angiogénesis evaluada según la etapa a) con una referencia de la angiogénesis en el individuo antes del tratamiento antiangiogénico,

no incluyendo dicho método ninguna etapa de administración de un tratamiento antiangiogénico.

20. Composición según la reivindicación 12 o 13 o producto de contraste según la reivindicación 16 para su utilización en un método de evaluación de la eficacia de un tratamiento antiangiogénico que comprende las etapas que consisten en:

c) evaluar la angiogénesis en un individuo que haya recibido un tratamiento antiangiogénico, mediante el método según la reivindicación 18;
d) comparar la angiogénesis evaluada según la etapa a) con una referencia de la angiogénesis en el individuo antes del tratamiento antiangiogénico.

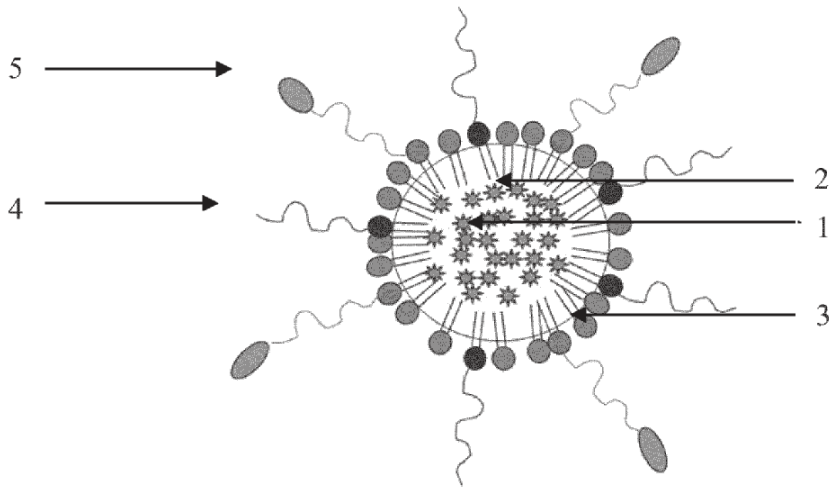


Figura 1

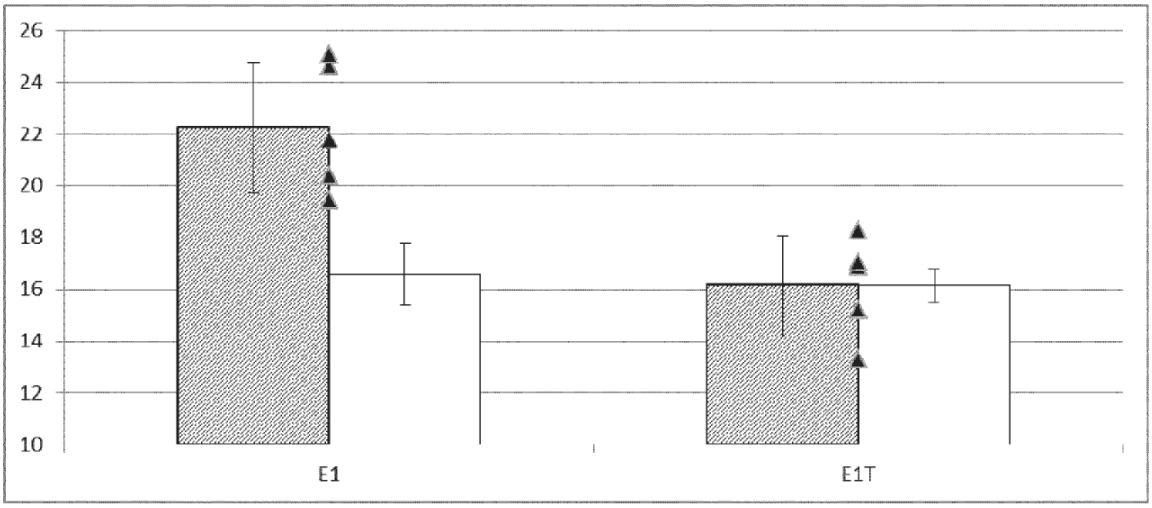


Figura 2