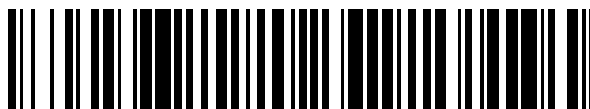


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 308**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127	(2006.01)	A61K 31/713	(2006.01)
A61K 9/19	(2006.01)		
A61K 38/17	(2006.01)		
A61K 31/7088	(2006.01)		
A61N 5/10	(2006.01)		
A61K 38/42	(2006.01)		
A61K 31/715	(2006.01)		
B65D 25/00	(2006.01)		
A61K 41/00	(2006.01)		
A61K 38/16	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2012 PCT/US2012/020680**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO12094679**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2012 E 12732165 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2661275**

54 Título: **Composiciones y métodos para la administración a tumores de agentes de unión de alta afinidad al oxígeno**

30 Prioridad:

07.01.2011 US 201161430628 P
25.01.2011 US 201161435886 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2019

73 Titular/es:

POSEIDA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4242 Campus Point Court, Suite 700
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

GHOROGHCHIAN, P. PETER

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 718 308 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la administración a tumores de agentes de unión de alta afinidad al oxígeno

Campo de la invención

La presente solicitud se relaciona con composiciones y métodos para la síntesis de agentes de unión a oxígeno de alta afinidad adecuados para ser administrados a tumores para aumentar las presiones parciales intratumorales de oxígeno, mitigar la selección natural de células tumorales que demuestran un comportamiento molecular agresivo y potencial metastásico y potenciar los efectos de las radiaciones y quimioterapias.

Antecedentes de la invención

Cada año, aproximadamente 1.2 millones de estadounidenses son diagnosticados con tumores malignos sólidos, lo que resulta en costes de atención médica agregados de más de \$ 55 mil millones para el tratamiento.^{1,2} Más del 50% de estos pacientes se someten a radioterapia (XRT) como parte de su plan de tratamiento.³⁻⁵ La recurrencia de tumores locales en el campo radiado a menudo está implicada como una causa principal de fracaso del tratamiento en pacientes que reciben terapia definitiva.⁴⁻⁷ La capacidad de XRT para erradicar células malignas depende fundamentalmente del contenido intratumoral de O₂, un potente radiosensibilizador involucrado en la mediación del daño en el ADN.⁸⁻¹⁰ El nivel de O₂ intratumoral es uno de los determinantes más importantes de la respuesta entre los tumores del mismo tipo tratados con una sola fracción de radioterapia ionizante.^{4,5,11} Los estudios experimentales sugieren que las células hipóxicas son 2-3 veces más resistentes a una sola fracción de radiación ionizante que aquellas con niveles normales de O₂.^{5,10,12,13} La XRT genera altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) localizadas que son citotóxicas, la hipoxia tumoral promueve una ROS¹⁴ endógena basal que resulta en la estabilización del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) y conduce a un fenotipo tumorigénico más agresivo.^{3,5,8,15-17} Las investigaciones sobre la importancia pronóstica de los niveles de O₂ previos al tratamiento de los tumores en pacientes con cáncer de cabeza, cuello y cervix han demostrado además que el empeoramiento de la hipoxia, generalmente designada en estos estudios como niveles de tensión de oxígeno (pO₂) por debajo de 2.5-10 mm Hg, asociada tanto con la resistencia a la radiación como a la quimioterapia, hizo disminuir el control local del tumor después de la cirugía y produjo tasa más bajas de supervivencia.^{4,5,18-28}

Aunque la hipoxia ha sido reconocida como una causa de fracaso del tratamiento en tumores sólidos durante más de 50 años, los esfuerzos para superarla generalmente han sido infructuosos.^{4,5,8,29-35} Se han diseñado varias estrategias para mejorar la radiosensibilidad y la capacidad de radiocuración de tumores sólidos. Los métodos mejor estudiados que alteran la hipoxia han involucrado el uso de radiosensibilizadores de afinidad electrónica que imitan las acciones del O₂, pero se metabolizan más lentamente. Durante las últimas tres décadas, se han evaluado ampliamente compuestos de nitroimidazol como complementos de la XRT en carcinomas de cabeza, cuello, cuello uterino y pulmón.³⁶⁻⁴³ La mayoría de estos estudios han reportado resultados de control y supervivencia locales decepcionantes,^{36-38,40,41,43} pero los esfuerzos para maximizar su eficacia y seguridad, así como para desarrollar nuevas clases de agentes, están en curso.⁴⁴⁻⁴⁷ La mayoría de las estrategias alternativas se han basado en el uso de compuestos alquilantes en masa que confieren efectos citotóxicos directos que son independientes de la administración de XRT. Los ensayos clínicos que evaluaron la mitomicina C, la tirapazamina, la porfiromicina y otros demostraron mejoras estadística y clínicamente significativas en el control locorregional y la supervivencia específica de la causa de diversos cánceres, pero a menudo a costa de toxicidades significativas con dosis repetidas.^{30-32,48-73}

La ruta más directa y menos tóxica para superar la hipoxia tumoral es aumentar la pO₂ intratumoral. La administración de oxígeno hiperbárico se intentó inicialmente, pero no se usa clínicamente, ya que muestra una respuesta inconsistente, costo prohibitivo, inconvenientes y problemas de seguridad relacionados con la administración.^{4,5,8,10,74} Estrategias más recientes han incluido la administración de carbógeno,^{45,75-82} transfusiones de sangre, portadores de oxígeno basados en hemoglobina sintética o emulsiones de perfluorocarbono,^{5,83,84} e inyecciones de eritropoyetina humana recombinante,^{5,85-89} efectores alostéricos (RSR13) o inhibidores de la angiogénesis.⁹⁰⁻⁹² Todas estas estrategias han tenido un éxito clínico mínimo debido a su dependencia de la carga de oxígeno hiperbárico, la inestabilidad de la formulación, la liberación de oxígeno unido a la hemoglobina que se produce a valores de pO₂ (20-40 mm Hg) que son mucho más altos que los encontrados en las regiones de tumores hipóxicos (<3 mm Hg), y/o mecanismos reguladores intravasculares que alteran el flujo sanguíneo para mantener niveles de oxigenación tisular relativamente constantes.^{5,8,83,91}

Los documentos relevantes de la técnica anterior son los documentos WO 2011/133635 A2, WO 03/059363 A1 y US 5833974 A. A continuación, se presenta una lista de publicaciones a las que se hace referencia en esta descripción.

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2010, <http://www.cancer.org/research/cancerfactsfigures/cancerfactsfigures/cancer-facts-and-figures-2010> (last visited Oct. 10, 2011).

2. Care Core National, Radiation Therapy Management 2010, <http://www.carecorenational.com/radiation-therapy-management.asp> (last visited 2010).

3. Feldmann H.J., Molls M., Vaupel P., Blood Flow And Oxygenation Status Of Human Tumors - Clinical Investigations, STRAHLENTHERAPIE UND ONKOLOGIE 1999;175:1-9.
4. Harrison L., Blackwell K., Hypoxia and Anemia: Factors In Decreased Sensitivity To Radiation Therapy And Chemotherapy, ONCOLOGIST 2004; 9:31-40.
- 5 5. Harrison L.B., Chadha M., Hill R.J., Hu K., Shasha D., Impact Of Tumor Hypoxia And Anemia On Radiation Therapy Outcomes, ONCOLOGIST 2002; 7:492-508.
6. Mundt A.J., Connell P.P., Campbell T., Hwang J.H., Rotmensch J., Waggoner S., Race And Clinical Outcome In Patients With Carcinoma Of The Uterine Cervix Treated With Radiation Therapy, GYNECOLOGIC ONCOLOGY 1998; 71:151-8.
- 10 7. Takeshi K., Katsuyuki K., Yoshiaki T., et al., Definitive Radiotherapy Combined With High-Dose-Rate Brachytherapy For Stage III Carcinoma Of The Uterine Cervix: Retrospective Analysis Of Prognostic Factors Concerning Patient Characteristics And Treatment Parameters, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 1998; 41:319-27.
- 15 8. Rockwell S., Dobrucki I.T., Kim E.Y., Marrison S.T., Vu V.T., Hypoxia and Radiation Therapy: Past History, Ongoing Research, and Future Promise, CURRENT MOLECULAR MEDICINE 2009; 9:442-58.
9. Carlson D.J., Keall P.J., Chen Z.J., Stewart R.D., Nath R., Brown J.M., Towards Temporal Optimization of Radiation Fractionation: The Kinetic Effects of Tumor Hypoxia, DNA Damage Repair, and Tumor Cell Repopulation, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 2009; 75:S615-S6.
- 20 10. Brown J.M., The Hypoxic Cell: A Target For Selective Cancer Therapy - Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture, CANCER RESEARCH 1999; 59:5863-70.
11. Dietz A., Rudat V., Vanselow B., et al. Rise Of Oxygenation In Cervical Lymph Node Metastasis During The Initial Course Of Radiochemotherapy, OTOLARYNGOLOGY-HEAD AND NECK SURGERY 1999; 121:789-96.
- 25 12. Evans S.M., Jenkins W.T., Shapiro M., Koch C.J., Evaluation Of The Concept Of "Hypoxic Fraction" As A Descriptor Of Tumor Oxygenation Status, ADV. EXP. MED. BIOL. 1997; 411:215-25, OXYGEN TRANSPORT TO TISSUE XVIII (Nemoto E.M., LaManna J.C. eds.)(1997).
13. Teicher B.A., Physiological-Mechanisms of Therapeutic Resistance - Blood-Flow and Hypoxia, HEMATOLOGY-ONCOLOGY CLINICS OF NORTH AMERICA 1995; 9:475-506.
14. Kaelin W.G., ROS: Really Involved In Oxygen Sensing. Cell Metabolism 2005; 1:357-8.
- 30 15. Alarcon R., Koumenis C., Geyer R.K., Maki C.G., Giaccia A.J., Hypoxia Induces Accumulation Through MDM2 Down-Regulation And Inhibition Of E6-Mediated Degradation, Cancer Research 1999; 59:6046-51.
16. Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T., et al. Hypoxia-Mediated Selection Of Cells With Diminished Apoptotic Potential In Solid Tumors, Nature 1996; 379:88-91.
17. Rockwell S., Oxygen Delivery: Implications For The Biology And Therapy Of Solid Tumors, Oncology Research 1997; 9:383-90.
- 35 18. Brizel D.M., Dodge R.K., Clough R.W., Dewhirst M.W., Oxygenation Of Head And Neck Cancer: Changes During Radiotherapy And Impact On Treatment Outcome, Radiotherapy and Oncology 1999; 53:113-7.
19. Brizel D.M., Sibley G.S., Prosnitz L.R., Scher R.L., Dewhirst M.W., Tumor Hypoxia Adversely Affects The Prognosis Of Carcinoma Of The Head And Neck, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 1997; 38:285-9.
- 40 20. Fyles A.W., Milosevic M., Wong R., et al., Oxygenation Predicts Radiation Response And Survival In Patients With Cervix Cancer. Radiotherapy And Oncology 1998; 48:149-56.
21. Hockel M., Knoop C., Schlenger K., et al., Intratumoral Po₂ Predicts Survival In Advanced Cancer Of The Uterine Cervix, Radiotherapy and Oncology 1993; 26:45-50.
22. Hockel M., Schlenger K., Aral B., Mitze M., Schaffer U., Vaupel P., Association Between Tumor Hypoxia And Malignant Progression In Advanced Cancer Of The Uterine Cervix, Cancer Research 1996; 56:4509-15.
- 45 23. Hockel M., Vorndran B., Schlenger K., Baussmann E., Knapstein P.G., Tumor Oxygenation - A New Predictive Parameter In Locally Advanced Cancer Of The Uterine Cervix, Gynecologic Oncology 1993; 51:141-9.
24. Knocke T.H., Weitmann H.D., Feldmann H.J., Selzer E., Potter R., Intratumoral Po(2)-Measurements As Predictive Assay In The Treatment Of Carcinoma Of The Uterine Cervix, Radiotherapy and Oncology 1999; 53:99-104.

25. Rofstad E.K., Sundfor K., Lyng H., Trope C.G., Hypoxia-Induced Treatment Failure In Advanced Squamous Cell Carcinoma Of The Uterine Cervix Is Primarily Due To Hypoxia Induced Radiation Resistance Rather Than Hypoxia-Induced Metastasis, *British Journal of Cancer* 2000; 83:354-9.
- 5 26. Rudat V., Vanselow B., Wollensack P., et al. Repeatability And Prognostic Impact Of The Pretreatment Po(2) Histography In Patients With Advanced Head And Neck Cancer, *RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY* 2000; 57:31-7.
27. Stadler P., Becker A., Feldmann H.J., et al., Influence Of The Hypoxic Subvolume On The Survival Of Patients With Head And Neck Cancer, *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS* 1999; 44:749-54.
- 10 28. Stadler P., Feldmann H.J., Creighton C., Kau R., Molls M., Changes In Tumor Oxygenation During Combined Treatment With Split-Course Radiotherapy And Chemotherapy In Patients With Head And Neck Cancer, *RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY* 1998; 48:157-64.
29. Karar J., Maity A., Modulating the Tumor Microenvironment to Increase Radiation Responsiveness, *CANCER BIOLOGY & THERAPY* 2009; 8:1994-2001.
- 15 30. Bache M., Kappler M., Said H.M., Staab A., Vordermark D., Detection And Specific Targeting Of Hypoxic Regions Within Solid Tumors: Current Preclinical And Clinical Strategies, *CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY* 2008; 15:322-38.
31. Ahn G.O., Brown M., Targeting Tumors With Hypoxia-Activated Cytotoxins, *FRONTIERS IN BIOSCIENCE* 2007; 12:3483-501.
- 20 32. Nagasawa H., Uto Y., Kirk K.L., Hori H., Design Of Hypoxia-Targeting Drugs As New Cancer Chemotherapeutics. *BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 2006; 29:2335-42.
33. Janssen H.L., Haustermans K.M., Balm A.J., Begg A.C., Hypoxia In Head And Neck Cancer: How Much, How Important? *HEAD AND NECK-JOURNAL FOR THE SCIENCES AND SPECIALTIES OF THE HEAD AND NECK* 2005; 27:622-38.
- 25 34. Wouters B.G., Weppeler S.A., Koritzinsky M., et al., Hypoxia As A Target For Combined Modality Treatments, *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* 2002; 38:240-57.
35. Kondo A., Safaei R., Mishima M., Niedner H., Lin X.J., Howell S.B., Hypoxia-Induced Enrichment And Mutagenesis Of Cells That Have Lost DNA Mismatch Repair, *CANCER RESEARCH* 2001; 61:7603-7.
36. Grigsby P.W., Winter K., Wasserman T.H., et al., Irradiation With Or Without Misonidazole For Patients With Stages IIIB And IVA Carcinoma Of The Cervix: Final Results of RTOG 80-05. *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS* 1999; 44:513-7.
- 30 37. Lee D.J., Cosmatos D., Marcial V.A., et al., Results Of An RTOG Phase-III Trial (RTOG-85-27) Comparing Radiotherapy Plus Etanidazole With Radiotherapy Alone For Locally Advanced Head And Neck Carcinomas, *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS* 1995; 32:567-76.
38. Lee D.J., Pajak T.F., Stetz J., Order S.E., Weissberg J.B., Fischer J.J., A Phase-I Phase-II Study Of The Hypoxic Cell Sensitizer Misonidazole As An Adjunct To High Fractional Dose Radiotherapy In Patients With Unresectable Squamous-Cell Carcinoma Of The Head And Neck - A RTOG Randomized Study (79-04), *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS* 1989; 16:465-70.
39. Overgaard J., Sensitization Of Hypoxic Tumor-Cells - Clinical-Experience, *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY* 1989; 56:801-11.
- 40 40. Overgaard J., Bentzen S.M., Kolstad P., et al., Misonidazole Combined With Radiotherapy In The Treatment Of Carcinoma Of The Uterine Cervix, *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS* 1989; 16:1069-72.
41. Overgaard J., Hansen H.S., Andersen A.P., et al. Misonidazole Combined With Split-Course Radiotherapy In The Treatment Of Invasive-Carcinoma Of Larynx And Pharynx - Report From The Dahanca-2 Study, *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS* 1989; 16:1065-8.
- 45 42. Overgaard J., Hansen H.S., Overgaard M., et al., A Randomized Double-Blind Phase III Study Of Nimorazole As A Hypoxic Radiosensitizer Of Primary Radiotherapy In Supraglottic Larynx And Pharynx Carcinoma, Results Of The Danish Head And Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85, *RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY* 1998; 46:135-46.
- 50 43. Wasserman T.H., Lee D.J., Cosmatos D., et al., Clinical-Trials With Etanidazole (Sr-2508) By The Radiation-Therapy Oncology Group (RTOG), *RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY* 1991; 20:129-35.

44. Lim SH, Lee JY, Park SH, et al. Effect of Combination of Anticancer Agents and Nitroimidazoles on the Survival of Human Hepatocellular Carcinoma Cells under Hypoxic Conditions, JOURNAL OF THE KOREAN SURGICAL SOCIETY 2009; 76:337-47.
- 5 45. Fenton B.M., Lord E.M., Paoni S.E., Enhancement Of Tumor Perfusion And Oxygenation By Carbogen And Nicotinamide During Single- And Multifraction Irradiation, RADIATION RESEARCH 2000; 153:75-83.
46. Rosenthal D.I., Nurenberg P., Becerra C.R., et al. A Phase I Single-Dose Trial Of Gadolinium Texaphyrin (Gd-Tex), A Tumor Selective Radiation Sensitizer Detectable By Magnetic Resonance Imaging, CLINICAL CANCER RESEARCH 1999; 5:739-45.
- 10 47. Eisbruch A., Robertson J.M., Johnston C.M., et al., Bromodeoxyuridine Alternating With Radiation For Advanced Uterine Cervix Cancer: A Phase I And Drug Incorporation Study, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 1999; 17:31-40.
48. Rischin D., Peters L.J., O'Sullivan B., et al., Tirapazamine, Cisplatin, and Radiation Versus Cisplatin and Radiation for Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (TROG 02.02, HeadSTART): A Phase III Trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 2010; 28:2989-95.
- 15 49. Fogh S., Machtay M., Werner-Wasik M., et al., Phase I Trial Using Patupilone (Epothilone B) And Concurrent Radiotherapy For Central Nervous System Malignancies, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 2010; 77:1009-16.
50. de la Fouchardiere C., Negrier S., Labrosse H., et al., Phase I Study Of Daily Irinotecan As A Radiation Sensitizer For Locally Advanced Pancreatic Cancer, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 2010; 77:409-13.
- 20 51. Williams K.J., Albertella M.R., Fitzpatrick B., et al., In Vivo Activation Of The Hypoxia-Targeted Cytotoxin AQ4N In Human Tumor Xenografts, MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS 2009; 8:3266-75.
52. Hay M.P., Pruijn F.B., Gamage S.A., et al., DNA-Targeted 1,2,4-Benzotriazine 1,4-Dioxides: Potent Analogues Of The Hypoxia-Selective Cytotoxin Tirapazamine, JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 2004; 47:475-88.
- 25 53. Shibamoto Y., Zhou L., Hatta H., Mori M., Nishimoto S., In Vivo Evaluation Of A Novel Antitumor Prodrug, 1-(2'-Oxopropyl)-5-Fluorouracil (OFU001), Which Releases 5-Fluorouracil Upon Hypoxic Irradiation, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 2001; 49:407-13.
54. Koch C.J., Hahn S.M., Rockwell K., Covey J.M., McKenna W.G., Evans S.M., Pharmacokinetics Of EF5 2-(2-Nitro-1-H-Imidazol-1-Yl)-N-(2,2,3,3,3-Pentafluoropropyl) Acetamide In Human Patients: Implications For Hypoxia Measurements In Vivo By 2-Nitroimidazoles, CANCER CHEMOTHER PHARMACOL 2001; 48:177-87.
- 30 55. von Pawel J., von Roemeling R., Gatzemeier U., et al., Tirapazamine Plus Cisplatin Versus Cisplatin In Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Report Of The International CATAPULT I Study Group, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 2000; 18:1351-9.
56. Roberts K.B., Urdaneta N., Vera R., et al., Interim Results Of A Randomized Trial Of Mitomycin C As An Adjunct To Radical Radiotherapy In The Treatment Of Locally Advanced Squamous-Cell Carcinoma Of The Cervix, INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER 2000; 90:206-23.
- 35 57. Papadopoulou M.V., Ji M., Rao M.K., Bloomer W.D., 4- 3-(2-Nitro-1-Imidazolyl)Propylamino -7-Chloroquinoline Hydrochloride (NLCQ-1), A Novel Bioreductive Compound As A Hypoxia-Selective Cytotoxin, ONCOLOGY RESEARCH 2000; 12:185-92.
- 40 58. Papadopoulou M.V., Ji M., Rao M.K., Bloomer W.D., 4- 3-(2-Nitro-1-Imidazolyl)Propylamino -7-Chloroquinoline Hydrochloride (NLCQ-1), A Novel Bioreductive Agent As Radiosensitizer In Vitro And In Vivo: Comparison With Tirapazamine, ONCOLOGY RESEARCH 2000; 12:325-33.
59. Craighead P.S., Pearcey R., Stuart G., A Phase I/II Evaluation Of Tirapazamine Administered Intravenously Concurrent With Cisplatin And Radiotherapy In Women With Locally Advanced Cervical Cancer, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 2000; 48:791-5.
- 45 60. Weitman S., Mangold G., Marty J., et al., Evidence Of Enhanced In Vivo Activity Using Tirapazamine With Paclitaxel And Paraplatin Regimens Against The MV-522 Human Lung Cancer Xenograft, CANCER CHEMOTHER PHARMACOL 1999; 43:402-8.
61. Treat J., Johnson E., Langer C., et al., Tirapazamine With Cisplatin In Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Study, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 1998; 16:3524-7.
- 50

62. Siemann D.W., Hinchman C.A., Potentiation Of Cisplatin Activity By The Bio-reductive Agent Tirapazamine, RADIO-THERAPY AND ONCOLOGY 1998; 47:215-20.
63. Lee D.J., Trotti A., Spencer S., et al., Concurrent Tirapazamine And Radiotherapy For Advanced Head And Neck Carcinomas: A Phase II Study, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 1998; 42:811-5.
64. Harrison L.B., Raben A., Pfister D.G., et al. A Prospective Phase II Trial Of Concomitant Chemotherapy And Radiotherapy With Delayed Accelerated Fractionation In Unresectable Tumors Of The Head And Neck, HEAD AND NECK-JOURNAL FOR THE SCIENCES AND SPECIALTIES OF THE HEAD AND NECK 1998; 20:497-503.
65. Gatzemeier U., Rodriguez G., Treat J., et al., Tirapazamine-Cisplatin: The Synergy, BRITISH JOURNAL OF CANCER 1998; 77:15-7.
66. Brown J.M., Wang L.H., Tirapazamine: Laboratory Data Relevant To Clinical Activity, ANTI-CANCER DRUG DESIGN 1998; 13:529-39.
67. Haffty B.G., Son Y.H., Papac R., et al., Chemotherapy As An Adjunct To Radiation In The Treatment Of Squamous Cell Carcinoma Of The Head And Neck: Results Of The Yale Mitomycin Randomized Trials, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 1997; 15:268-76.
68. Adelstein D.J., Saxton J.P., Lavertu P., et al., A Phase III Randomized Trial Comparing Concurrent Chemotherapy And Radiotherapy With Radiotherapy Alone In Resectable Stage III And IV Squamous Cell Head And Neck Cancer: Preliminary Results, HEAD AND NECK-JOURNAL FOR THE SCIENCES AND SPECIALTIES OF THE HEAD AND NECK 1997; 19:567-75.
69. Sartorelli A.C., Hodnick W.F., Belcourt M.F., et al., Mitomycin-C - A Prototype Bio-reductive Agent, ONCOLOGY RESEARCH 1994; 6:501-8.
70. Dobrowsky W., Mitomycin-C, 5-Fluorouracil And Radiation In Advanced, Locally Recurrent Rectal-Cancer, BRITISH JOURNAL OF RADIOLOGY 1992; 65:143-7.
71. Sivanesaratnam V., Jayalakshmi P., Mitomycin-C Adjuvant Chemotherapy After Wertheim Hysterectomy For Stage-Ib Cervical-Cancer, CANCER 1989; 64:798-800.
72. Keyes S.R., Rockwell S., Sartorelli A.C., Enhancement Of Mitomycin-C CytoToxicity To Hypoxic Tumor-Cells By Dicoumarol In vivo And In vitro. CANCER RESEARCH 1985; 45:213-6.
73. Keyes S.R., Rockwell S., Sartorelli A.C., Porfiriomycin As A Bio-reductive Alkylating Agent With Selective Toxicity To Hypoxic Emt6 Tumor-Cells In vivo And In vitro, CANCER RESEARCH 1985; 45:3642-5.
74. Overgaard J., Horsman M.R., Modification Of Hypoxia-Induced Radioresistance In Tumors By The Use Of Oxygen And Sensitizers, SEMINARS IN RADIATION ONCOLOGY 1996; 6:10-21.
75. Aquino-Parsons C., Lim P., Green A., Minchinton A.I., Carbogen Inhalation In Cervical Cancer: Assessment Of Oxygenation Change, GYNECOLOGIC ONCOLOGY 1999; 74:259-64.
76. Bernier J., Denekamp J., Rojas A., et al., ARCON: Accelerated Radiotherapy With Carbogen And Nicotinamide In Head And Neck Squamous Cell Carcinomas: The Experience Of The Cooperative Group Of Radiotherapy Of The European Organization For Research And Treatment Of Cancer (EORTC), RADIO-THERAPY AND ONCOLOGY 2000; 55:111-9.
77. Bussink J., Kaanders J., Van der Kogel A.J., Clinical Outcome And Tumour Microenvironmental Effects Of Accelerated Radiotherapy With Carbogen And Nicotinamide, ACTA ONCOLOGICA 1999; 38:875-82.
78. Hoskin P.J., Saunders M.I., Dische S., Hypoxic Radiosensitizers In Radical Radiotherapy For Patients With Bladder Carcinoma - Hyperbaric Oxygen, Misonidazole, And Accelerated Radiotherapy, Carbogen, And Nicotinamide, CANCER 1999; 86:1322-8.
79. Miralbell R., Mornex F., Greiner R., et al., Accelerated Radiotherapy, Carbogen, And Nicotinamide In Glioblastoma Multiforme: Report Of European Organization For Research And Treatment Of Cancer Trial 22933, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 1999; 17:3143-9.
80. Saunders M., Dische S., Clinical Results Of Hypoxic Cell Radiosensitisation From Hyperbaric Oxygen To Accelerated Radiotherapy, Carbogen And Nicotinamide, BRITISH JOURNAL OF CANCER 1996; 74:S271-S8.
81. Stuben G., Stuschke M., Knuhmann K., Horsman M.R., Sack H., The Effect Of Combined Nicotinamide And Carbogen Treatments In Human Tumour Xenografts: Oxygenation And Tumour Control Studies, RADIO-THERAPY AND ONCOLOGY 1998; 48:143-8.

82. Zhan H.W., Liu H.B., Bao C.K., Ye X.J., Zhang H., He G.Q., Effect Of Carbogen On Tumour Oxygenation And 32P-Colloid Interstitial Irradiation Response, MEDICAL SCIENCE MONITOR 2010; 16:BR11-BR6.
83. Yu M.H., Dai M., Liu Q., Xiu R.J., Oxygen Carriers And Cancer Chemo- And Radiotherapy Sensitization: Bench To Bedside And Back, CANCER TREATMENT REVIEWS 2007; 33:757-61.
- 5 84. Hoogsteen I.J., Marrest A.M., van der Kogel A.J., Kaanders J., The Hypoxic Tumour Microenvironment, Patient Selection And Hypoxia-Modifying Treatments, CLINICAL ONCOLOGY 2007; 19:385-96.
85. Shasha D., The Negative Impact Of Anemia On Radiotherapy And Chemoradiation Outcomes, SEMINARS IN HEMATOLOGY 2001; 38:8-15.
- 10 86. Shasha D., George M.J., Harrison L.B., Once-Weekly Dosing Of Epoetin Alfa Increases Hemoglobin And Improves Quality Of Life In Anemic Cancer Patients Receiving Radiation Therapy Either Concomitantly Or Sequentially With Chemotherapy, BLOOD 2000; 96:1866.
87. Henke M., Guttenberger R., Barke A., Pajonk F., Potter R., Frommhold H., Erythropoietin For Patients Undergoing Radiotherapy: A Pilot Study, RADIOOTHERAPY AND ONCOLOGY 1999; 50:185-90.
- 15 88. Dusenbery K.E., McGuire W.A., Holt P.J., et al., Erythropoietin Increases Hemoglobin During Radiation-Therapy For Cervical-Cancer, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 1994; 29:1079-84.
89. Lavey R.S., Dempsey W.H., Erythropoietin Increases Hemoglobin In Cancer-Patients During Radiation-Therapy, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 1993; 27:1147-52.
- 20 90. McGee M.C., Hamner J.B., Williams R.F., et al., Improved Intratumoral Oxygenation Through Vascular Normalization Increases Glioma Sensitivity To Ionizing Radiation, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 2010; 76:1537-45.
91. Katz D., Ito E., Liu F.F., On The Path To Seeking Novel Radiosensitizers, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS 2009; 73:988-96.
- 25 92. Gali-Muhtasib H., Sidani M., Geara F., et al., Quinoxaline 1,4-Dioxides Are Novel Angiogenesis Inhibitors That Potentiate Antitumor Effects Of Ionizing Radiation, INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 2004; 24:1121-31.
93. Ordway G.A., Garry D.J., Myoglobin: An Essential Hemoprotein In Striated Muscle, JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 2004; 207:3441-6.
94. Wittenberg J.B., Wittenberg B.A., Myoglobin Function Reassessed, JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 2003; 206:2011-20.
- 30 95. Kooyman G.L., Ponganis P.J., The Physiological Basis Of Diving To Depth: Birds And Mammals, ANNUAL REVIEW OF PHYSIOLOGY 1998; 60:19-32.
96. Hochachka P.W., The Metabolic Implications Of Intracellular Circulation, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 1999; 96:12233-9.
- 35 97. Conley K.E., Jones C., Myoglobin Content And Oxygen Diffusion: Model Analysis Of Horse And Steer Muscle, AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY 1996; 271:C2027-C36.
98. Galluzzo M., Pennacchietti S., Rosano S., Comoglio P.M., Michieli P., Prevention Of Hypoxia By Myoglobin Expression In Human Tumor Cells Promotes Differentiation And Inhibits Metastasis, JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 2009; 119:865-75.
- 40 99. Floegel U., Dang C.V., Myoglobin Tames Tumor Growth And Spread, JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 2009; 119:766-8.
100. Bunn H.F., The Role Of Hemoglobin Based Substitutes In Transfusion Medicine, TRANSFUS CLIN. BIOL. 1995; 2:433-9.
- 45 101. Gottschalk A., Raabe A., Hommel M., Rempf C., Freitag M., Standl T., Influence Of The Hemoglobin Solution HBOC-201 On Tissue Oxygenation In The Rat R1H-Tumor, ARTIF. CELLS BLOOD SUBSTIT. BIOTECHNOL. 2005; 33:379-89.
102. Gundersen S.I., Palmer A.F., Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Enhanced Tumor Oxygenation: A Novel Strategy for Cancer Therapy, BIOTECHNOL. PROG. 2008; 24:1353-64.
103. Palaparthi R., Wang H.S., Gulati A., Current Aspects In Pharmacology Of Modified Hemoglobins, ADV DRUG DELIV. REV 2000; 40:185-98.

104. Robinson M.F., Dupuis N.P., Kusumoto T., Liu F., Menon K., Teicher B.A., Increased Tumor Oxygenation And Radiation Sensitivity In 2 Rat-Tumors By A Hemoglobin-Based, Oxygen-Carrying Preparation, ARTIF. CELLS BLOOD SUBSTIT. IMMOBIL. BIOTECHNOL. 1995; 23:431-8.
105. Rowinsky E.K., Novel Radiation Sensitizers Targeting Tissue Hypoxia, ONCOLOGY-NY 1999; 13:61-70.
- 5 106. Teicher B.A., Herman T.S., Hopkins R.E., Menon K., Effect Of A Bovine Hemoglobin Preparation On The Response Of The Fsaic Fibrosarcoma To Chemotherapeutic Alkylating-Agents, J. CANCER RES. CLIN. ONCOL. 1992; 118:123-8.
107. Teicher B.A., Holden S.A., Dupuis N.P., et al., Oxygenation Of The Rat-9l Gliosarcoma And The Rat-13672 Mammary-Carcinoma With Various Doses Of A Hemoglobin Solution, ARTIF. CELLS BLOOD SUBSTIT. IMMOBIL. BIOTECHNOL. 1994; 22:827-33.
- 10 108. Teicher B.A., Holden S.A., Menon K., Hopkins R.E., Gawryl M.S., Effect Of Hemoglobin Solution On The Response Of Intracranial And Subcutaneous Tumors To Antitumor Alkylating-Agents, CANCER CHEMOTHER. PHARMACOL. 1993; 33:57-62.
109. Teicher B.A., Schwartz G.N., Sotomayor E.A., Robinson M.F., Dupuis N.P., Menon K., Oxygenation Of Tumors By A Hemoglobin Solution, J. CANCER RES. CLIN. ONCOL. 1993; 120:85-90.
- 15 110. Christian D.A., Cai S., Bowen D.M., Kim Y., Pajeroski J.D., Discher D.E., Polymersome Carriers: From Self-Assembly To siRNA And Protein Therapeutics, EUR. J. PHARM. BIOPHARM. 2009; 71:463-74.
111. Levine D.H., Ghoroghchian P.P., Freudenberg J., et al., Polymersomes: A New Multi-Functional Tool For Cancer Diagnosis And Therapy, METHODS 2008; 46:25-32.
- 20 112. Letchford K., Burt H., A Review Of The Formation And Classification Of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules And Polymersomes, EUR. J. PHARM. BIOPHARM. 2007; 65:259-69.
113. Discher B.M., Hammer D.A., Bates F.S., Discher D.E., Polymer Vesicles In Various Media, CURR. OPIN. COLLOID INTERFACE SCI. 2000; 5:125-31.
- 25 114. Discher D.E., Ortiz V., Srinivas G., et al., Emerging Applications Of Polymersomes In Delivery: From Molecular Dynamics To Shrinkage Of Tumors, PROG. POLYM. SCI. 2007; 32:838-57.
115. Discher B.M., Won Y.Y., Ege D.S., et al., Polymersomes: Tough Vesicles Made From Diblock Copolymers, SCIENCE 1999; 284:1143-6.
116. O'Neil C.P., Suzuki T., Demurtas D., Finka A., Hubbell J.A., A Novel Method For The Encapsulation Of Biomolecules Into Polymersomes Via Direct Hydration, LANGMUIR 2009; 25:9025-9.
- 30 117. Lee J.C.M., Bermudez H., Discher B.M., et al., Preparation, Stability, And In Vitro Performance Of Vesicles Made With Diblock Copolymers, BIOTECHNOL. BIOENG. 2001; 73:135-45.
118. Ghoroghchian P.P., Li G.Z., Levine D.H., et al., Bioresorbable Vesicles Formed Through Spontaneous Self-Assembly Of Amphiphilic Poly(Ethylene Oxide)-Block-Polycaprolactone, MACROMOLECULES 2006; 39:1673-5.
- 35 119. Kim Y.H., Tewari M., Pajeroski J.D., et al., Polymersome Delivery Of siRNA And Antisense Oligonucleotides, J. CONTROL RELEASE 2009; 134:132-40.
120. Hearnden V., Lomas H., MacNeil S., et al., Diffusion Studies of Nanometer Polymersomes Across Tissue Engineered Human Oral Mucosa, PHARMACEUTICAL RESEARCH 2009; 26:1718-28.
121. Meng F.H., Engbers G.H.M., Feijen J., Biodegradable Polymersomes As A Basis For Artificial Cells: Encapsulation, Release And Targeting, J. CONTROL RELEASE 2005; 101:187-98.
- 40 122. Photos P.J., Bacakova L., Discher B., Bates F.S., Discher D.E., Polymer Vesicles In Vivo: Correlations With PEG Molecular Weight, J. CONTROL RELEASE 2003; 90:323-34.
123. Ghoroghchian P.P., Lin J.J., Brannan A.K., et al., Quantitative Membrane Loading Of Polymer Vesicles, SOFT MATTER 2006; 2:973-80.
- 45 124. Ghoroghchian P.P., Frail P.R., Susumu K., et al., Near-Infrared-Emissive Polymersomes: Self-Assembled Soft Matter For In Vivo Optical Imaging, PROC NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 2005; 102:2922-7.
125. Bermudez H., Hammer D.A., Discher D.E., Effect Of Bilayer Thickness On Membrane Bending Rigidity, LANGMUIR 2004; 20:540-3.

126. Bermudez H., Brannan A.K., Hammer D.A., Bates F.S., Discher D.E., Molecular Weight Dependence Of Polymersome Membrane Structure, Elasticity, And Stability, *MACROMOLECULES* 2002; 35:8203-8.
127. Massignani M., LoPresti C., Blanazs A., et al., Controlling Cellular Uptake by Surface Chemistry, Size, and Surface Topology at the Nanoscale, *SMALL* 2009; 5:2424-32.
- 5 128. Blanazs A., Massignani M., Battaglia G., Armes S.P., Ryan A.J., Tailoring Macromolecular Expression at Polymersome Surfaces, *ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS* 2009; 19:2906-14.
129. van Dongen S.F.M., Nallani M., Schoffelen S., Cornelissen J., Nolte R.J.M., van Hest J.C.M., A Block Copolymer For Functionalisation Of Polymersome Surfaces, *MACROMOLECULAR RAPID COMMUNICATIONS* 2008; 29:321-5.
- 10 130. Christian N.A., Milone M.C., Ranka S.S., et al., Tat-Functionalized Near-Infrared Emissive Polymersomes For Dendritic Cell Labeling, *BIOCONJUGATE. CHEM.* 2007; 18:31-40.
131. Binder W.H., Sachsenhofer R., Farnik D., Blaas D. Guiding The Location Of Nanoparticles Into Vesicular Structures: A Morphological Study, *PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS* 2007; 9:6435-41.
132. Lin J.J., Ghoroghchian P., Zhang Y., Hammer D.A., Adhesion Of Antibody-Functionalized Polymersomes, *LANGMUIR* 2006; 22:3975-9.
- 15 133. Lin J.J., Silas J.A., Bermudez H., Milam V.T., Bates F.S., Hammer D.A., The Effect Of Polymer Chain Length And Surface Density On The Adhesiveness Of Functionalized Polymersomes, *LANGMUIR* 2004; 20:5493-500.
134. Pangu G.D., Davis K.P., Bates F.S., Hammer D.A., Ultrasonically Induced Release from Nanosized Polymer Vesicles, *MACROMOL. BIOSCI.* 2010; 10:546-54.
- 20 135. Kim M.S., Lee D.S., Biodegradable And Ph-Sensitive Polymersome With Tuning Permeable Membrane For Drug Delivery Carrier, *CHEMICAL COMMUNICATIONS* 2010; 46:4481-3.
136. Chen W., Meng F.H., Cheng R., Zhong Z.Y., pH-Sensitive Degradable Polymersomes For Triggered Release Of Anticancer Drugs: A Comparative Study With Micelles, *J CONTROL RELEASE* 2010; 142:40-6.
137. Robbins G.P., Jimbo M., Swift J., Therien M.J., Hammer D.A., Dmochowski I.J., Photoinitiated Destruction of Composite Porphyrin-Protein Polymersomes, *J AM CHEM SOC* 2009; 131:3872-+.
- 25 138. Kim K.T., Cornelissen J., Nolte R.J.M., van Hest J.C.M., A Polymersome Nanoreactor with Controllable Permeability Induced by Stimuli-Responsive Block Copolymers, *ADVANCED MATERIALS* 2009; 21:2787.
139. Sanson C., Le Meins J.F., Schatz C., Soum A., Lecommandoux S., Temperature Responsive Poly(Trimethylene Carbonate)-Block-Poly(L-Glutamic Acid) Copolymer: Polymersomes Fusion And Fission, *SOFT MATTER* 2010; 6:1722-30.
- 30 140. Castillo R.V., Muller A.J., Raquez J.M., Dubois P., Crystallization Kinetics and Morphology of Biodegradable Double Crystalline PLLA-b-PCL Diblock Copolymers, *MACROMOLECULES* 2010; 43:4149-60.
141. Wang F., Wang Y.C., Yan L.F., Wang J., Biodegradable Vesicular Nanocarriers Based On Poly(Epsilon-Caprolactone)-Block-Poly(Ethyl Ethylene Phosphate) For Drug Delivery, *POLYMER* 2009; 50:5048-54.
- 35 142. Schatz C., Louguet S., Le Meins J.F., Lecommandoux S., Polysaccharide-Block-Polypeptide Copolymer Vesicles: Towards Synthetic Viral Capsids, *ANGEW. CHEM. INT. EDIT* 2009; 48:2572-5.
143. Rabotyagova O.S., Cebe P., Kaplan D.L., Self-Assembly of Genetically Engineered Spider Silk Block Copolymers, *BIOMACROMOLECULES* 2009; 10:229-36.
144. Katz J.S., Levine D.H., Davis K.P., Bates F.S., Hammer D.A., Burdick J.A., Membrane Stabilization of Biodegradable Polymersomes, *LANGMUIR* 2009; 25:4429-34.
- 40 145. Bromley E.H.C., Channon K., Moutevelis E., Woolfson D.N., Peptide And Protein Building Blocks For Synthetic Biology: From Programming Biomolecules To Self-Organized Biomolecular Systems, *ACS CHEMICAL BIOLOGY* 2008; 3:38-50.
146. Najafi F., Sarbolouki M.N., Biodegradable Micelles/Polymersomes From Fumaric/Sebacic Acids And Poly(Ethylene Glycol), *BIOMATERIALS* 2003;24:1175-82.
- 45 147. Rameez S., Bamba I., Palmer A.F., Large Scale Production of Vesicles by Hollow Fiber Extrusion: A Novel Method for Generating Polymersome Encapsulated Hemoglobin Dispersions, *LANGMUIR* 2010; 26:5279-85.
148. Shum H.C., Kim J.W., Weitz D.A., Microfluidic Fabrication Of Monodisperse Biocompatible And Biodegradable Polymersomes With Controlled Permeability, *J AM CHEM SOC* 2008; 130:9543-9.

149. Yildiz M.E., Prud'homme R.K., Robb I., Adamson D.H., Formation And Characterization Of Polymersomes Made By A Solvent Injection Method, POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES 2007; 18:427-32.
150. Dewhirst M.W., Relationships Between Cycling Hypoxia, HIF-1, Angiogenesis And Oxidative Stress, RADIATION RESEARCH 2009; 172:653-65.
- 5 151. Palmer G.M., Boruta R.J., Viglianti B.L., Lan L., Spasojevic I., Dewhirst M.W., Non-Invasive Monitoring Of Intra-Tumor Drug Concentration And Therapeutic Response Using Optical Spectroscopy, J CONTROL RELEASE 2010; 142:457-64.
152. Dewhirst M.W., Thrall D.E., Palmer G., et al., Utility Of Functional Imaging In Prediction Or Assessment Of Treatment Response And Prognosis Following Thermootherapy, INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA 2010; 26:283-93.
- 10 153. Zhang G.Q., Palmer G.M., Dewhirst M., Fraser C.L., A Dual-Emissive-Materials Design Concept Enables Tumour Hypoxia Imaging, NATURE MATERIALS 2009; 8:747-51.
154. Palmer G.M., Viola R.J., Schroeder T., Yarmolenko P.S., Dewhirst M.W., Ramanujam N., Quantitative Diffuse Reflectance And Fluorescence Spectroscopy: Tool To Monitor Tumor Physiology In Vivo, JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS 2009; 14.
- 15 155. Hardee M.E., Dewhirst M.W., Agarwal N., Sorg B.S., Novel Imaging Provides New Insights into Mechanisms of Oxygen Transport in Tumors, CURRENT MOLECULAR MEDICINE 2009; 9:435-41.
156. Sorg B.S., Hardee M.E., Agarwal N., Moeller B.J., Dewhirst M.W., Spectral Imaging Facilitates Visualization And Measurements Of Unstable And Abnormal Microvascular Oxygen Transport In Tumors, JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS 2008; 13.
- 20 157. Dewhirst M.W., Cao Y., Moeller B., Cycling Hypoxia And Free Radicals Regulate Angiogenesis And Radiotherapy Response, NATURE REVIEWS CANCER 2008; 8:425-37.
158. Sorg B.S., Moeller B.J., Donovan O., Cao Y.T., Dewhirst M.W., Hyperspectral Imaging Of Hemoglobin Saturation In Tumor Microvasculature And Tumor Hypoxia Development, JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS 2005; 10.
- 25 159. Dewhirst M.W., Cao Y.T., Li C.Y., Moeller B., Exploring The Role Of HIF-1 In Early Angiogenesis And Response To Radiotherapy, RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY 2007; 83:249-55.
160. Moeller B., Dewhirst M.W., HIF-I and tumour radiosensitivity, BRITISH JOURNAL OF CANCER 2006; 95:1-5.
161. Moeller B.J., Dreher M.R., Rabbani Z.N., et al., Pleiotropic Effects Of HIF-1 Blockade On Tumor Radiosensitivity, CANCER CELL 2005; 8:99-110.
- 30 162. Arifin D.R., Palmer A.F., Polymersome Encapsulated Hemoglobin: A Novel Type Of Oxygen Carrier, BIOMACROMOLECULES 2005; 6:2172-81.
163. Rameez S., Alost H., Palmer A.F., Biocompatible And Biodegradable Polymersome Encapsulated Hemoglobin: A Potential Oxygen Carrier, BIOCONJUGATE CHEM 2008; 19:1025-32.
164. Ghoroghchian P.P., Therien M.J., Hammer D.A., In Vivo Fluorescence Imaging: A Personal Perspective, WILEY INTERDISCIP. REV-NANOMED NANOBIOECHANOL. 2009; 1:156-67.
- 35 165. Duncan T.V., Ghoroghchian P.P., Rubtsov I.V., Hammer D.A., Therien M.J., Ultrafast Excited-State Dynamics Of Nanoscale Near-Infrared Emissive Polymersomes, J AM. CHEM. SOC 2008; 130:9773-84.
166. Ghoroghchian P.P., Frail P.R., Li G.Z., et al., Controlling Bulk Optical Properties Of Emissive Polymersomes Through Intramembranous Polymer-Fluorophore Interactions, CHEM. MAT 2007; 19:1309-18.
- 40 167. Ghoroghchian P.P., Frail P.R., Susumu K., et al., Broad Spectral Domain Fluorescence Wavelength Modulation Of Visible And Near-Infrared Emissive Polymersomes, J. AM. CHEM. SOC. 2005; 127:15388-90.
168. Christian N.A., Benencia F., Milone M.C., et al., In Vivo Dendritic Cell Tracking Using Fluorescence Lifetime Imaging and Near-Infrared-Emissive Polymersomes, MOL. IMAGING BIOL. 2009; 11:167-77.
- 45 169. Hearnden V., Battaglia G., MacNeil S., Murdoch C., Thornhill M., Penetration Of Polymersome Drug And Gene Delivery Nanoparticles Into In Vitro Models Of Head And Neck Cancer And Tissue Engineered Oral Mucosa, ORAL ONCOLOGY 2009:66.
170. Li S.L., Byrne B., Welsh J., Palmer A.F., Self-Assembled Poly(Butadiene)-B-Poly(Ethylene Oxide) Polymersomes As Paclitaxel Carriers, BIOTECHNOL. PROG. 2007; 23:278-85.

171. Ahmed F., Pakunlu R.I., Brannan A., Bates F., Minko T., Discher D.E., Biodegradable Polymersomes Loaded With Both Paclitaxel And Doxorubicin Permeate And Shrink Tumors, Inducing Apoptosis In Proportion To Accumulated Drug, J. CONTROL RELEASE 2006; 116:150-8.
- 5 172. Zhang X.L., Liu C.S., Yuan Y., et al., Key Parameters Affecting The Initial Leaky Effect Of Hemoglobin-Loaded Nanoparticles As Blood Substitutes, JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE 2008; 19:2463-70.
173. Dewhirst M.W., Kimura H., Rehms S.W.E., et al., Microvascular Studies On The Origins Of Perfusion-Limited Hypoxia, BRITISH JOURNAL OF CANCER 1996; 74:S247-S51.
- 10 174. Zupancich J.A., Bates F.S., Hillmyer M.A., Aqueous Dispersions Of Poly(Ethylene Oxide)-B-Poly(Gamma-Methyl-Epsilon-Caprolactone) Block Copolymers, MACROMOLECULES 2006; 39:4286-8.
175. Hahn J.S., Braun R.D., Dewhirst M.W., et al., Stroma-Free Human Hemoglobin A Decreases R3230Ac Rat Mammary Adenocarcinoma Blood Flow And Oxygen Partial Pressure, RADIATION RESEARCH 1997; 147:185-94.
- 15 176. Arifin D.R., Palmer A.F., Determination Of Size Distribution And Encapsulation Efficiency Of Liposome-Encapsulated Hemoglobin Blood Substitutes Using Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Coupled With Multi-Angle Static Light Scattering, BIOTECHNOL PROG 2003; 19:1798-811.
177. Sakai H., Sato A., Sobolewski P., et al., NO And CO Binding Profiles Of Hemoglobin Vesicles As Artificial Oxygen Carriers, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS 2008; 1784:1441-7.
178. Sakai H., Hamada K., Takeoka S., Nishide H., Tsuchida E., Functional Evaluation Of Hemoglobin- And Lipidheme-Vesicles As Red Cell Substitutes, POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES 1996; 7:639-44.
- 20 179. Frauenfelder H., McMahon B.H., Fenimore P.W., Myoglobin: The Hydrogen Atom Of Biology And A Paradigm Of Complexity, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 2003; 100:8615-7.
180. Herold S., Exner M., Nauser T., Kinetic And Mechanistic Studies Of The NO Center Dot-Mediated Oxidation Of Oxy-myoglobin And Oxyhemoglobin, BIOCHEMISTRY 2001; 40:3385-95.
- 25 181. Nienhaus G.U., Mourant J.R., Chu K., Frauenfelder H., Ligand-Binding To Heme-Proteins - The Effect Of Light On Ligand-Binding In Myoglobin, BIOCHEMISTRY 1994; 33:13413-30.
182. Ansari A., Jones C.M., Henry E.R., Hofrichter J., Eaton W.A., Conformational Relaxation And Ligand-Binding In Myoglobin, BIOCHEMISTRY 1994; 33:5128-45.
- 30 183. Mourant J.R., Braunstein D.P., Chu K., et al., Ligand-Binding To Heme-Proteins .2. Transitions In The Heme Pocket Of Myoglobin, BIOPHYSICAL JOURNAL 1993; 65:1496-507.
184. Kanner J., Harel S., Granit R., Nitric-Oxide As An Antioxidant, ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 1991; 289:130-6.
185. Chance B., Optical Method. ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY 1991; 20:1-28.
- 35 186. Chance B., Nioka S., Kent J., et al., Time-Resolved Spectroscopy Of Hemoglobin And Myoglobin In Resting And Ischemic Muscle, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 1988; 174:698-707.
187. Privalov P.L., Griko Y.V., Venyaminov S.Y., Kutysenko V.P., Cold Denaturation Of Myoglobin, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 1986; 190:487-98.
- 40 188. Helcke G.A., Ingram D.J.E., Slade E.F., Electron Resonance Studies Of Haemoglobin Derivatives .3. Line-Width And G-Value Measurements Of Acid-Met Myoglobin And Of Met Myoglobin Azide Derivatives, PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON SERIES B-BIOLOGICAL SCIENCES 1968; 169:275.
189. Moeller B.J., Richardson R.A., Dewhirst M.W., Hypoxia And Radiotherapy: Opportunities For Improved Outcomes In Cancer Treatment, CANCER AND METASTASIS REVIEWS 2007; 26:241-8.
- 45 190. Kong G., Braun R.D., Dewhirst M.W., Characterization Of The Effect Of Hyperthermia On Nanoparticle Extravasation From Tumor Vasculature, CANCER RESEARCH 2001; 61:3027-32.
191. Kong G., Braun R.D., Dewhirst M.W., Hyperthermia Enables Tumor-Specific Nanoparticle Delivery: Effect Of Particle Size, CANCER RESEARCH 2000; 60:4440-5.
192. Moeller B.J., Dewhirst M.W., Raising The Bar - How HIF-1 Helps Determine Tumor Radiosensitivity, CELL CYCLE 2004; 3:1107-10.

Resumen de la invención

La invención se refiere a un agente de alta afinidad al oxígeno para usar en un método para aumentar la eficacia de la radiación o la quimioterapia aplicada a un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho método: administrar dicho agente de alta afinidad al oxígeno al tumor mediante la administración al sujeto un portador de oxígeno que incorpora el agente de alta afinidad al oxígeno, en donde: el agente de alta afinidad al oxígeno comprende una composición de mioglobina; y las características del gradiente de presión parcial de oxígeno del agente de alta afinidad al oxígeno son tales que el oxígeno se libera del agente de alta afinidad al oxígeno a tensiones de oxígeno de menos de 10 mm Hg, en donde el oxígeno liberado se difunde fuera del portador de oxígeno mientras que el agente de alta afinidad al oxígeno permanece dentro del portador de oxígeno. Dicho agente de unión de alta afinidad al oxígeno es adecuado para ser administrado a los tumores con el fin de aumentar las presiones parciales intratumorales de oxígeno, mitigar la selección natural de células tumorales que demuestran un comportamiento molecular agresivo y potencial metastático, y potenciar los efectos de la radiación y las quimioterapias.

Las diversas realizaciones incluyen composiciones de materia y métodos para desarrollar un portador de oxígeno basado en mioglobina (MBOC) lentamente biodegradable y avanzado que utiliza un vehículo de suministro basado en nanopartículas. En algunas realizaciones, el vehículo de suministro basado en nanopartículas es una vesícula polimérica biodegradable autoensamblada llamada polimerosoma. La tecnología polimerosomas permite la segregación efectiva de la mioglobina (Mb) de los tejidos circundantes y los componentes sanguíneos, evitando así los efectos tóxicos de la mioglobina. Además, la manipulación in situ de las propiedades fisicoquímicas de los polimerosomas influye en sus perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos in vivo para permitir el suministro optimizado de oxígeno a los tejidos tumorales. Las constructos de MBOC derivadas de polímeros exhiben la eficiencia de encapsulación de Mb requerida, las características de unión al oxígeno, las propiedades coloidales y reológicas, así como la estabilidad química y mecánica necesaria para el suministro efectivo de oxígeno in vivo a los tumores.

Las diversas realizaciones proporcionan formulaciones de Mb (PEM) encapsuladas en polímeros que comprenden copolímeros dibloque de óxido de polietileno (PEO) y poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(γ -metil ϵ -caprolactona) (PMCL), o poli(trimetilcarbonato) (PTMC). En algunas realizaciones preferidas, la composición de copolímero dibloque formadora de polímeros es PEO(2k)-b-PCL(12k). En otras realizaciones preferidas, el tamaño de bloque de PEO en los copolímeros formadores de polímeros es de aproximadamente 1-4 kDa y las fracciones de bloque de PEO son de aproximadamente 10% a aproximadamente 20% del copolímero total en peso. En algunas realizaciones preferidas, la utilización de un copolímero dibloque que consiste esencialmente en PEO(2k)-b-PCL(12k) evita los desafíos de formulación observados con intentos previos de desarrollar portadores de oxígeno basados en células apropiadas. Además, las diversas realizaciones proporcionan la utilización de copolímeros dibloque de PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC para generar con éxito dispersiones de PEM que no solo son biodegradables sino también deformables.

Las dispersiones de PEM biodegradables compuestas de copolímeros de PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC son portadores de oxígeno de base celular ideales y podrían ayudar en el tratamiento del cáncer y la mejora de la radioterapia contra el cáncer. Las diversas realizaciones proporcionan la combinación de copolímeros con diferentes sustancias de unión al oxígeno (incluidos Mb y otros agentes de unión al oxígeno con propiedades similares derivadas de diversas fuentes), concentraciones y moléculas reductoras encapsuladas para crear una serie de portadores biodegradable y deformables de oxígeno celular para aplicaciones animales y humanas. En diversas realizaciones preferidas, los derivados de los copolímeros dibloque PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL, PEO-b-PTMC se mezclan y/o se modifican químicamente para generar dispersiones de PEM biodegradables que permiten un nuevo método para la preparación y el suministro de MBOC.; este método incluye los siguientes pasos: 1) autoensamblaje del MBOC en solución acuosa, 2) estabilización del MBOC mediante modificación química, 3) liofilización del constructo resultante, 4) almacenamiento en fase seca, 5) rehidratación de la solución en el punto de atención, y 6) entrega in vivo de MBOC biodegradables que conservan su Mb original. En algunas realizaciones preferidas, el suministro in vivo se logra por vía de administración intravenosa, inhalatoria, transmucosa (por ejemplo, bucal) o transcutánea.

Diversas realizaciones proporcionan MBOCs en los que los portadores de oxígeno están compuestos por micelas poliméricas, polimerosomas u otros vehículos basados en nanopartículas que incorporan proteínas de unión a oxígeno que descargan oxígeno en pO_2 de tejido bajo. Las diversas realizaciones encapsulan Mb.

En diversas realizaciones, los agentes de unión a oxígeno de alta afinidad son mioglobinas humanas no modificadas. En diversas realizaciones, los agentes de unión a oxígeno de alta afinidad pueden ser mioglobina no modificada de otra especie biológica. En diversas realizaciones, los agentes de unión a oxígeno de alta afinidad pueden ser mioglobinas modificadas química o genéticamente de humanos o de otras especies biológicas.

En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno incluye una versión PEGilada o polimerizada del agente de unión de alta afinidad al oxígeno. El agente de afinidad comprende mioglobina y libera oxígeno a tensiones de oxígeno inferiores a 10 mm Hg. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno es mioglobina natural. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno se selecciona entre una de mioglobina humana no modificada, mioglobina no modificada de otra especie biológica, mioglobina modificada química o genéticamente de humanos o de otra especie biológica. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno incluye un vehículo portador que encapsula el agente de oxígeno de alta afinidad y protege al agente de oxígeno de alta afinidad para que no se libere en el torrente sanguíneo. En una realización, el vehículo portador es un vehículo basado en nanopartículas (por

ejemplo, vehículo de administración de fármacos). En una realización, el vehículo portador es una vesícula. En una realización, la vesícula es una vesícula lipídica y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de la vesícula lipídica. En una realización, la vesícula es una vesícula de polímero y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de la vesícula de polímero. En una realización, el vehículo portador es un polimerosoma. En una realización, el vehículo portador incluye una pluralidad de polímeros biodegradables. En una realización, la pluralidad de polímeros biodegradables forman una nanopartícula. En una realización, la nanopartícula tiene menos de 200 nanómetros de diámetro. En una realización, la nanopartícula tiene menos de 100 nanómetros de diámetro. En una realización, el vehículo portador incluye una pluralidad de polímeros biodegradables que forman una nanopartícula sólida, una micela o una nanopartícula de cubierta.

El agente de alta afinidad al oxígeno es adecuado para unir el oxígeno fuertemente a las tensiones fisiológicas de unión al oxígeno encontradas en los pulmones y liberar el oxígeno a tensiones de oxígeno menores de 10 mm Hg. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno se selecciona de una o más de mioglobina humana no modificada, mioglobina no modificada de otra especie biológica, mioglobina modificada química o genéticamente de humanos o de otra especie biológica. El agente de alta afinidad al oxígeno es capaz de unirse al oxígeno fuertemente mientras circula en el torrente sanguíneo y liberar oxígeno de forma lineal o absoluta a tensiones de oxígeno menores a 10 mm Hg. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno es la mioglobina humana natural. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno es mioglobina derivada de otra especie animal. En una realización, los agentes de alta afinidad al oxígeno son una mioglobina modificada química, biológica o genéticamente de otra especie animal. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno comprende una versión PEGilada o polimerizada del agente de alta afinidad al oxígeno. En una realización, un vehículo portador encapsula el agente de alta afinidad al oxígeno y protege al agente de alta afinidad al oxígeno de ser liberado en un torrente sanguíneo. En una realización, el vehículo portador es un vehículo basado en nanopartículas. En una realización, el vehículo portador es una vesícula. En una realización, la vesícula es una vesícula lipídica y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de un núcleo acuoso de la vesícula lipídica. En una realización, la vesícula es una vesícula lipídica y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de una porción membranosa de la vesícula lipídica. En una realización, la vesícula es una vesícula lipídica y el agente de alta afinidad al oxígeno está unido a una superficie exterior de la vesícula lipídica. En una realización, la vesícula comprende polímeros sintéticos y el agente de alta afinidad con oxígeno está dentro de un núcleo acuoso de la vesícula de polímero. En una realización, la vesícula comprende polímeros sintéticos y el agente de alta afinidad con oxígeno está dentro de una porción membranosa de la vesícula de polímero. En una realización, la vesícula comprende polímeros sintéticos y el agente de alta afinidad al oxígeno está unido a la superficie exterior de la vesícula de polímero. En una realización, el vehículo portador es un polimerosoma uni- o multilamellar. En una realización, el vehículo portador comprende una pluralidad de polímeros biodegradables. En una realización, la pluralidad de polímeros biodegradables forma una nanopartícula. En una realización, la nanopartícula tiene menos de 200 nanómetros de diámetro. En una realización, la nanopartícula tiene menos de 100 nanómetros de diámetro. En una realización, el vehículo portador comprende una pluralidad de polímeros biodegradables que forman una nanopartícula sólida, una micela, una vesícula o una nanopartícula de cáscara. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno comprende un vehículo portador que coencapsula el agente de alta afinidad al oxígeno con al menos otro agente sensibilizador de la radiación o quimioterapéutico.

Otras realizaciones incluyen una composición que tiene un agente de alta afinidad al oxígeno PEGilado o polimerizado para reducir la toxicidad. El agente de alta afinidad al oxígeno se une al oxígeno con fuerza a las tensiones fisiológicas de unión al oxígeno que se encuentran en los pulmones y libera su oxígeno unido a las tensiones de oxígeno del tejido que son menores de 10 mm Hg. El agente de afinidad se une al oxígeno fuertemente mientras circula en el torrente sanguíneo y solo libera oxígeno de forma lineal o absoluta a las tensiones de oxígeno en el tejido que son menores a 10 mm Hg. El agente de alta afinidad al oxígeno se selecciona de una de las mioglobinas humanas no modificadas, la mioglobina no modificada de otras especies biológicas, la mioglobina modificada química o genéticamente de humanos o de otras especies biológicas.

Las realizaciones adicionales incluyen una composición que consiste en un vehículo portador y uno o más agentes de alta afinidad al oxígeno que se unen al oxígeno fuertemente y liberan el oxígeno a las tensiones de oxígeno del tejido menores de 10 mm Hg. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno se acopla al vehículo portador de manera que el vehículo de transporte reduce la toxicidad del agente de oxígeno de alta afinidad cuando la composición está dentro de un sujeto animal o humano. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno se selecciona entre una de mioglobina humana no modificada, mioglobina no modificada de otra especie biológica, mioglobina modificada química o genéticamente de humanos o de otra especie biológica. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno libera oxígeno a tensiones de oxígeno por debajo de 5 mm Hg. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno es mioglobina natural. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno se selecciona de uno de mioglobina humana no modificada; mioglobina no modificada de otra especie biológica; mioglobina modificada química o genéticamente de humanos o de otras especies biológicas. En una realización, el vehículo portador es un polimerosoma. En una realización, el vehículo portador es una vesícula que consiste en una membrana bicapa o multicapa. En una realización, la vesícula es una vesícula lipídica y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro del núcleo acuoso de la vesícula lipídica. En una realización, la vesícula es una vesícula de polímero y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de la vesícula de polímero. En una realización, el vehículo portador es una vesícula compuesta por una membrana bicapa o multicapa que comprende un solo homopolímero, uno o más bloques de copolímeros, o disposición aleatoria de uno o más copolímeros, y el agente de alta afinidad con oxígeno está dentro

del núcleo acuoso de la vesícula basada en nanopartículas. En una realización, el vehículo portador es una vesícula compuesta por una membrana bicapa o multicapa que comprende un solo homopolímero, uno o más bloques de copolímeros, o copolímeros aleatorios, y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de la región membranosa de la vesícula basados en nanopartículas. En una realización, el vehículo portador incluye una pluralidad de polímeros biodegradables. En una realización, la pluralidad de polímeros biodegradables forma una nanopartícula. En una realización, la nanopartícula tiene menos de 200 nanómetros de diámetro. En una realización, la nanopartícula tiene menos de 100 nanómetros de diámetro. En una realización, el vehículo portador incluye una pluralidad de polímeros biodegradables que forman una nanopartícula sólida o forman una nanopartícula de cubierta. En una realización, la composición incluye mioglobina PEGilada. El agente de alta afinidad al oxígeno se une al oxígeno fuertemente a las tensiones fisiológicas de unión al oxígeno que se encuentran en los pulmones y libera el oxígeno a las tensiones de oxígeno menores de 10 mm Hg. El agente de alta afinidad al oxígeno se selecciona de una o más de mioglobina humana no modificada, mioglobina no modificada de otra especie biológica, mioglobina modificada química o genéticamente de humanos o de otra especie biológica. El agente de alta afinidad al oxígeno se une al oxígeno fuertemente mientras circula en el torrente sanguíneo y solo libera oxígeno de forma lineal o absoluta a tensiones de oxígeno inferiores a 10 mm Hg. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno es mioglobina natural. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno libera oxígeno a tensiones de oxígeno por debajo de 5 mm Hg. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno se selecciona de uno o más de mioglobina humana no modificada, mioglobina no modificada de otra especie biológica. En una realización, el vehículo portador es un vehículo basado en nanopartículas. En una realización, el vehículo portador es una vesícula. En una realización, la vesícula es una vesícula lipídica y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de un núcleo acuoso de la vesícula lipídica. En una realización, la vesícula es una vesícula lipídica y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de una porción membranosa de la vesícula lipídica. En una realización, la vesícula es una vesícula lipídica y el agente de alta afinidad al oxígeno está unido a la superficie de la vesícula lipídica. En una realización, la vesícula comprende polímeros sintéticos y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de un núcleo acuoso de la vesícula de polímero. En una realización, la vesícula comprende polímeros sintéticos y el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de una porción membranosa de la vesícula de polímero. En una realización, la vesícula comprende polímeros sintéticos y el agente de alta afinidad al oxígeno está unido a la superficie exterior de la vesícula de polímero. En una realización, el vehículo portador es un polímerosoma uni- o multilamellar. En una realización, el vehículo portador comprende una pluralidad de polímeros biodegradables. En una realización, la pluralidad de polímeros biodegradables forma una nanopartícula. En una realización, la nanopartícula tiene menos de 200 nanómetros de diámetro. En una realización, la nanopartícula tiene menos de 100 nanómetros de diámetro. En una realización, el vehículo portador comprende una pluralidad de polímeros biodegradables que forman una nanopartícula sólida o forman una nanopartícula de cubierta. En una realización, el vehículo portador co-encapsula el agente de alta afinidad al oxígeno con al menos otro agente de sensibilización a la radiación o quimioterapéutico. En una realización, que comprende mioglobina PEGilada.

Otras realizaciones incluyen una composición que tiene un portador de oxígeno que incluye una pluralidad de vehículos basados en nanopartículas y un agente de alta afinidad al oxígeno encapsulado dentro de la pluralidad de vehículos basados en nanopartículas. En una realización, la pluralidad de vehículos basados en nanopartículas puede consistir en una o más vesículas, micelas o nanopartículas sólidas, en donde las vesículas, micelas o nanopartículas sólidas incluyen al menos una de un lípido, un polímero biodegradable, un polisacárido o una proteína. En una realización, la pluralidad de vehículos basados en nanopartículas son vesículas multiméricas. En una realización, las vesículas son polímerosomas. En una realización, la pluralidad de vehículos basados en nanopartículas incluye composiciones que permiten la acumulación en un sitio objetivo de interés. En una realización, los vehículos de nanopartículas incluyen composiciones que permiten su acumulación en sitios de interés mediante difusión pasiva o mediante una modalidad de direccionamiento que comprende una conjugación de una molécula de direccionamiento de composición química separada de la de las nanopartículas. En una realización, la molécula de direccionamiento consiste en un compuesto seleccionado de una o más de una proteína natural, una proteína recombinante, un polipéptido recombinante, un polipéptido sintético, un agente químico sintetizado por un animal, una molécula pequeña sintética, un complejo quelante-metal, un carbohidrato, un ácido nucleico, un lípido y/o un polímero. En una realización, los vehículos de nanopartículas incluyen una composición de molécula de direccionamiento en la que el uso de una fuente de energía externa como calor, rayos X y resonancia magnética se puede usar para localizar los vehículos basados en nanopartículas en sitios de interés dentro del sujeto. El agente de alta afinidad al oxígeno se une al oxígeno fuertemente a las tensiones fisiológicas de unión al oxígeno que se encuentran en los pulmones y libera el oxígeno a las tensiones de oxígeno menores de 10 mm Hg. En una realización, el agente de alta afinidad al oxígeno es mioglobina natural. En una realización, al menos parte de la pluralidad de vesículas poliméricas son vesículas poliméricas biodegradables y al menos parte de la pluralidad de vesículas poliméricas son vesículas poliméricas biocompatibles. En una realización, las vesículas de polímero biocompatibles están compuestas por copolímeros que incluyen poli(óxido de etileno) o poli(etilenglicol). En una realización, las vesículas poliméricas biodegradables están compuestas por copolímeros que incluyen poli(ϵ -caprolactona). En una realización, las vesículas de polímero biodegradable están compuestas por copolímeros que incluyen poli(y-metil ϵ -caprolactona). En una realización, las vesículas poliméricas biodegradables están compuestas por copolímeros que incluyen poli(carbonato de trimetilo). En una realización, el portador de oxígeno comprende además copolímeros que incluyen uno de un poli(péptido), un poli(sacárido) o un poli(ácido nucleico). En una realización, las vesículas de polímero biodegradable están compuestas por copolímeros de bloques de poli(óxido de etileno) y poli(ϵ -caprolactona). En una realización, las vesículas de polímero biodegradable están compuestas por copolímeros de bloques de poli(óxido de etileno) y poli(y-metil ϵ -caprolactona). En una realización, las vesículas poliméricas biodegradables están compuestas por copolímeros de

bloques de poli(óxido de etileno) y poli(carbonato de trimetilo). En una realización, las vesículas de polímero biodegradable son puras o mezclas de copolímero multibloque, en donde el copolímero incluye al menos uno de poli(óxido de etileno) (PEO), poli(lactida) (PLA), poli(glicolida) (PLGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ε-caprolactona) (PCL) y poli(carbonato de trimetileno) (PTMC), poli(ácido láctico) (PLA), y/o poli(metil ε-caprolactona) (PMCL).

Otras realizaciones incluyen métodos para fabricar una composición mediante la preparación de una solución orgánica que comprende una pluralidad de polímeros y la exposición de la solución orgánica a un plástico, politetrafluoroetileno o superficie de vidrio, deshidratando la solución orgánica sobre el plástico, politetrafluoroetileno o superficie de vidrio para crear una sola o película multicapa de polímeros, rehidratando la película de polímeros en una solución acuosa que contiene mioglobina como molécula de unión al oxígeno, y entrecruzando los polímeros en la solución acuosa mediante modificación química. Otras realizaciones incluyen métodos para fabricar una composición mediante la preparación de una solución orgánica que comprende una pluralidad de polímeros y mioglobina como molécula de unión al oxígeno, luego exponiendo la solución orgánica a un plástico, politetrafluoroetileno o superficie de vidrio, deshidratando la solución orgánica en el plástico, politetrafluoroetileno, o superficie de vidrio para crear una película de polímeros de una o varias capas, rehidratando la película de polímeros en una solución acuosa y entrecruzando los polímeros en la solución acuosa mediante modificación química.

Realizaciones adicionales incluyen un kit que incluye una composición farmacéutica que tiene un portador de oxígeno, en donde el portador de oxígeno incluye una pluralidad de polímeros y mioglobina como agente de alta afinidad al oxígeno, y un implemento adecuado para administrar el portador de oxígeno por vía intravenosa, mediante inhalación, por vía tópica, por el recto, por la vagina, por vía transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intramuscular u oral. La composición farmacéutica puede incluir un agente farmacéuticamente activo en una cantidad eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto, o para mejorar la eficacia de la radioterapia. La composición farmacéutica puede incluir cualquiera de las composiciones, agentes y/o vehículos mencionados anteriormente para aumentar los niveles de oxígeno en una cantidad eficaz para un sujeto que lo necesite. La composición farmacéutica puede incluir cualquiera de las composiciones, agentes y/o vehículos mencionados anteriormente en cantidades eficaces para el tratamiento o prevención de cáncer maligno o crecimiento tumoral en una cantidad eficaz para un sujeto que lo necesite. La composición farmacéutica puede incluir cualquiera de las composiciones, agentes y/o vehículos mencionados anteriormente en cantidades eficaces para tratar de prevenir el crecimiento de tumores benignos o malignos en un sujeto que lo necesite.

Otras realizaciones incluyen un kit que incluye un primer contenedor y un segundo contenedor, teniendo el primer contenedor un agente de alta afinidad al oxígeno que comprende mioglobina e incluyendo el segundo contenedor una mezcla de rehidratación.

Otras realizaciones incluyen un agente de alta afinidad al oxígeno que comprende mioglobina, para usar en el tratamiento de un tumor dentro de un paciente, estando configurado el agente de alta afinidad al oxígeno para tener una baja toxicidad y para acumularse dentro del tumor, y administrar radiación ionizante al tumor. El agente de alta afinidad al oxígeno puede administrarse por vía intravenosa, por inhalación, por vía tópica, por el recto, por la vagina, por vía transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intramuscular u oral.

En diversas realizaciones, el portador inerte puede ser uno cualquiera o más de un liposoma, polimerosoma, micela, lipoproteína modificada, nanopartículas sólidas, partículas sólidas de tamaño micrométrico, lípidos o emulsiones perfluorocarbonadas, dendrímeros, virus o partículas similares a virus. En diversas realizaciones, el portador inerte puede ser una versión PEGilada o polimerizada de mioglobina.

En diversas realizaciones, la mioglobina humana puede encapsularse dentro de nanopartículas, vesículas de polímero y/o polimerosomas. En diversas realizaciones, las nanopartículas, las vesículas poliméricas y/o los polimerosomas pueden construirse a partir de uno de varios materiales diferentes.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a kits que comprenden una composición, composición farmacéutica o polimerosoma descritos en el presente documento. Diversas realizaciones proporcionan un kit que incluye una composición farmacéutica que comprende mioglobina. La composición puede incluir un vehículo de administración y mioglobina. El kit puede incluir un implemento adecuado para administrar el agente de alta afinidad por oxígeno que comprende mioglobina, por vía intravenosa, por inhalación, por vía tópica, por recto, por vagina, por vía transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intramuscular o oral.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos que se acompañan en relación con agentes de afinidad al oxígeno distintos de la mioglobina no pertenecen a la invención reivindicada.

La Figura 1 es un gráfico que ilustra la curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra las curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina y los agentes de ejemplo que se pueden usar para manipular los niveles de oxígeno en los tejidos de acuerdo con diversas realizaciones.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra las curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina y la mioglobina.

La Figura 4A es una ilustración de polímeros biodegradables que pueden ser un componente de un portador de oxígeno celular biodegradable en diversas realizaciones.

5 La Figura 4B es una ilustración de fluoróforos solubles en agua "◊" y proteínas de unión a oxígeno solubles en agua "o" que pueden usarse como componentes de un portador de oxígeno celular biodegradable en diversas realizaciones.

Las Figuras 4C-D son ilustraciones de la síntesis de mioglobinas encapsuladas con polímeros a nanoescala y procedimientos de procesamiento (calor, sonicación y extrusión para obtener) de las mioglobinas encapsuladas con polímeros a nanoescala de acuerdo con varias realizaciones.

La Figura 4E es una ilustración de un esquema de encapsulación de un polimerosoma de realización.

10 La Figura 4F es una micrografía electrónica de transmisión criogénica y una micrografía confocal de mioglobinas encapsuladas con polímeros.

La Figura 5 son fotografías que ilustran el campo claro (A), (B) la tensión de oxígeno en % de oxígeno y (C) la vasculatura sanguínea funcional para un tumor de cámara de ventana.

15 La Figura 6A es una micrografía electrónica de transmisión criogénica de polimerosomas basados en PEO(2K)-b-PCL (12K) en agua desionizada (5 mg/ml) que ilustra el grosor del núcleo de la membrana de las vesículas como 22.5 ± 2.3 nanómetros.

La Figura 6B es un gráfico que ilustra la liberación in situ acumulativa de doxorrubicina, cargada dentro de polímeros basados en PEO(2K)-b-PCL(12K) con un diámetro de 200 nm, en diversas condiciones fisiológicas (pH 5.5 y 7.4; T=37°C) según lo medido fluorométricamente durante 14 días.

20 La Figura 7A es una imagen óptica in vivo de fluoróforos de infrarrojo (NIRF) cercano basados en oligo(porfirina) encapsulados que ilustran la acumulación de un portador de realización en tumores.

La Figura 7B es un gráfico del crecimiento de tumores in vivo inhibido por la solución salina regulada con fosfato (PBS), doxorrubicina (Dox), liposoma y Polimerosoma.

25 La Figura 8A es un gráfico de barras que ilustra las eficiencias de encapsulación de agentes de cuatro formulaciones de agentes encapsulados en polimerosoma extrudidos a través de membranas de policarbonato de 200 nm de diámetro.

La Figura 8B es un gráfico de barras que ilustra la P₅₀ (mm Hg) de glóbulos rojos, hemoglobina y cuatro formulaciones de hemoglobina encapsulada en polimerosoma extrudidas a través de membranas de policarbonato de 200 nm.

30 La Figura 9 es un diagrama de flujo del proceso que ilustra un método de realización para la preparación y administración de un portador de oxígeno basado en hemoglobina.

La Figura 10 es un diagrama de flujo del proceso que ilustra un método de realización para preparar un polimerosoma que comprende al menos un polímero biocompatible y al menos un polímero biodegradable.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada tomada en relación con las figuras y ejemplos adjuntos, que forman parte de esta descripción.

Los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable en este documento para referirse a pacientes humanos, mientras que el término "sujeto" también puede referirse a cualquier animal. Debe entenderse que, en diversas realizaciones, el sujeto puede ser un mamífero, un animal no humano, un canino y/o un vertebrado.

40 El término "unidades monoméricas" se usa en el presente documento para referirse a una unidad de molécula de polímero que contiene el mismo o similar número de átomos que uno de los monómeros. Las unidades monoméricas, como se usan en esta especificación, pueden ser de un solo tipo (homogéneas) o de una variedad de tipos (heterogéneas).

El término "polímeros" se usa de acuerdo con su significado ordinario de macromoléculas que comprenden moléculas monoméricas conectadas.

45 El término "sustancia anfifílica" se usa en el presente documento para referirse a una sustancia que contiene grupos polares (solubles en agua) e hidrófobos (insolubles en agua).

El término "administración in vivo" se usa en el presente documento para referirse a la administración de un producto biológico por vías de administración tales como tópico, transdérmico, supositorio (rectal, vaginal), pesario (vaginal), intravenoso, oral, subcutáneo, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, intracraneal, inhalación, oral y similares.

- El término "una cantidad efectiva" se usa en el presente documento para referirse a una cantidad de un compuesto, material o composición eficaz para lograr un resultado biológico particular tal como, entre otros, resultados biológicos divulgados, descritos o ejemplificados en el presente documento. Dichos resultados pueden incluir, pero no se limitan a, la reducción efectiva de los síntomas asociados con cualquiera de los estados de enfermedad mencionados en el presente documento, según lo determinado por cualquier medio adecuado en la técnica.
- El término "membrana" se usa en el presente documento para significar una colección espacialmente distinta de moléculas que define una superficie bidimensional en un espacio tridimensional, y por lo tanto separa un espacio de otro en al menos un sentido local.
- El término "agente farmacéuticamente activo" se usa en el presente documento para referirse a cualquier proteína, péptido, azúcar, sacárido, nucleósido, compuesto inorgánico, lípido, ácido nucleico, compuesto químico sintético pequeño o compuesto orgánico que altera o afecta de manera apreciable el sistema biológico al que se introduce.
- El término "administración de fármacos" se usa en el presente documento para referirse a un método o proceso de administración de un compuesto farmacéutico para lograr un efecto terapéutico en seres humanos o animales.
- El término "vehículo" se usa en el presente documento para referirse a agentes sin beneficio terapéutico inherente, pero cuando se combina con un agente farmacéuticamente activo para los fines de la administración de fármacos resulta en la modificación de las propiedades del agente activo farmacéutico, que incluyen pero no se limitan a su mecanismo o modo de administración in vivo, su concentración, biodisponibilidad, absorción, distribución y eliminación en beneficio de mejorar la eficacia y seguridad del producto, así como la conveniencia y el cumplimiento del paciente.
- El término "portador" se usa en el presente documento para describir un vehículo de administración que se usa para incorporar un agente farmacéuticamente activo para los fines de la administración de fármacos.
- El término "agente de unión a oxígeno" o "compuesto de unión a oxígeno" se usa en el presente documento para referirse a mioglobina.
- El término "efector alostérico" se usa en el presente documento para referirse a una molécula que modula la velocidad o la cantidad de oxígeno que se une o libera de un portador de oxígeno.
- El término agente de "alta afinidad al oxígeno" o "compuesto de alta afinidad al oxígeno" se usa en el presente documento para referirse a mioglobina.
- El término "portador de unión a oxígeno" o "portador de oxígeno" se usa en el presente documento para referirse a un portador que comprende un vehículo sintético o parcialmente sintético que incorpora una sola o una pluralidad de agentes de unión a oxígeno.
- El término "homopolímero" se usa en el presente documento para referirse a un polímero derivado de una especie monomérica de polímero.
- El término "copolímero" se usa en el presente documento para referirse a un polímero derivado de dos (o más) especies monoméricas de polímero, a diferencia de un homopolímero donde solo se usa un monómero. Dado que un copolímero consiste en al menos dos tipos de unidades constituyentes (también unidades estructurales), los copolímeros se pueden clasificar según la forma en que estas unidades se disponen a lo largo de la cadena.
- El término "copolímeros de bloque" se usa en el presente documento para referirse a un copolímero que incluye dos o más subunidades homopolímeras unidas por enlaces covalentes en los que la unión de las subunidades homopolímeras puede requerir una subunidad intermedia no repetitiva, conocida como bloque de unión. Los copolímeros de bloque con dos o tres bloques distintos se denominan en este documento "copolímeros dibloque" y "copolímeros tribloque", respectivamente.
- El término "tensión por área" se usa en el presente documento para referirse al cambio en el área de superficie de una partícula bajo una fuerza o tensión externa dividida por el área de superficie original de la partícula antes de la aplicación de dicha fuerza o tensión externa (denotada por "A" y expresada como %).
- El término "tensión de lisis crítica" o "Tc" se usa en el presente documento para referirse a la tensión a la que se rompe una partícula cuando se somete a una fuerza externa medida por aspiración de micropipeta y expresada como miliNewtons/metro (mN/m).
- El término "tensión de área crítica" o "Ac" se usa en el presente documento para referirse a la tensión por área producida por el portador de oxígeno o polimerosoma a la tensión de lisis crítica.
- El término "relación de carga" se usa en el presente documento para referirse a una medición de un portador de enlace de oxígeno y se puede definir como el peso del agente de unión de oxígeno dentro del portador de oxígeno dividido por el peso seco del vehículo inerte.

El término "capacidad de carga de mioglobina" se usa en este documento para referirse a una medición de un portador de oxígeno basado en mioglobina y se puede definir como el peso de mioglobina dentro del portador de oxígeno dividido por el peso total del portador. El término "eficiencia de carga de mioglobina" se usa en este documento para referirse a una medición de un portador de oxígeno basado en mioglobina y se puede definir como el peso de la mioglobina que está encapsulada y/o incorporada dentro de una suspensión portadora dividida por el peso de la mioglobina original en solución antes a la encapsulación (expresada como un %).

El término una "dosis unitaria" se usa en el presente documento para referirse a una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo.

Debe entenderse que P_{50} es la presión parcial de oxígeno (pO_2) a la que el compuesto de unión a oxígeno se satura al 50% con oxígeno. A medida que disminuye la P_{50} , aumenta la alta afinidad al oxígeno y viceversa. La hemoglobina A adulta normal tiene un P_{50} de 26.5 mm Hg, mientras que la hemoglobina F fetal tiene un P_{50} de 20 mm Hg y la hemoglobina S de anemia de células falciformes tiene un P_{50} de 34 mm Hg.

Las diversas realizaciones proporcionan un portador terapéutico basado en nanopartículas adecuado para administrar mioglobina como agente de alta afinidad al oxígeno a los tumores con el fin de aumentar la pO_2 intratumoral, detener sus fenotipos moleculares agresivos y aumentar la eficacia de la radiación y las quimioterapias dirigidas contra el tumor.

En general, el tratamiento con radiación puede aumentarse aumentando los niveles de oxígeno de los tumores, para generar más radicales libres basados en oxígeno con radioterapia concomitante, o administrando otro sensibilizador de radiación no dependiente de O_2 a sitios específicos del tumor. Los métodos convencionales para manipular los niveles de oxígeno de los tumores dependen de un aumento del nivel sistémico de oxígeno para, finalmente, entregar este aumento de la capacidad de oxígeno al tumor. Un método de este tipo que administra sustitutos de sangre artificiales utilizando hemoglobina natural (Hb) se describe en la Solicitud de Patente Estadounidense No. 13/090,076 titulada "Biodegradable Nanoparticles as Novel Hemoglobin-Based Oxygen Carriers and Methods of Using the Same", presentada el 19 de abril de 2011.

La hemoglobina es una proteína transportadora de oxígeno en los glóbulos rojos humanos. La estructura de la hemoglobina hace que sea eficiente para unirse al oxígeno y eficiente para descargar el oxígeno unido en los tejidos humanos/flujo sanguíneo. La hemoglobina consiste en dos pares de dímeros de globina unidos por enlaces no covalentes para formar una molécula de hemoglobina de cuatro subunidades (tetramérica) más grande. La capacidad de unión al oxígeno de la hemoglobina tetramérica depende de la presencia de una unidad no proteica llamada grupo hemo (es decir, una molécula de hemoglobina puede unirse con cuatro moléculas de oxígeno).

La Figura 1 ilustra la curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina. La unión cooperativa de oxígeno a hemoglobina da a la hemoglobina nativa una curva de disociación de oxígeno en forma sigmoidea y permite que el oxígeno se una y libere dentro de un rango fisiológico estrecho de pO_2 (de 40 a 100 mm Hg). Los métodos convencionales para manipular los niveles de oxígeno de los tumores han intentado usar hemoglobina o agentes (proteínas, moléculas, etc.) que tienen una curva de disociación de oxígeno similar a la hemoglobina nativa. Otros han intentado usar agentes que tienen curvas de disociación de oxígeno que se desplazan hacia la derecha de la curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina (es decir, agentes que tienen una afinidad más baja por el oxígeno que la hemoglobina).

La Figura 2 ilustra las curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina y otros dos agentes de ejemplo (por ejemplo, el Agente A, el Agente B) que se pueden usar para manipular los niveles de oxígeno en los tumores. Específicamente, la Figura 2 ilustra que los agentes de ejemplo (Agente A, Agente B) tienen curvas de disociación de oxígeno que se desplazan hacia la derecha de la curva de disociación de oxígeno de hemoglobina, lo que aumenta la cantidad de oxígeno suministrado por los agentes de ejemplo.

La Figura 3 ilustra las curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina y la mioglobina, una proteína ubicua involucrada en la regulación de los niveles de oxígeno en los tejidos musculares. La Figura 3 muestra que la curva de disociación de oxígeno de la mioglobina es una hipérbola rectangular con un P_{50} muy bajo que se encuentra a la izquierda de la curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina en forma sigmoidea (es decir, la mioglobina tiene una afinidad mucho mayor por el oxígeno que la hemoglobina). Es decir, a diferencia de los agentes de ejemplo (por ejemplo, el Agente A, el Agente B) discutido anteriormente con referencia a la Figura 2, la mioglobina tiene una curva de disociación de oxígeno que se desplaza hacia la izquierda de la curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina. Esto se debe en parte al hecho de que, a diferencia de la hemoglobina (que tiene una alta afinidad al oxígeno de aproximadamente 20 a 50 mm Hg), la mioglobina se une al oxígeno muy fuertemente y solo lo libera a una tensión de oxígeno muy baja (2 a 3 mm Hg). Las diversas realizaciones se benefician del hecho de que existe un nivel similar de tensión de oxígeno (2 a 5 mm Hg) en el centro de los tumores sólidos, y este mismo nivel (2 a 5 mm Hg) ha demostrado ser el nivel en donde la eficacia de la radioterapia cae por debajo del cincuenta por ciento de su valor máximo.

Las diversas realizaciones proporcionan composiciones que comprenden mioglobina como agente de alta afinidad con oxígeno, y que son adecuadas para la administración a tumores sólidos para mejorar la eficacia de la radioterapia. Dado que la tensión de oxígeno en el centro de un tumor sólido es similar a la tensión de oxígeno (2 a 3 mm Hg) a la

que el oxígeno se libera de la mioglobina, el uso de agentes de alta afinidad al oxígeno garantiza que los agentes no liberen oxígeno hasta que se colocan alrededor o dentro del tumor.

Como se mencionó anteriormente, las tensiones de oxígeno en el centro de los tumores sólidos son similares a las tensiones de oxígeno (2 a 3 mm Hg) a las que el oxígeno se libera de la mioglobina. Como también se mencionó anteriormente, la eficacia del tratamiento de radiación puede mejorarse aumentando los niveles de oxígeno de los tumores, y los métodos convencionales para manipular los niveles de oxígeno dependen del aumento del nivel sistémico de oxígeno. Por ejemplo, las técnicas existentes para suministrar oxígeno a los tumores pueden implicar aumentar la cantidad de flujo sanguíneo hacia el tumor, aumentar la cantidad de oxígeno disuelto en la sangre o aumentar la concentración general de hemoglobina en la sangre. Los métodos convencionales logran esto usando agentes que tienen una afinidad similar por el oxígeno que los glóbulos rojos naturales (por ejemplo, derivados de hemoglobina humana o xenótica y/u otros agentes que tienen la misma o menor alta afinidad al oxígeno que la hemoglobina humana natural) para aumentar la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre con la esperanza de que esto se traduzca en un aumento del suministro de oxígeno del tumor. En contraste con estos métodos de tratamiento convencionales, las diversas realizaciones describen composiciones de materia y metodología para suministrar oxígeno a los tejidos tumorales utilizando la mioglobina como un agente que tiene una alta afinidad al oxígeno mucho mayor que la de la hemoglobina humana natural. Debido a que la presión parcial de oxígeno en el centro de un tumor sólido es similar a la tensión de oxígeno a la que se libera el oxígeno de la mioglobina (2 a 3 mm Hg), el oxígeno no se libera hasta que los agentes de alta afinidad al oxígeno están alrededor o dentro del tumor.

Mientras que los agentes sólidos de afinidad al oxígeno (por ejemplo, mioglobina, otras proteínas sintéticas que tienen afinidad al oxígeno similar a la mioglobina, etc.) a los tumores sólidos pueden mejorar la eficacia de la radioterapia, con el fin de lograr una adecuada localización del tumor, se debe inyectar una gran cantidad de agentes de alta afinidad al oxígeno en el torrente sanguíneo. Inyectar una gran cantidad de dichas proteínas en el torrente sanguíneo es peligroso, ya que el agente inyectado (por ejemplo, la mioglobina) puede ser nefrotóxico y/o causar urgencia o emergencia hipertensiva (a través del secuestro del óxido nítrico vasodilatador que normalmente controla el tono de los vasos sanguíneos). Por ejemplo, en el caso de la mioglobina, estos fenómenos se observan con frecuencia en personas que sufren ataques cardíacos, corren maratones, realizan otros ejercicios extenuantes y/o usan diversas drogas, como la cocaína. En tales personas, los músculos pueden comenzar a deteriorarse muy rápidamente, liberando así una gran cantidad de mioglobina en el torrente sanguíneo. Esta mioglobina adicional puede hacer que la proteína quede atrapada en el aparato de filtro del cuerpo (es decir, glomérulos renales) y/o cause una afección potencialmente mortal conocida como rabdomiólisis. Una gran cantidad de mioglobina en el torrente sanguíneo también puede aumentar la presión arterial y provocar daños en los órganos. Esto se debe a que, en el torrente sanguíneo, la mioglobina y otras proteínas libres de unión al oxígeno secuestran el óxido nítrico (NO) que es un mediador del tono vascular y del flujo sanguíneo. Por lo tanto, cuando la mioglobina fluye hacia el torrente sanguíneo, actúa extrayendo óxido nítrico de las paredes de los vasos sanguíneos, haciendo que los vasos sanguíneos se contraigan. Esto puede causar un aumento en la presión arterial en general y posiblemente conducir a una crisis hipertensiva, dañando órganos principales como los riñones, el corazón y el cerebro. Por estas y otras razones, inyectar una proteína de unión al oxígeno, como la mioglobina, directamente en el torrente sanguíneo en su forma libre es peligroso.

Para abordar estos y otros problemas, diversas realizaciones pueden encapsular la mioglobina como agente de unión a oxígeno de alta afinidad en un vehículo portador (por ejemplo, una cubierta de nanopartículas) que protegerá a los agentes encapsulados para que no se liberen en el torrente sanguíneo o interactúen con componentes biológicos (por ejemplo, proteínas, células y las paredes de los vasos sanguíneos) mientras están en la circulación sanguínea. Debe observarse que las diversas realizaciones no están necesariamente limitadas a la encapsulación de nanopartículas o a cualquier vehículo portador particular a menos que se mencione expresamente como tal en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el portador inerte puede ser una versión PEGilada o polimerizada de mioglobina.

En diversas realizaciones, la mioglobina puede encapsularse en vehículos portadores que tienen características que permiten su acumulación alrededor de las regiones tumorales y/o son capaces de dirigirse a tumores que experimentan una baja tensión de oxígeno. El vehículo portador también puede tener características tales que el oxígeno se difundirá desde el interior del vehículo a regiones con baja tensión de oxígeno (como existe en el centro de los tumores) mientras que la mioglobina permanece encapsulada. El agente de alta afinidad al oxígeno, mioglobina, es adecuado para liberar oxígeno a la tensión de oxígeno requerida para aumentar la eficacia de la radiación debido a las características del gradiente de presión parcial de oxígeno de la mioglobina.

En diversas realizaciones, la mioglobina del agente de alta afinidad al oxígeno se puede encapsular en un vehículo que comprende polímeros biodegradables (por ejemplo, polimerosomas, nanopartículas, etc.). La encapsulación de la mioglobina como agente de alta afinidad al oxígeno en vehículos poliméricos biodegradables protege a la mioglobina del contacto con la sangre y los tejidos, reduciendo así la toxicidad a la vez que mantiene altas concentraciones internas de oxígeno hasta que los vehículos se posicionan dentro de los tejidos tumorales hipóxicos. En una realización, la mioglobina se puede encapsular de tal manera que esté altamente concentrada dentro del interior acuoso del vehículo portador. Los agentes pueden encapsularse de manera tal que el vehículo portador (por ejemplo, la envoltura de nanopartículas) evite que la mioglobina encapsulada interactúe con las paredes de los vasos sanguíneos, evitando que el óxido nítrico se absorba en la nanopartícula y/o se una a la mioglobina encapsulada.

En diversas realizaciones, los agentes de unión a oxígeno de alta afinidad pueden ser mioglobina humana no modificada, mioglobina no modificada de otra especie biológica, mioglobina modificada química o genéticamente de humanos o de otra especie biológica, que se une al oxígeno fuertemente a las tensiones de unión fisiológicas al oxígeno como se encuentra en los pulmones y eso lo libera solo a las tensiones de oxígeno más bajas que se encuentran en los tumores hipóxicos. En diversas realizaciones, el vehículo portador inerte puede ser uno cualquiera o más de una emulsión de liposomas, polimerosomas, micelas, lipoproteínas modificadas, nanopartículas sólidas, partículas sólidas de tamaño micrométrico, lípidos o perfluorocarbono, dendrímero, virus o partículas similares a virus. En otras realizaciones, el vehículo portador inerte puede ser una versión PEGilada o polimerizada de mioglobina como agente de unión a oxígeno de alta afinidad. En una realización preferida, la mioglobina humana puede encapsularse dentro de nanopartículas, vesículas de polímero y/o polimerosomas. En diversas realizaciones, las nanopartículas, las vesículas poliméricas y/o los polimerosomas pueden construirse a partir de uno de una serie de diferentes materiales biodegradables.

El agente de unión a oxígeno de alta afinidad comprende mioglobina. La mioglobina (Mb) es una proteína hemo citoplasmática que desempeña un papel bien caracterizado en el transporte de O₂ y en la eliminación de radicales libres en el músculo esquelético y cardíaco (dos tejidos, en particular, con una baja incidencia de malignidad).^{93, 94} Las funciones relacionadas con el oxígeno de la mioglobina son múltiples e incluyen al menos 3 actividades diferentes. Primero, la mioglobina actúa como un reservorio de oxígeno, que posee una afinidad al O₂ mucho mayor que la de la hemoglobina (Mb) (P50-Mb = 2.75 vs. P50-Hb = 25-50 mm Hg). La mioglobina se une al O₂ en condiciones aeróbicas y lo libera en condiciones hipóxicas,⁹⁵ como se encuentra en los tumores. En segundo lugar, la mioglobina es capaz de amortiguar el O₂ intracelular descargando su oxígeno, ya que la pO₂ citoplásmica cae a niveles bajos, lo que promueve la fosforilación oxidativa continua.⁹⁶ En tercer lugar, la mioglobina complementa el suministro de O₂ simple trabajando como un portador en un proceso conocido como facilitación de la difusión de O₂.⁹⁷

Recientemente se ha demostrado que la mioglobina es un modulador de la hipoxia tumoral.^{98, 99} La transferencia del gen de la mioglobina en un pulmonar humano xenotransplantado en ratón proporcionó un modelo válido para estudiar el papel de O₂ y ROS en la progresión tumoral. Al habilitar la fosforilación oxidativa bajo una pO₂ baja, la mioglobina evita aún más la formación inicial de ROS en condiciones hipóxicas y mitiga la respuesta tumorigénica.^{98, 99} En estos modelos de cáncer de ratón, la expresión de mioglobina dio lugar a un retraso en la implantación del tumor, redujo el crecimiento del xenoinjerto y generó niveles mínimos de HIF-1.⁹⁸ La angiogénesis y la invasión también fueron fuertemente inhibidas.⁹⁸ Estos efectos no se observaron al usar formas de mioglobina con mutación puntual, incapaces de unirse al O₂ pero capaces de eliminar los radicales libres.⁹⁸ En conjunto, estos datos sugieren que la hipoxia no es solo un epifenómeno asociado con crecimiento desregulado, sino también un factor clave que impulsa la progresión del tumor. También sugieren que las funciones pleiotrópicas de la mioglobina afectan la biología del cáncer de múltiples maneras.

Si bien la mioglobina ha demostrado que modula la hipoxia tumoral, su utilidad clínica como agente terapéutico de O₂ requiere superar dos obstáculos principales relacionados con su infusión intravascular libre: 1) vasoconstricción, hipertensión, flujo sanguíneo reducido y daño vascular en animales debido al atrapamiento de óxido nítrico derivado del endotelio (NO); y 2) nefrotoxicidad vista con rabdomiólisis. En las diversas realizaciones, las limitaciones del uso de la mioglobina como portador de oxígeno pueden superarse encapsulando la mioglobina dentro de un vehículo polimérico apropiado (por ejemplo, un polimerosoma) para mejorar su administración específica del tumor y para mitigar su exposición sistémica.

Los polímeros^{38, 39} son vesículas de polímero sintético que se forman en dimensiones nanométricas (50 a 300 nm de diámetro) y exhiben varias propiedades favorables como portadores de oxígeno celulares. Por ejemplo, los polimerosomas pertenecen a la clase de vesículas bicapa y multicapa que pueden generarse a través del autoensamblaje y pueden encapsular compuestos hidrofílicos como la hemoglobina (Hb) y la mioglobina (Mb) en su núcleo acuoso.^{40, 41} Además, los polimerosomas ofrecen varias opciones para ser diseñados a partir de componentes totalmente biodegradables aprobados por la FDA y no presentan toxicidad in vitro o in vivo aguda.

Los polímeros exhiben varias propiedades superiores sobre los liposomas y otros vehículos de administración basados en nanopartículas que los convierten en portadores de oxígeno MBOC basados en mioglobina. Por ejemplo, dependiendo de la estructura de sus bloques de copolímero componente, las membranas de los polímeros pueden ser significativamente más gruesas (~9-22 nm) que las de los liposomas (3-4 nm), lo que las hace 5-50 veces más resistentes mecánicamente y al menos 10 veces más menos permeable al agua que los liposomas.^{46, 47} La vida media circulatoria de los polimerosomas, con ramificaciones de poli(óxido de etileno) (PEO) que varían de 1.2 a 3.7 kDa, es análoga a la de los liposomas basados en poli(etilenglicol) (PEG-liposomas) de tamaños similares (-24-48 horas) y se pueden adaptar aún más específicamente mediante el uso de una variedad de copolímeros como bloques de construcción compuestos.⁴⁸ Se ha demostrado que los polimerosomas son estables durante varios meses in situ y durante varios días en la plasma sanguíneo en condiciones cuasi fisiológicas bien mezcladas, sin experimentar ningún cambio en el tamaño de la vesícula y la morfología.^{40, 48} No muestran transiciones térmicas en la superficie de hasta 60°C.^{37, 48} Además, los primeros estudios en animales sobre formulaciones de polimerosomas basadas en PEO-b-PCL y poli(óxido de etileno)-bloque-poli(butadieno)-(PEO-b-PBD-) que encapsulan doxorubicina no han mostrado toxicidades agudas o subagudas. Finalmente, la producción y almacenamiento de polimerosomas son económicas. Los polímeros pueden producirse y almacenarse fácilmente a gran escala sin requerir costosos procesos de purificación posteriores a la fabricación.

Se ha planteado la hipótesis de que las formulaciones de mioglobina (PEM) biodegradables más prometedoras se componen de copolímeros de bloques que consisten en el poli(óxido de etileno) biocompatible (PEO) hidrófilo, que es químicamente sinónimo de PEG, unido a varios alifáticos hidrófobos poli(anhídridos), poli(ácidos nucleicos), poli(ésteres), poli(ortoésteres), poli(péptidos), poli(fosfazenos) y poli(sacáridos), incluidos, entre otros, poli(lactida) (PLA), poli(glicolida) (PLGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y poli(carbonato de trimetileno) (PTMC). Los polimerosomas que comprenden superficies PEGiladas al 100% poseen una estabilidad química *in vitro* mejorada, una biodisponibilidad *in vivo* aumentada y una vida media circulatoria sanguínea prolongada^{42, 43}. Por ejemplo, los poliésteres alifáticos, que constituyen las porciones de membrana de los polimerosomas, se degradan por hidrólisis de sus enlaces éster en condiciones fisiológicas como en el cuerpo humano. Debido a su naturaleza biodegradable, los poliésteres alifáticos han recibido una gran atención por su uso como biomateriales implantables en dispositivos de administración de fármacos, suturas bioabsorbibles, barreras de adhesión y andamiajes para la reparación de lesiones mediante ingeniería tisular.^{44, 45}

En comparación con los otros poliésteres alifáticos biodegradables, la poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y sus derivados tienen varias propiedades ventajosas que incluyen: 1) alta permeabilidad a moléculas pequeñas de fármaco; 2) mantenimiento de un entorno de pH neutro tras la degradación; 3) facilidad en la formación de mezclas con otros polímeros; y 4) idoneidad para el suministro a largo plazo proporcionado por una cinética de erosión lenta en comparación con PLA, PGA y PLGA.⁴⁵ La utilización de ϵ -caprolactona (o derivados tales como γ -metil ϵ -caprolactona) como las capas de formación de membrana en las formulaciones de mioglobina encapsulada en polimerosoma (PEM) prometen que los portadores de oxígeno basados en mioglobina celular (MBOC) resultantes tendrán una degradación *in vivo* segura y completa.

Se ha demostrado previamente que los polimerosomas completamente biodegradables y biorreabsorbibles se generan a través del autoensamblaje en la hidratación acuosa de copolímeros dibloque anfífilos de PEO-b-PCL³⁹. Más de 20 copolímeros de PEO-b-PCL, que varían en los pesos moleculares de los componentes básicos, se han probado previamente para la generación de polimerosomas bicapa estables. Sin embargo, como se ilustra en la Figura 4(A), solo los copolímeros dibloque de PEO-b-PCL en los que el bloque de PEO fue de 1-5 kDa y el 10-20% de la masa de polímero en peso han demostrado un rendimiento consistente y significativo de polimerosomas monodispersos estables, con diámetros medios de partículas de <200 nm y grosores de membrana de 9-22 nm después de la extrusión a través de membranas de corte de poro de 200 nm de diámetro. Posteriormente, se ha demostrado que los polimerosomas de PEO-b-PCL son capaces de cargar la doxorubicina (DOX) del medicamento antineoplásico usando un gradiente de sulfato de amonio. Como se ilustra en la Figura 4(B), la estabilidad *in vitro*, el mecanismo de degradación y la velocidad de liberación del fármaco a partir de los polímeros de PEO(2kDa)-b-PCL(12kDa) cargados con DOX se evaluaron en función del pH durante 14 días. Si bien la cinética de liberación varió en condiciones de pH neutro y ácido (5.5 y 7.4, a 37°C), se observó una fase de liberación de estallido inicial (aproximadamente el 20% de la carga útil inicial dentro de las primeras 8 h) en ambas condiciones de pH por una liberación más controlada y dependiente del pH durante varios días. A un pH de 7.4, los estudios de liberación cinética sugieren que las moléculas encapsuladas escapan inicialmente del polimerosoma a través de la difusión pasiva del fármaco a través de la membrana intacta de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (días 1-4), y posteriormente a través de la degradación de la matriz hidrolítica de PCL (días 5-14). Sin embargo, a un pH de 5.5, parece que el mecanismo dominante de liberación, tanto a corto como a largo tiempo, es la hidrólisis de la membrana PCL catalizada por ácido. En particular, estos polimerosomas completamente biodegradables tienen una vida media ($\tau_{1/2}$) de circulación (24-48 h) que es mucho más corta que su vida media ($\tau_{1/2}$) de liberación (2 semanas a pH 7.4).

La Figura 5 ilustra el campo brillante (A), (B) la tensión de oxígeno en % de oxígeno y (C) la vasculatura sanguínea funcional para un tumor de cámara de ventana. En esta ilustración, el tumor es la región relativamente oscura en el panel A en el centro-izquierda. La saturación de oxígeno (C) se muestra en una escala de color cuyo brillo está modulado por el contenido total de O₂ (por lo tanto, las regiones bien vascularizadas aparecen brillantes). La región del tumor muestra una concentración de oxígeno altamente heterogénea (B), con un pico central en la tensión de oxígeno, así como una región periférica (superior y derecha) que es altamente hipóxica. El mapa compuesto muestra un contraste significativo con el tejido normal circundante debido a la angiogénesis en todo el tumor, lo que hace que parezca brillante nebuloso. Como es evidente en el ejemplo ilustrado de la Figura 5, el contenido de O₂ (medido por la presión parcial de oxígeno en varios puntos) es heterogéneo en todo el parénquima tumoral, pero las tensiones de oxígeno más bajas (las áreas más oscuras demarcadas por pO₂ <10 mm Hg) se pueden encontrar dentro del centro del tumor. Es dentro de estas áreas con baja carga de pO₂ donde los tumores tienden a sobreregular la cascada de señalización HIF-1, lo que lleva a un fenotipo tumorigénico más agresivo que es resistente a la radiación y las quimioterapias y que tiene una mayor tendencia a generar metástasis en otros lugares. Como tal, aumentar las tensiones mínimas de oxígeno encontradas dentro del tumor heterogéneo puede ser tan importante como aumentar la pO₂ global del tumor cuando se trata de un objetivo terapéutico.

La Figura 6A ilustra que solo los copolímeros dibloque de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(ϵ -caprolactona) (PEO-b-PCL) en los cuales el bloque de PEO fue 1-5 kDa y el 10-20% de la masa de polímero en peso tienen demostraron un rendimiento consistente y significativo de polimerosomas monodispersos estables, con diámetros medios de partículas de <200 nm y grosores de membrana de 9-22 nm después de la extrusión a través de membranas de corte de poro de 200 nm de diámetro. Posteriormente, se ha demostrado que los polimerosomas de PEO-b-PCL son capaces de cargar la doxorubicina (DOX) del medicamento antineoplásico usando un gradiente de sulfato de amonio.

La Figura 6B ilustra la estabilidad in vitro, el mecanismo de degradación y la velocidad de liberación del fármaco a partir de los polimerosomas PEO(2kDa)-b-PCL(12kDa) cargados con DOX evaluados como una función del pH durante 14 días. La Figura 7B muestra que, si bien la cinética de liberación varió en condiciones de pH neutro y ácido (5.5 y 7.4, a 37°C), se observó una fase de liberación de estallido inicial (aproximadamente el 20% de la carga útil inicial dentro de las primeras 8 h) en ambas condiciones de pH seguidas de una liberación más controlada y dependiente del pH durante varios días. A un pH de 7.4, los estudios de liberación cinética muestran que las moléculas encapsuladas escapan inicialmente del polimerosoma a través de la difusión pasiva del fármaco a través de la membrana de PCL intacta (días 1-4), y posteriormente a través de la degradación de la PCL hidrolítica (días 5-14). Sin embargo, a un pH de 5.5, el mecanismo dominante de liberación, tanto a corto como a largo tiempo, es la hidrólisis catalizada por ácido de la membrana de PCL. Notablemente, estos polimerosomas completamente biodegradables tienen una vida media de circulación $t_{1/2}$ (24-48 h) que es mucho más corta que su vida media de liberación $t_{1/2}$ (2 semanas a pH 7.4). Como tales, se puede esperar que los polimerosomas circulen en el torrente sanguíneo relativamente intactos y liberarán sus contenidos encapsulados de una manera acelerada solo cuando se exponen a ambientes de pH más bajo, como se encuentra en los tumores hipóxicos.

La Figura 7A ilustra la acumulación de un portador de realización (Polimerosomas) en tumores como se demuestra a través de imágenes ópticas in vivo de fluoróforos (NIR) de infrarrojo cercano basados en oligo(porfirina) (NIRF) o que se incorporan dentro de las capas de membrana de los polimerosomas. Esta figura ilustra que los polimerosomas pueden acumularse alrededor del tumor a través de una modalidad de direccionamiento pasivo debido al aumento de la permeación y el efecto de retención (EPR) asociado con la microvasculatura tumoral con fugas. Aumentos adicionales en la acumulación de polimerosomas pueden ser ayudados a través de la inclusión de moléculas dirigidas que aumentarán la concentración de polimerosomas en el sitio del tumor.

La Figura 7B es un gráfico lineal del crecimiento tumoral in vivo inhibido por la solución salina regulada con fosfato (PBS), doxorubicina (Dox), liposoma y Polimerosoma. Esta figura ilustra que no solo los polimerosomas pueden acumularse alrededor de los tumores (como se ve en la Figura 7a) sino que lo hacen en cantidades suficientes y con estabilidad intravascular preservada para permitir la liberación efectiva de su carga útil de encapsulante en el sitio del tumor para alterar la biología tumoral. Cuando se comparan diferentes vehículos de administración biodegradables (por ejemplo, polimerosomas vs liposomas vs fármacos libres), la capacidad superior de los polimerosomas para lograr estos resultados es evidente.

La Figura 8A ilustra las eficiencias de encapsulación de hemoglobina de cuatro formulaciones de agentes encapsulados en polimerosoma extrudidos a través de membranas de policarbonato de 200 nm de diámetro. Específicamente, la Figura 8A ilustra la eficiencia de encapsulación de hemoglobina de PEO-b-PCL-1(1.65 kDa), PEO-b-PCL-2(15 kDa), PEO-b-PLA-1(10 kDa) y PEO-b-PLA-2(2.45 kDa). Como se discutió anteriormente, las diversas realizaciones proporcionan una metodología para generar constructos que tienen un radio promedio entre 100-125 nm con un índice de polidispersidad <1.1 y una eficiencia de encapsulación de hemoglobina $>50\%$.

La Figura 8B ilustra el P_{50} (mm Hg) de glóbulos rojos, hemoglobina y cuatro formulaciones de hemoglobina encapsulada en polimerosoma (PEO-b-PCL-1(1.65 kDa), PEO-b-PCL-2(15 kDa), PEO-b-PLA-1(10 kDa) y PEO-b-PLA-2(2.45 kDa) extrudidos a través de membranas de policarbonato de 200 nm de diámetro.

Como se discutió anteriormente, los polímeros son macromoléculas que comprenden moléculas monoméricas químicamente conjugadas, en donde las unidades monoméricas son de un solo tipo (homogéneas) o de una variedad de tipos (heterogéneas). El comportamiento físico de los polímeros puede ser dictado por varios factores, que incluyen: el peso molecular total, la composición del polímero (por ejemplo, las concentraciones relativas de diferentes monómeros), la identidad química de cada unidad monomérica y su interacción con un disolvente, y la arquitectura del polímero (ya sea de cadena simple o de cadenas ramificadas). Por ejemplo, en el polietilenglicol (PEG), que es un polímero de etilenglicol (EG), cuya longitud de cadena, cuando se une covalentemente a un fosfolípido, optimiza la vida de circulación de un liposoma, se sabe que está en el rango aproximado de 34-114 monómeros unidos covalentemente (EG34 a EG114). Las realizaciones preferidas comprenden copolímeros hidrófilos de óxido de polietileno (PEO), un polímero relacionado con PEG, y uno de varios bloques hidrófobos que impulsan el autoensamblaje de los polimerosomas, hasta micras de diámetro, en agua y otros medios acuosos.

Como se discutió anteriormente, una sustancia anfifílica es una que contiene grupos polares (solubles en agua) e hidrófobos (insolubles en agua). Para formar una membrana estable en el agua, un peso molecular mínimo requerido potencial para un anfífilo debe exceder al del metanol HOCH_3 , que es el anfífilo canónico más pequeño, con un extremo polar ($\text{HO}-$) y el otro extremo hidrófobo ($-\text{CH}_3$). La formación de una fase lamelar estable requiere un anfífilo con un grupo hidrófilo cuya área proyectada sea aproximadamente igual al volumen dividido por la dimensión máxima de la porción hidrófoba del anfífilo.

En algunas realizaciones, el portador de oxígeno, la nanopartícula y/o el polimerosoma no incluyen polietilenglicol (PEG) u óxido de polietileno (PEO) como uno de su pluralidad de polímeros. En algunas realizaciones, el portador de oxígeno, la nanopartícula y/o el polimerosoma incluyen al menos un polímero hidrófilo que es polietilenglicol (PEG) u óxido de polietileno (PEO). En algunas realizaciones, el polímero de PEG o PEO puede variar en peso molecular desde aproximadamente 5 kDaltons (kDa) hasta aproximadamente 50 kDa en peso molecular.

Los anfífilos formadores de lamelas más comunes pueden tener una fracción de volumen hidrófilo entre 20 y 50%. En algunas realizaciones, la fracción de volumen hidrófilo de los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas es de hasta aproximadamente el 20%. En algunas realizaciones, la fracción de volumen hidrófilo de los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas es de hasta aproximadamente el 19%. En algunas realizaciones, la fracción de volumen hidrófilo de los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas es de hasta aproximadamente el 18%. En algunas realizaciones, la fracción de volumen hidrófilo de los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas es de hasta aproximadamente el 17%. En algunas realizaciones, la fracción de volumen hidrófilo de los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas es de hasta aproximadamente el 16%. En algunas realizaciones, la fracción de volumen hidrófilo de los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas es de hasta aproximadamente el 15%. En algunas realizaciones, la fracción de volumen hidrófilo de los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas es inferior al 20%. En algunas realizaciones, la fracción de volumen hidrófilo de los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas es de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%. Debe observarse que la capacidad de las moléculas anfífilas y superanfífilas para autoensamblarse se puede evaluar en gran medida, sin experimentación excesiva, suspendiendo el superanfífilo sintético en solución acuosa y buscando estructuras lamelares y vesiculares como se juzga por simple observación bajo cualquier microscopio óptico básico, microscopio electrónico de transmisión criogénico, o por medio de la dispersión de la luz.

La cantidad efectiva de la composición puede depender de cualquier número de variables, incluidas, sin limitación, la especie, la raza, el tamaño, la altura, el peso, la edad, la salud general del sujeto, el tipo de formulación, el modo o la forma de administración, el tipo y/o la gravedad de la condición particular que se trata, o la necesidad de modular la actividad de la ruta molecular inducida por la asociación del análogo a su receptor. Los expertos en la materia pueden determinar rutinariamente la cantidad efectiva apropiada utilizando técnicas de optimización de rutina y el juicio experto e informado del profesional y otros factores evidentes para los expertos en la materia.

Una dosis terapéuticamente eficaz de los portadores de oxígeno de las diversas realizaciones puede proporcionar actividad biológica parcial o completa en comparación con la actividad biológica de la oxigenación tisular media, mediana o mínima fisiológicamente de un paciente o un sujeto. Una dosis terapéuticamente eficaz de los portadores de oxígeno de las diversas realizaciones puede proporcionar una mejora completa o parcial de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o dolencia.

Los portadores de oxígeno de las diversas realizaciones pueden retrasar la aparición o disminuir las posibilidades de que un sujeto desarrolle uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o dolencia. En algunas realizaciones, una cantidad efectiva es la cantidad de un compuesto adecuado para tratar o prevenir una consecuencia resultante de una oxigenación tisular baja o pobre. De acuerdo con las diversas realizaciones, la cantidad efectiva de compuesto(s) activo(s) adecuada para uso en el tratamiento terapéutico de afecciones causadas por la oxigenación tisular baja o deficiente de la misma varía según la forma de administración, la edad, el peso corporal y la salud general del paciente.

Los anfífilos solubles, proteínas, ligandos, efectores alostéricos, compuestos de unión a oxígeno pueden unirse y/o intercalarse dentro de una membrana. Dicha membrana también debe ser semipermeable a los solutos, con un grosor submicroscópico (d), y ser el resultado de un proceso de autoensamblaje o ensamblaje dirigido. La membrana puede tener propiedades fluidas o sólidas, dependiendo de la temperatura y de la química de los anfífilos a partir de los cuales se forma. A algunas temperaturas, la membrana puede ser fluida (con una viscosidad medible), o puede ser similar a un sólido, con una elasticidad y rigidez a la flexión. La membrana puede almacenar energía a través de su deformación mecánica, o puede almacenar energía eléctrica manteniendo un potencial transmembrana. Bajo ciertas condiciones, las membranas pueden adherirse entre sí y fusionarse (fusionarse).

La mioglobina se usa como el compuesto de unión a oxígeno. En algunas realizaciones, el compuesto de unión a oxígeno es mioglobina modificada genética o químicamente.

En algunas realizaciones, el portador de oxígeno transporta una cantidad eficaz de oxígeno adecuada para tratar a un sujeto o para evitar que un sujeto sufra una enfermedad o trastorno en donde su sangre no transporta ni libera niveles suficientes de oxígeno a los tejidos. En algunas realizaciones, el portador de oxígeno comprende una cantidad eficaz de oxígeno adecuada para tratar o prevenir la propagación del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En algunas realizaciones, el efector alostérico es 2,3-bisfosfoglicerato o un isómero derivado del mismo. Los efectores alostéricos, como el 2,3-bisfosfoglicerato, pueden aumentar la descarga de oxígeno del portador de oxígeno o el polimerosoma de las diversas realizaciones a un tejido o célula que está desoxigenado dentro de un sujeto.

Como se mencionó anteriormente, la tensión de lisis crítica (T_c) es la tensión a la cual una partícula se rompe cuando se somete a una fuerza externa, medida por aspiración de micropipeta y expresada como miliNewtons/metro (mN/m). El cambio en la tensión de lisis crítica de un portador de oxígeno o polimerosoma puede medirse antes y después de la carga del portador de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosoma con mioglobina.

En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de la tensión de lisis crítica de no más del 20%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o

polimerosomas tienen un cambio de tensión de lisis crítica de no más del 19%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de tensión de lisis crítica de no más del 18%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de tensión de lisis crítica de no más del 17%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de tensión de lisis crítica de no más del 16%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de la tensión de lisis crítica de no más del 15%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de tensión de lisis crítica de no más del 14%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio en la tensión de lisis crítica de no más del 13%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de tensión de lisis crítica de no más del 12%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de la tensión de lisis crítica de no más del 11%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de tensión de lisis crítica de no más del 10%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de la tensión de lisis crítica de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas pueden tener un cambio de la tensión de lisis crítica de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de la tensión de lisis crítica de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 20%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un cambio de la tensión de lisis crítica de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%.

Como se mencionó anteriormente, la tensión por área crítica (A_c) es la tensión por área realizada por los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas en la tensión de lisis crítica. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una tensión por área crítica de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una tensión por área crítica de aproximadamente 20% a aproximadamente 25%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una tensión por área crítica de aproximadamente 25% a aproximadamente 30%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una tensión por área crítica de aproximadamente 30% a aproximadamente 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una tensión por área crítica de aproximadamente 35% a aproximadamente 40%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una tensión por área crítica de aproximadamente 40% a aproximadamente 45%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una tensión por área crítica de aproximadamente 45% a aproximadamente 50%.

Como se mencionó anteriormente, una "capacidad de carga de mioglobina" es una medida de un portador de oxígeno basado en mioglobina y se define como el peso de mioglobina dentro del portador de oxígeno dividido por el peso total del portador. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina mayor que aproximadamente 5. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina mayor que 10. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina superior a 15. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina mayor de 20. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, las nanopartículas y/o los polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina superior a 25. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, las nanopartículas y/o los polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina superior a 26. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o los polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina superior a 27. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, las nanopartículas y/o los polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina superior a 28. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina mayor de 29. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una capacidad de carga de mioglobina superior a 30.

Como se mencionó anteriormente, una "eficiencia de carga de mioglobina" es una medida fundamental de un portador de oxígeno basado en mioglobina y se define como el peso de la mioglobina que está encapsulada y/o incorporada dentro de una suspensión portadora dividida por el peso de la mioglobina original en solución antes de la encapsulación (expresado como un %). En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 10%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 11%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 12%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 13%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 14%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 15%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 16%. En diversas realizaciones, los

portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 17%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 18%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 19%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 20%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 21%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 22%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 23%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 24%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 25%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 26%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 27%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 28%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 29%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina superior a aproximadamente el 30%.

En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente 10% a aproximadamente 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente 18% a aproximadamente 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente 20% a aproximadamente 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente 22% a aproximadamente 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente 24% a aproximadamente 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente 26% a aproximadamente 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente 28% a aproximadamente 35%. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una eficiencia de carga de mioglobina de aproximadamente 30% a aproximadamente 35%.

Las diversas realizaciones incluyen composiciones y métodos para fabricar y almacenar portadores de oxígeno que comprenden un compuesto de unión a oxígeno encapsulado en una nanopartícula tal como un polimerosoma. El compuesto de unión al oxígeno comprende mioglobina.

Las diversas realizaciones incluyen composiciones y métodos para fabricar y almacenar portadores de oxígeno que comprenden mioglobina como compuesto de unión a oxígeno encapsulado en un vehículo tal como un polimerosoma.

Algunas realizaciones pueden incluir composiciones y métodos para desarrollar mioglobina encapsulada con polimerosoma (PEM) como portadores de oxígeno. En diversas realizaciones, el PEM puede incluir polimerosomas que comprenden poli(óxido de etileno)-bloque-poli(ϵ -caprolactona) (PEO-b-PCL) y copolímeros dibloque relacionados de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(y-metilo ϵ -caprolactona) (PEO-b-PMCL). El PEO puede proporcionar a los polimerosomas una estabilidad química in vitro mejorada, una biodisponibilidad in vivo aumentada y vidas medias prolongadas en la circulación sanguínea. Tanto PEO-b-PCL como PEO-b-PMCL pueden proporcionar una biodegradación in vivo completa y segura de membranas de polimerosoma a través de la hidrólisis de sus enlaces éster. En diversas realizaciones, las dispersiones de mioglobina (PEM) encapsulada en polimerosoma biodegradables pueden estar compuestas por copolímeros dibloque de PEO-b-PCL con un tamaño de bloque de PEO de ~ 1.5 -2 kDa y con una fracción de bloque de ~ 10 -20% en peso. En diversas realizaciones, las dispersiones de mioglobina (PEM) encapsulada en polimerosoma biodegradables pueden estar compuestas de copolímeros dibloque de PEO-b-PCL con un tamaño de bloque de PCL de ~ 8 kDa-23 kDa y con una fracción de peso en bloque de ~ 50 a 85 por ciento. En otras realizaciones, las dispersiones de PEM pueden comprender copolímeros dibloque de PEO-b-PMCL. Los polimerosomas de PEO-b-PCL y PEO-b-PMCL pueden ser portadores de oxígeno celulares (MBOC) preferidos basados en mioglobina y poseen todas las propiedades necesarias para el suministro efectivo de oxígeno, incluidas las capacidades de enlace de oxígeno ajustables, distribuciones uniformes y de tamaño apropiadamente pequeño, viscosidades parecidas a la sangre humana y propiedades oncóticas, así como la facilidad de producción en masa y un almacenamiento asequible.

En una realización, se puede usar una metodología de autoensamblaje supramolecular para preparar polimerosomas unilamelares monodispersos (50-300 nm de diámetro) que incorporan fluoróforos (NIR) de infrarrojo cercano (NIRF) basados en oligo(porfirina) de alto rendimiento cuántico dentro de sus membranas de bicapa^{124, 130, 114-111}. Estos

polimerosomas NIR emisores brillantes pueden poseer las propiedades fotofísicas y biocompatibilidad requeridas para imágenes ópticas in vivo ultra sensibles.^{111, 124, 164, 168} Los estudios de imagen de ratones con tumores han demostrado que los polimerosomas no dirigidos pueden acumularse en tumores después de la inyección intravascular debido al efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) asociado con microvasculatura tumoral con fugas; el análisis cuantitativo de fluorescencia ha demostrado que se puede lograr fácilmente una acumulación tumoral más de dos veces (Figura 7A).¹⁶⁴ La acumulación específica del tumor puede mejorarse aún más modificando las superficies del polimerosoma a través de la conjugación química con los ligandos dirigidos, como moléculas pequeñas, péptidos, proteínas (ejemplo, anticuerpos) y ácidos nucleicos.^{111, 127, 164} Algunas realizaciones incluyen una metodología operativa para sintetizar dispersiones de PEM que cumplen sistemáticamente las siguientes características estándar:

- (i) radio promedio entre 100-200 nm con índice de polidispersidad <1.1
- (ii) Mb eficiencia de encapsulación >50% en moles;
- (iii) relación en peso de Mb encapsulada: polímero >2;
- (iv) solución metMb nivel <5%;
- (v) viscosidad de suspensión entre 3-4 cP;
- (vi) P50 entre 2-3 mm Hg;
- (vii) al menos un orden de magnitud menor de constante de velocidad de enlace NO medido para Mb libre en peso similar por volumen de distribución;
- (viii) concentración de suspensión final de entre 80 y 180 mg Mb/ml de solución; y
- (ix) excelente estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento y flujo según lo determinado por la morfología intacta, el cambio en el diámetro promedio de partícula <5 nm y la concentración de Mb inalterada (cambio <0.5 g/dL) y el nivel de metMb sin cambios (cambio <2%).

Las diversas formas de realización de PEM pueden diferir en su combinación de tamaño de partícula, deformabilidad y concentración. Cada uno de estos parámetros puede afectar independientemente la cantidad de Mb por partícula, la estabilidad de las partículas y el número de partículas que se acumularán en el sitio del tumor. Se pueden formar PEM que tienen un diámetro medio de partículas de 100 nm o 200 nm. Los polímeros, al igual que otras nanopartículas que tienen un diámetro menor de 250 nm, pueden acumularse en tumores sólidos debido al efecto EPR.^{111, 114, 164} Aunque los polimerosomas con un diámetro particular promedio de 200 nm pueden entregar más Mb por partícula, los que son ~100 nm de diámetro pueden exhibir vidas medias de circulación sanguínea más largas (antes del eventual aclaramiento por la RES)^{102, 111, 114, 136, 172} y pueden demostrar una mayor acumulación de tumores al atravesar los canales de plasma¹⁷³ (pequeños microvasos que excluyen los RBC).

Una realización PEM puede construirse a partir de PEO-b-PCL, poli(óxido de etileno)-bloque poli(γ -metil ϵ -caprolactona) (PEO-b-PMCL) y/o poli(óxido de etileno)-polímeros de poli(trimetilcarbonato) (PEO-b-PTMC) dibloque para determinar el equilibrio final de la estabilidad de la partícula frente a la deformabilidad que puede maximizar la administración in vivo del tumor. PMCL, como un derivado de PCL, forma polimerosomas completamente bioabsorbibles que se degradan a través de la hidrólisis no enzimática de enlaces éster.¹⁷⁴ PEO-b-PCL, sin embargo, puede producir membranas de vesículas sólidas ultraestables mientras que PEO-b-PMCL y PEO-b-TMC puede generar polimerosomas más deformables, una característica que puede ayudar en la etapa de PEM a través de vasos sanguíneos tumorales tortuosos.

Las diversas realizaciones pueden incluir una nanopartícula de polímeros, u otros portadores de oxígeno con tamaños variables. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno incluye una forma aproximadamente esférica y tiene un diámetro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 1 μ m. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 250 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 200 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 300 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 400 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 500 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 600 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 700 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 700 nm a aproximadamente 800 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 800 nm a aproximadamente 900 nm. En diversas realizaciones, el polímero o el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 900 nm a aproximadamente 1 μ m.

En diversas realizaciones, el portador de oxígeno consiste en una nanopartícula que tiene un diámetro de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 100 nm. En diversas realizaciones, el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 10 nm. En diversas realizaciones, el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm. En diversas realizaciones, el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm. En diversas realizaciones, el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 300 nm. En diversas realizaciones, el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm. En diversas realizaciones, el portador de oxígeno tiene un diámetro de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 1 μ m.

En una realización adicional, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas pueden incluir grosores de membrana variables. El grosor de la membrana puede depender del peso molecular de los polímeros y de los tipos de polímeros utilizados en la preparación de los portadores de oxígeno o polimerosomas. En diversas realizaciones, la membrana puede ser una sola capa, doble, triple, cuádruple o más de polímeros. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un espesor de membrana de polímero de

aproximadamente 5 nm a aproximadamente 35 nm. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un grosor de membrana de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 10 nm. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un grosor de membrana de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 15 nm. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un grosor de membrana de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 20 nm. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un grosor de membrana de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 25 nm. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un grosor de membrana de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 30 nm. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen un grosor de membrana de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 35 nm. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una membrana de polímero que no tiene más de aproximadamente 5 nm de grosor. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una membrana de polímero que no tiene más de aproximadamente 10 nm de grosor. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una membrana de polímero que no tiene más de aproximadamente 15 nm de grosor. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una membrana de polímero que no tiene más de aproximadamente 20 nm de grosor. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una membrana de polímero que no tiene más de aproximadamente 25 nm de grosor. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una membrana de polímero que no tiene más de aproximadamente 30 nm de grosor. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas tienen una membrana de polímero que no tiene más de aproximadamente 35 nm de espesor.

La Figura 9 ilustra un método 900 para la preparación de MBOC. En la etapa 902, el portador de oxígeno basado en mioglobina (MBOC) se autoensambla en solución acuosa. En la etapa 904, el portador de oxígeno basado en mioglobina se estabiliza mediante modificación química. En la etapa 906, el constructo resultante se liofiliza. En la etapa 908, el constructo resultante se almacena a través del almacenamiento en fase seca. En la etapa 910, rehidratación de la solución en el punto de atención. En la etapa 912, los MBOC biodegradables que retienen su mioglobina original pueden administrarse in vivo. Como ejemplo no limitativo, los Mb encapsulados en el polimerosoma se pueden preparar y generar a través de un método de preparación de MBOC de este tipo. En la etapa 914, pueden administrarse al tumor de un paciente MBOC y/o un agente de alta afinidad al oxígeno que comprende mioglobina y radiación ionizante.

La Figura 10 ilustra un método 1000 para preparar un polimerosoma que comprende al menos un polímero biocompatible y al menos un polímero biodegradable. Cabe señalar que la Figura 10 proporciona una descripción general de alto nivel de las etapas del método y los detalles de cada etapa se proporcionan más abajo. En la etapa 1002, se puede preparar una solución orgánica que tiene una pluralidad de polímeros. En la etapa 1004, la solución orgánica que comprende la pluralidad de polímeros puede exponerse a un plástico, politetrafluoroetileno (es decir, Teflon™) (aquí "PTFE"), o superficie de vidrio. En la etapa 1006, la solución orgánica puede deshidratarse en la superficie de plástico, PTFE o vidrio para crear una película de polímeros. En la etapa 1008, la película de polímeros puede rehidratarse en una solución acuosa. En la etapa 1010, los polímeros pueden estar entrecruzados en la solución acuosa mediante modificación química.

Los polimerosomas de la diversas realizaciones de PEM pueden comprender copolímeros que se sintetizan para incluir grupos polimerizables dentro de sus bloques hidrófilos o hidrófobos. Los polímeros biodegradables polimerizables se pueden utilizar para formar polimerosomas que incorporan Mb y un iniciador soluble en agua en sus interiores acuosos, o alternativamente, compartimentando Mb en sus cavidades acuosas y un iniciador insoluble en agua en sus membranas hidrófobas.

Las diversas realizaciones pueden incluir además un método para preparar un polimerosoma que comprende al menos un polímero biocompatible y al menos un polímero biodegradable que comprende: (a) preparar una solución orgánica que comprende una pluralidad de polímeros y exponer la solución orgánica que comprende la pluralidad de polímeros a plástico, politetrafluoroetileno (PTFE) (también conocido como Teflon®) o superficie de vidrio; (b) deshidratar la solución orgánica en el plástico, Teflon® o superficie de vidrio para crear una película de polímeros; y (c) rehidratar la película de polímeros en una solución acuosa de mioglobina; (d) entrecruzamiento de los polímeros en la solución acuosa mediante modificación química.

Las composiciones de las diversas realizaciones pueden prepararse mediante métodos de hidratación directa como se describe en O'Neil, et al., Langmuir 2009, 25(16), 9025-9029. Brevemente, los polimerosomas de las diversas realizaciones se pueden hacer y encapsular usando el siguiente método: Para preparar formulaciones, se pueden pesar 20 mg de polímero en un tubo de centrifuga de 1.5 mL, calentar a 95°C durante 20 minutos y mezclar. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente (mínimo 15 minutos), se pueden agregar 10 µL de solución proteica y diluir con 20, 70 y 900 µL de solución salina regulada con fosfato (PBS) de 10 mmol, pH 7.4, con mezcla después de cada adición. Como control, los polimerosomas pueden formarse mediante dilución con PBS (10, 20, 70, 890 µL de PBS con mezcla después de cada adición) y finalmente agregar 10 µL de solución de mioglobina después de la formación de los polimerosomas. De esta manera, la eficiencia de encapsulación y la carga se pueden calcular por sustracción. Todas las muestras se pueden preparar por triplicado. Las eficiencias de encapsulación pueden

cuantificarse a partir de curvas estándar generadas a partir de la entrecruzamiento marcada con fluorescencia a los polímeros de elección bajo investigación.

En un método de realización adicional, la preparación de polímeros puede implicar el fraccionamiento a gran escala de partículas vesiculares. En resumen, un total de 1.25 g de copolímero dibloque se puede hidratar con 25 mL de regulador fosfato 10 mM (PB) a pH 7.3. Debido a la baja solubilidad de los copolímeros dibloque en PB, la mezcla de polímeros acuosos puede someterse a sonicación (Branson Sonifier 450, VWR Scientific, West Chester, PA) durante 8-10 horas a temperatura ambiente para producir la solución de copolímero de reserva. La solución de copolímero de reserva se puede mezclar luego con 25 mL de Mb purificado (250-300 g/L) para producir una concentración de copolímero de 12.5 mg/mL en la mezcla de copolímero de Mb. Los polimerosomas vacíos se pueden preparar diluyendo la solución de copolímero de reserva en PB, en lugar de la solución de Mb purificada, para producir una concentración de copolímero de 12.5 mg/mL. Para el método de extrusión manual de 1 mL de volumen, la mezcla de copolímero/copolímero Mb se puede extrudir 20 veces a través de membranas de policarbonato de 100 nm o 200 nm de diámetro (Avanti PolarLipids, Alabaster, AL). Sin embargo, para el método de extrusión de Fibra Hueca (HF) a gran escala (Figuras 4 y 5), la mezcla de copolímero/copolímero Mb puede extrudirse a través de una membrana de HF de 0.2 μ m (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA). Para ambos métodos de extrusión, las dispersiones de PEM extrudidas se pueden dializar durante la noche utilizando bolsas de diálisis de corte de peso molecular (MWCO) de 300 kDa (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA) en PB a 4°C a una relación Volumen/Volumen 1:1000 (v/v) (PEM extrudido/PB) para eliminar los Mb no encapsulados de la dispersión vesicular. Se puede utilizar un fraccionador de flujo de campo de flujo asimétrico Eclipse (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) acoplado en serie a un fotómetro de dispersión de luz estática de ángulos múltiples Dawn Heleos de 18 ángulos (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) para medir la distribución de tamaño de polimerosomas vacíos y partículas PEM. El fotómetro de dispersión de luz está equipado con un láser GaAs de 30 mW que funciona a una longitud de onda del láser de 658 nm. Los espectros de dispersión de luz pueden analizarse utilizando el paquete de software ASTRA (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) para calcular la distribución del tamaño de partícula. El regulador de elución consistió en PB 10 mM a pH 7.3.

Se debe tener en cuenta que, si bien los valores de diámetro se indican anteriormente, el diámetro final de la membrana de policarbonato a través de la cual se extruden los polimerosomas definirá la distribución de tamaño final (diámetro) de los polimerosomas en esa suspensión.

Encapsulación de Mb en PEM: para medir la cantidad de Mb que se encapsuló dentro de las partículas de PEM, las dispersiones de PEM dializadas se lisaron primero utilizando Triton X100 al 0.5% v/v (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PB. Las muestras de PEM lisadas se pueden centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos, y el sobrenadante se puede recoger para su análisis. La concentración de Mb encapsulada obtenida después de la lisis de las partículas de PEM (mg/mL) se puede medir utilizando el método de Bradford mediante el kit de ensayo de proteínas Coomassie Plus (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Como consecuencia de la reacción de dos o más de los grupos polimerizables facilitados por el iniciador, se pueden generar dispersiones de PEM estabilizadas a través de la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de los copolímeros que forman las membranas de polimerosoma. Estas constructos de PEM estabilizadas se pueden secar más a través de protocolos de liofilización bien establecidos sin alterar la estructura del polimerosoma formado o perder los Mb encapsulados. En diversas realizaciones, los polimerosomas se administran en la solución acuosa. Si se liofilizan, en diversas realizaciones, los polimerosomas se reconstituyen en una solución acuosa apropiada y se administran a un sujeto. El PEM biodegradable liofilizado se puede almacenar en un desecador (libre de O₂) a 4°C durante periodos de tiempo variables sin degradación del polímero o Mb, ya que las suspensiones secas están libres de radicales libres acuosos, protones, etc. Los polimerosomas pueden rehidratarse en el punto de atención previa a la entrega.

Para generar polimerosomas estabilizados, las unidades polimerizables pueden unirse químicamente a los extremos hidrófilos o hidrófobos del copolímero después de la síntesis. Se pueden formar uno o más enlaces cruzados entre las cadenas de copolímero multibloque entre las unidades polimerizables y los polímeros hidrófilos o hidrófobos de las diversas realizaciones. Estos entrecruzamientos pueden formarse adecuadamente introduciendo una composición que tiene múltiples grupos polimerizables a las cadenas de copolímero multibloque, aunque en varios casos, el propio copolímero multibloque incluye múltiples grupos polimerizables. En diversas realizaciones, los múltiples grupos polimerizables se eligen entre acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, vinilos, unidades de vinil sulfona o una combinación de los mismos. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables de aproximadamente 0% en peso (peso) a aproximadamente 5% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables de aproximadamente 5% en peso a aproximadamente 10% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables de aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 20% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables de aproximadamente 20% en peso a aproximadamente 30% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables de aproximadamente 30% en peso a aproximadamente 40% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o

polimerosomas comprenden los grupos polimerizables de aproximadamente 40% en peso a aproximadamente 50% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables de aproximadamente 50% en peso a aproximadamente 60% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables de aproximadamente 60% en peso a aproximadamente 70% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno o los polimerosomas comprenden los grupos polimerizables desde aproximadamente 70% en peso hasta aproximadamente 80% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables desde aproximadamente 80% en peso hasta aproximadamente 90% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables desde aproximadamente el 90% en peso hasta aproximadamente el 95% en peso del peso total de la composición. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas comprenden los grupos polimerizables desde aproximadamente el 95% en peso hasta aproximadamente el 100% en peso del peso total de la composición. La entrecruzamiento entre las cadenas de una membrana se logra mediante la activación de la reacción de polimerización por un iniciador y resulta en la mejora de la rigidez de la composición del polimerosoma. En ciertas realizaciones, el grupo polimerizable puede conjugarse con un bloque hidrófilo de copolímero que consiste en poli(óxido de etileno), poli(etilenglicol), poli(ácido acrílico) y similares. En otras realizaciones, el grupo polimerizable puede conjugarse con el bloque hidrófobo del copolímero que consiste en poli(ϵ -caprolactona), poli(y-metil ϵ -caprolactona), poli(trimetilcarbonato), poli(menturo), poli(lactida), poli(glicolida), poli(metilglicolida), poli(dimetilsiloxano), poli(isobutileno), poli(estireno), poli(etileno), poli(óxido de propileno), etc. El iniciador puede ser una molécula que genera/reacciona al calor, luz, pH, solución iónica, osmolaridad, presiones, etc. En diversas realizaciones, el iniciador puede ser fotorreactivo y entrecruzar los polímeros del portador de oxígeno o el polimerosoma a través de la exposición a la luz ultravioleta.

Las composiciones de las diversas realizaciones se pueden preparar sin el uso de disolventes orgánicos. Las composiciones de las diversas realizaciones pueden incluir polimerosomas que comprenden poli(óxido de etileno)-bloque-poli(ϵ -caprolactona), poli(óxido de etileno)-bloque-poli(y-metil ϵ -caprolactona) y/o), y/o copolímeros de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(trimetilcarbonato) que se han modificado con un resto de acrilato en el extremo del bloque hidrófobo. En diversas realizaciones, los portadores de oxígeno, nanopartículas y/o polimerosomas pueden comprender polímeros entrecruzados formados entre el término de bloque hidrófobo y un diacrilato usando un iniciador de UV, tal como 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA). En diversas realizaciones, el DMPA se compartimenta en la membrana del polimerosoma durante el ensamblaje del polimerosoma mientras que el Mb ocupa el compartimento acuoso interno del vehículo.

La composición de las diversas realizaciones también puede comprender polimerosomas, nanopartículas o portadores de oxígeno que tienen vidas medias degradantes aumentadas. Los tiempos de circulación del portador de oxígeno y los polimerosomas generalmente pueden limitarse a horas (o hasta un día) debido a un rápido aclaramiento por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) del hígado y el bazo, o por excreción. Los estudios clínicos han demostrado que los tiempos de circulación de los portadores esféricos generalmente se pueden extender al triple en humanos que en ratas. Tal como se propuso para las formulaciones farmacológicas de liposomas de PEG utilizadas clínicamente, los portadores de oxígeno y los polimerosomas con una larga vida en circulación pueden aumentar la exposición del fármaco a células cancerosas, tejidos con bajo contenido de oxígeno o heridas en curación, y por lo tanto aumentar la dosis integrada en el tiempo, comúnmente referida en la administración de medicamentos como "el área bajo la curva". Además, el mayor efecto de permeación y retención que permite que pequeños solutos y micelas permeen los vasos sanguíneos con fugas de un tumor en rápida expansión también podría permitir que los portadores de oxígeno y los polimerosomas se transporten al estroma del tumor. La circulación persistente de los portadores de oxígeno y los polimerosomas tiene muchas aplicaciones prácticas porque estos vehículos pueden aumentar la exposición de los medicamentos a las células cancerosas, a los tejidos bajos o pobres en oxígeno, o a las heridas en curación.

Las composiciones de las diversas realizaciones pueden comprender polimerosomas, nanopartículas o portadores de oxígeno que tienen un aumento de la vida media circulatoria. En diversas realizaciones, las composiciones tienen un cierto porcentaje de composición en masa de polímero diseñado para tener una vida media circulatoria de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 36 horas, y una vida media de degradación de aproximadamente 38 a aproximadamente 60 horas.

En diversas realizaciones, las composiciones tienen un cierto porcentaje de composición en masa de polímero diseñado para tener una vida media circulatoria de aproximadamente 12 horas menos que la vida media de degradación del portador de oxígeno o polimerosoma. Este retraso en la degradación puede variar dependiendo de la vía de administración y/o del micro-compartimento objetivo, el tamaño del portador de oxígeno o polímero o microambiente subcelular. En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden polimerosomas, nanopartículas o portadores de oxígeno tienen una vida media circulatoria de aproximadamente 11 horas menos que la vida media de degradación del portador de oxígeno o polimerosoma. En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden polimerosomas, nanopartículas o portadores de oxígeno tienen una vida media circulatoria de aproximadamente 10 horas menos que la vida media de degradación del portador de oxígeno o polimerosoma. En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden polimerosomas, nanopartículas o portadores de oxígeno tienen una vida media circulatoria de aproximadamente 9 horas menos que la vida media de degradación del portador de oxígeno o polimerosoma. En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden polimerosomas,

[illegible][illegible]

diversas realizaciones, la vida media de degradación es aproximadamente 60 horas mayor que la vida media circulatoria. En diversas realizaciones, la vida media de degradación es aproximadamente 72 horas mayor que la vida media circulatoria. En diversas realizaciones, la vida media de degradación es más de 96 horas mayor que la vida media circulatoria.

- 5 El suministro in vivo se puede lograr por vía intravenosa, por inhalación, por vía transmucosa (por ejemplo, bucal) o por vía transcutánea. Las dosis para un huésped dado pueden determinarse usando consideraciones convencionales, por ejemplo, mediante la comparación habitual de las actividades diferenciales de las preparaciones en cuestión y un protocolo farmacológico convencional, conocido y apropiado.

- 10 En una realización, se pueden usar diferentes concentraciones finales de PEM para probar los efectos de la dosis de Mb en la mejora de la oxigenación y mitigar la hipoxia tumoral. Las inyecciones de 100 µL de PEM que contienen 90 o 180 mg Mb/mL pueden dar como resultado dosis de inyección de 450 o 900 mg/kg de Mb, respectivamente, suponiendo un ratón de 20 g. Estas dosis corresponden a la dosis total de inyección de hemoglobina encontrada en 0.5 y 1 unidad de sangre total, asumiendo concentraciones de 15 g/dL en sangre, 450 mL de sangre/unidad, y un humano de 70 kg. Si bien las dosis más altas de PEM probablemente mejoren la administración de tumores de Mb,
- 15 las cantidades incrementadas de Mb libres (liberadas durante la degradación de PEM) también pueden resultar en una captación local de NO, una microperfusión disminuida y una oxigenación ineficaz.¹⁷⁵ En una realización preferida, las concentraciones de polímero asociadas y las dosis de inyección al sujeto pueden variar entre 2.5-18 mg/mL y 12.5-90 mg/kg, asumiendo una relación en peso final de Mb encapsulado:polímero entre 10-35, ambos dentro del rango de estudios previos en animales que no demostraron toxicidades subagudas o agudas in vivo de diversas composiciones de polímeros.^{111, 122, 164, 168, 171}
- 20

- La composición farmacéutica de las diversas realizaciones puede ser un portador de oxígeno que posee diferentes "relaciones de carga" de mioglobina como agente de unión de oxígeno a vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende <5 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg de mioglobina/mg de
- 25 vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mg de vehículo inerte de polímero de mioglobina/mg. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte. En diversas
- 30 realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg de mioglobina/mg de vehículo inerte.

- En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 35 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg Mb/mg de polímero. En diversas realizaciones, las dosificaciones de Mb pueden reemplazarse por el mismo peso de Mb.

- 50 En diversas realizaciones, la composición farmacéutica es una formulación líquida, en donde la dosis puede ser de aproximadamente 1 unidad de composiciones a aproximadamente 50 unidades de suspensión portadora de oxígeno, en donde una unidad de suspensión comprende de aproximadamente 40 g de Mb a aproximadamente 85 g de Mbe. En una realización, el compuesto/agente de alta afinidad al oxígeno tiene una P50 para el oxígeno que es inferior a 5 mm Hg.

- 55 En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 41 gramos de Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 45 gramos de Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 50 gramos de Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 55 gramos de Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 60 gramos de
- 60

Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 65 gramos de Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 70 gramos de Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 75 gramos de Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 80 gramos de Mb. En diversas realizaciones, una unidad de una formulación líquida que comprende la composición farmacéutica comprende aproximadamente 85 gramos de Mb.

En general, una composición farmacéutica de acuerdo con las diversas realizaciones puede comprender una dosis de mioglobina como proteína de unión a oxígeno que puede suspenderse dentro de una solución y administrarse en unidades, donde una unidad es igual a 81 gramos de proteína de unión a oxígeno. Si un sujeto se somete a una cirugía o experimenta una pérdida de sangre, la composición farmacéutica se puede administrar al sujeto de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación, donde la sangre se reemplaza con unidades de formulación líquida: En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 40 g de oxígeno proteína de enlace/unidad de solución a aproximadamente 81 g de proteína de enlace de oxígeno/unidad de solución.

Ejemplos de uso de sangre	Promedio # unidades requeridas por paciente
Accidente de automóvil	50 unidades de sangre
Cirugía de corazón	6 unidades de sangre
	6 unidades de plaquetas
Trasplante de órgano	40 unidades de sangre
	30 unidades de plaquetas
	20 bolsas de crioprecipitado
	25 unidades de plasma fresco congelado
Transplante de médula ósea	120 unidades de plaquetas
	20 unidades de sangre

En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una dosis de aproximadamente 40 g de Mb/unidad de solución a aproximadamente 80 g de Mb/unidad de solución. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una dosis de aproximadamente 50 g de Mb/unidad de solución a aproximadamente 80 g de Mb/unidad de solución. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una dosis de aproximadamente 60 g de Mb/unidad de solución a aproximadamente 80 g de Mb/unidad de solución. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una dosis de aproximadamente 70 g de Mb/unidad de solución a aproximadamente 80 g de Mb/unidad de solución. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una dosis de aproximadamente 60 g de Mb/unidad de solución a aproximadamente 70 g de Mb/unidad de solución.

La dosis de la composición farmacéutica de las diversas realizaciones también se puede medir en gramos de polimerosoma administrado por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 12.5 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 15 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 25 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 35 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 45 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 55 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 65 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 75 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto.

de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 80 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto. En diversas realizaciones, la dosis total comprende de aproximadamente 85 mg de polímero a aproximadamente 90 mg de polímero por kg de un sujeto.

En diversas realizaciones, la composición farmacéutica es una formulación líquida que comprende un efector alostérico tal como 2,3-bisfosfoglicerato, en donde la formulación comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mmol/L de formulación. En diversas realizaciones, la formulación comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mmol de un isómero de 2,3-bisfosfoglicerato por litro de formulación. En diversas realizaciones, la formulación comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mmol de un isómero de 2,3 bisfosfoglicerato por L de formulación. En diversas realizaciones, la formulación comprende aproximadamente 5 mmol de 2,3-bisfosfoglicerato o isómero derivado del mismo por L de formulación. En diversas realizaciones, la formulación comprende aproximadamente 2,25 mmol de 2,3-bisfosfoglicerato o isómero derivado del mismo por unidad (450 mL) de formulación.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o venderse en forma de una suspensión o solución estéril, inyectable, acuosa u oleosa. Esta suspensión o solución puede formularse de acuerdo con la técnica conocida, y puede comprender, además de mioglobina, ingredientes adicionales tales como agentes dispersantes, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica y aceites fijos como mono o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden mioglobina en una preparación liposomal, o como un componente de sistemas de polímeros biodegradables. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales polímeros o hidrófobos farmacéuticamente aceptables, tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble o una sal poco soluble. Las formulaciones descritas en el presente documento también son útiles para el suministro pulmonar y el tratamiento de dichos cánceres del sistema respiratorio o pulmón, también son útiles para el suministro intranasal de una composición farmacéutica de las diversas realizaciones. Dicha formulación adecuada para la administración intranasal es un polvo grueso que comprende mioglobina y que tiene una partícula promedio de aproximadamente 0.2 a 500 micrómetros, administrado por inhalación rápida a través del pasaje nasal desde un contenedor del polvo mantenido cerca de las fosas nasales.

Las diversas composiciones farmacéuticas de realización pueden administrarse para suministrar una dosis de aproximadamente 0.1 g/kg/día a aproximadamente 100 g/kg/día, donde la medida en gramos es igual al peso total de Mb y polímero en la composición farmacéutica. En diversas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0.1 a 1 g/kg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 0.5 g/kg/día a aproximadamente 1.0 g/kg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 1.0 g/kg/día a aproximadamente 1.5 g/kg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 1.5 g/kg/día a aproximadamente 2.0 g/kg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 2.5 g/kg/día a aproximadamente 3.0 g/kg/día. En otra realización, la dosis es 1.0, 2.0, 5.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 g/kg/día, donde la medida en gramos es igual al peso total de Mb y polímero en la composición farmacéutica. En una realización, la administración de una dosis puede resultar en una concentración terapéuticamente efectiva de mioglobina entre 1 μ M y 10 μ M en un tejido enfermo o afectado por cáncer, o tumor de un mamífero cuando se analiza in vivo.

En una realización, una composición farmacéutica, especialmente una usada para fines profilácticos, puede comprender, además, una carga de adyuvante farmacéuticamente aceptable o similar. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de vehículos típicos incluyen solución salina, solución salina regulada y otras sales, lípidos y tensioactivos. El portador de oxígeno o el polimerosoma también pueden liofilizarse y administrarse en forma de un polvo. Tomando las precauciones adecuadas para no desnaturalizar cualquier componente proteico descrito en el presente documento, las preparaciones se pueden esterilizar y, si se desea, se pueden mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, reguladores y similares que no reaccionen de forma perjudicial con el portador de oxígeno o el polimerosoma aquí descrito. También se pueden combinar cuando se desee con otros agentes biológicamente activos, por ejemplo, ADN o ARNm antisentido.

Una composición farmacéutica de las diversas realizaciones puede prepararse, envasarse o venderse a granel, como una dosis unitaria única, o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. La cantidad de mioglobina es generalmente igual a la dosis de mioglobina que se administraría a un sujeto, o una fracción conveniente de dicha dosis, como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis, como sería conocido en la técnica.

Las cantidades relativas de mioglobina, el portador farmacéuticamente aceptable y cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de las diversas realizaciones pueden variar, dependiendo de la identidad, el tamaño y el estado del sujeto que se va a tratar y más dependiendo de la ruta por la cual se administrará la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 100% (p/p) de ingrediente activo.

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer junto con la radioterapia.

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles para prevenir la diseminación o mejorar la quimioterapia y/o la radioterapia de los cánceres que incluyen leucemias, linfomas, meningiomas, tumores mixtos de glándulas salivales, adenomas, carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, disgerminomas, retinoblastomas, tumores de Wilms, neuroblastomas, melanomas y mesoteliomas; según lo representado por varios tipos de cáncer, incluyendo, pero no limitándose a cáncer de mama, sarcomas y otros neoplasmas, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, diversas leucemias y linfomas. Se podría esperar que cualquier otra célula tumoral humana, independientemente de la expresión de p53 funcional, se sometería a tratamiento o prevención mediante los métodos descritos en este documento, aunque el énfasis particular está en las células mamarias y los tumores mamarios.

También útiles en combinación con los métodos proporcionados en las diversas realizaciones pueden ser terapias de quimioterapia, fototerapia, antiangiogénicas o de irradiación, por separado o combinadas, que se pueden usar antes, al mismo tiempo o después de los tratamientos mejorados que se analizan aquí, pero pueden ser utilizadas más efectivamente después de que las células hayan sido sensibilizadas por los métodos presentes. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente quimioterapéutico" significa cualquier agente químico o fármaco utilizado en el tratamiento de quimioterapia, que afecta selectivamente a las células tumorales, incluidos, entre otros, agentes tales como adriamicina, actinomicina D, camptotecina, colchicina, taxol, cisplatino, vincristina, vinblastina y metotrexato. Otros agentes de este tipo son bien conocidos en la técnica.

Las diversas realizaciones también pueden incluir kits que comprenden cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente o composiciones farmacéuticas que comprenden un portador de oxígeno o un polimerosoma, en donde el portador de oxígeno o un polimerosoma comprende mioglobina, al menos un polímero biocompatible y al menos un polímero biodegradable. Según diversas realizaciones, la formulación puede suministrarse como parte de un kit. El kit puede comprender la composición farmacéutica que comprende un portador de oxígeno o un polimerosoma. En otra realización, el kit puede comprender un portador de oxígeno liofilizado o un polimerosoma con una mezcla para rehidratación acuosa. En otra realización, el portador de oxígeno o polimerosoma puede estar en un contenedor mientras que la mezcla para rehidratación está en un segundo contenedor. La mezcla para rehidratación se puede suministrar en forma seca, a la que se puede agregar agua para formar una solución de rehidratación antes de la administración por vía oral, punción venosa, inyección o cualquier otro modo de administración. En diversas realizaciones, el kit puede comprender además un vehículo para la administración de la composición tal como un tubo, un catéter, una jeringa, una aguja y/o una combinación de cualquiera de los anteriores.

Las diversas realizaciones pueden ilustrarse con, pero no se limitan a, los siguientes ejemplos.

Ejemplo I

Métodos y materiales para construir dispersiones de PEM biodegradables con diferentes propiedades fisicoquímicas:

Poli(óxido de etileno)-bloque-poli(ϵ -caprolactona) (PEO-b-PCL) que posee un tamaño de bloque de PEO de -1.5- 4kDa y con una fracción de bloque de PEO de -10-20% en peso se utilizan para formar dispersiones de PEM biodegradables. Copolímeros de poli(óxido de etileno)-bloque-poli(γ -metil- ϵ -caprolactona) (PEO-b-PMCL) y poli(óxido de etileno)-bloque-poli(trimetilcarbonato) (PEO-b-PTMC) de peso molecular variable, la fracción de bloques hidrófobos a hidrófilos y el espesor del núcleo de la polimerosomembrana resultante se incorporan además para generar constructos de PEM que no solo son biodegradables lentamente sino que también son deformables de forma única, permitiendo el paso a través de lechos capilares comprometidos, vía infra. PMCL, como un derivado de PCL, es un polímero completamente bioabsorbible de manera similar que se degrada a través de la escisión no enzimática de sus enlaces éster. Los polímeros compuestos de PEO-b-PTMC y/o PEO-b-PMCL se forman espontáneamente a temperaturas más bajas, con mayores rendimientos, y poseen membranas más viscosas y viscoelásticas en comparación con las compuestas de PEO-b-PCL. También se degradan mucho más lentamente que las vesículas formadas a partir de PEO-b-PGA, PEO-b-PLA o PEO-b-PLGA. Como tales, las dispersiones de PEM derivadas de PEO-b-PCL y PEO-b-PMCL demuestran mayores eficiencias de encapsulación en Mb, diámetros de partículas promedio más pequeños y niveles más bajos de generación de metMb en comparación con los MBOC celulares biodegradables reivindicados en la literatura.

Síntesis de dispersiones de PEM:

Para sintetizar dispersiones de PEM, se pueden adquirir Mb humanos purificados de Sigma-Aldrich® para usarlos como materiales de partida. Se ha demostrado previamente que los copolímeros PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC con un peso molecular de PEO que varía de 1kDa-4kDa proporcionan un rendimiento estable y alto de polimerosomas⁵³. Por ejemplo, el PEO puede tener un peso molecular de 2 kDa y el PMCL puede tener un peso molecular de 9.4 kDa. Al variar las cantidades iniciales de polímero (de 5 mg 20 mg por muestra), así como las concentraciones iniciales de Mb utilizadas en la formación de polímeros (de 100 mg/ml a 300 mg/ml), se generan dispersiones de PEM que difieren en el grado de encapsulaciones de Mb.

Las dispersiones de PEM se formarán utilizando tres metodologías diferentes: 1) "rehidratación en película delgada", que implica la deposición de una solución orgánica de polímero disuelto en una película de teflón, secado de la película en horno de vacío durante la noche para eliminar todo solvente orgánico, inmersión de la película delgada seca de polímero en una solución acuosa de Mb purificada y posterior sonicación con alta frecuencia con calor y, finalmente, extrusión a través de una serie de membranas de poros de diferente tamaño para obtener la dispersión nanométrica de PEM deseada; 2) "hidratación directa", ^{116, 117} donde el polímero seco se mezcla con un peso igual de PEG 500 DME en una relación molar de 1:1, se calienta a 95°C durante 30 minutos, se mezcla vigorosamente, se deja enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de la adición de la solución de Mb, luego se continúa con la mezcla vigorosa y la sonicación, extrusión a través de una serie de membranas de diferentes poros para obtener la dispersión nanométrica de PEM deseada, y finalmente, por separación de PEG 500 ejecutando en una columna de exclusión por tamaño; y 3) hidratación directa en película delgada, donde el polímero seco se mezcla con un peso igual de PEG 500 DME en una relación molar de 1:1 antes de la deposición en Teflon, seguido de secado de esta película durante la noche, calentando a 95°C durante 30 minutos, mezclando vigorosamente, dejando enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de agregar la solución de Mb, mezclando y sometiendo a sonicación más vigorosamente, extruyendo a través de una serie de membranas de diferentes poros para obtener la dispersión nanométrica de PEM deseada, y finalmente, mediante la separación de PEG 500 desarrollándolo en una columna de exclusión por tamaño.

Cada uno de estos métodos produce un alto rendimiento de polimerosomas estables que pueden controlarse de manera efectiva a través de la extrusión por membrana para producir suspensiones unilamelares y monodispersas de PEM que varían de 100 nm a 1 µm de diámetro en tamaño promedio. Aunque la rehidratación con película delgada puede producir una distribución de tamaño de PEM muy estrecha y un % de encapsulación de Mb relativamente más alto debido a los volúmenes de núcleo más grandes disponibles para la encapsulación, ¹¹⁶ la estabilidad de Mb y las dispersiones de PEM resultantes pueden ser demostrablemente más bajas; ¹⁶³ estos resultados pueden deberse a el hecho de que la hidratación y las temperaturas óptimas de sonicación necesarias para generar una composición polimérica dada de polimerosomas pueden estar cerca de la temperatura de desnaturalización de Mb libre (por ejemplo, 60°C utilizados para generar dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL a través de la rehidratación de película delgada)). Los polimerosomas de PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC se formarán por hidratación directa o de película delgada a temperatura ambiente (bajo pO₂ ambiental) y se espera que permitan un mayor rendimiento de PEM con una mayor eficiencia de encapsulación de Mb. Para estudios de imagen NIR concomitantes, pueden generarse constructos de PEM emisores de NIR a través de la incorporación conjunta de NIRF basados en oligo(porfirina) con polímero seco (en una proporción molar de 1:40), ¹⁶⁶ antes de la exposición a la solución acuosa de Mb. Los Mb no encapsulados se separan de todas las dispersiones de PEM mediante diálisis, ultrafiltración y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo II

Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las dispersiones de PEM:

Para verificar la generación de PEM, cada formulación de Mb/polímero se caracteriza por la distribución del tamaño de partícula utilizando dispersión dinámica de la luz (DLS). La estructura y la morfología de la PEM se visualizan directamente mediante microscopía electrónica de transmisión criogénica (crio-TEM). La viscosidad de las diversas dispersiones de PEM se mide utilizando un microviscosímetro. Para medir el % de encapsulación de Mb, se utilizan dos métodos independientes. En el primer método, las dispersiones de PEM se someten a lisis inicialmente con un detergente (por ejemplo, Triton X-100) y la absorbancia de UV del lisado resultante se mide para determinar la masa de Mb y el subsiguiente encapsulado en Mb de la composición de PEM original. ¹⁶² Si bien el cálculo es relativamente sencillo, puede sobreestimar el % de encapsulación a través de algunas suposiciones sobre el volumen de dispersión de Mb total. Como tal, se utiliza un fraccionador asimétrico de flujo de campo acoplado con un refractómetro interferométrico diferencial para medir la concentración de elución, y se determina el Mb no encapsulado del % de encapsulación. ^{162, 176} A partir de estas mediciones, se calcula adicionalmente la relación de peso final de Mb:polímero de las dispersiones de PEM. El % de metMb en cada una de las dispersiones de PEM se determina mediante una metodología análoga al ensayo de cianometMb bien establecido. ^{162, 163}

Ejemplo III

Caracterización de las propiedades transportadoras de oxígeno de las dispersiones de PEM biodegradables:

Las propiedades de unión al oxígeno de las dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL y PEO-b-PMCL se miden usando técnicas establecidas. Las propiedades de unión al oxígeno en equilibrio se caracterizan por completo, así como la cinética de difusión del oxígeno a través de las membranas de polímeros. Con la ayuda de estas mediciones, se determinan las permeabilidades al oxígeno y los coeficientes de difusión de la membrana de oxígeno para estas diversas dispersiones de PEM. Estos parámetros fundamentales son críticos para el diseño óptimo de un MBOC celular exitoso. Se determinan adicionalmente los perfiles de unión de óxido nítrico (NO) de varias dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL y PEO-b-PMCL. Se puede esperar que los MBOC acelulares induzcan vasoconstricción, hipertensión, flujo sanguíneo reducido y daño vascular en animales debido a su atrapamiento de NO derivado del endotelio. Sin embargo, no se espera que el Mb encapsulado en nanopartículas como los polimerosomas, liposomas, micelas, etc., sea similarmente "vasoactivo"; análogos a los de los glóbulos rojos naturales, los liposomas y las membranas polimersómicas deberían retardar efectivamente la unión del NO a través del secuestro efectivo de Mb

del entorno vascular circundante. Las dispersiones de PEM probablemente mostrarán más resistencia a la eliminación de NO debido a sus membranas más gruesas y menores permeabilidades. Finalmente, se realizarán diferentes mediciones de las dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL y PEO-b-PMCL para probar su estabilidad e integridad en condiciones fisiológicas durante períodos de tiempo prolongados.

5 Trabajo experimental:

Caracterización de las propiedades de unión al oxígeno:

Las dispersiones de PEM basadas en equilibrio de oxígeno, tales como P₅₀ de PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC se miden utilizando un analizador Hemox^{51, 52}. La dependencia de estas propiedades de la composición de las dispersiones de PEM se determina utilizando una serie de concentraciones de carga de Mb, así como agregando un efector alostérico como el hexafosfato de inositol en la fase acuosa de los polimerosomas. Esto es especialmente importante para determinar la idoneidad de constructos de PEM basados en PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC para suministrar oxígeno a los tejidos que experimentan una oxigenación normal, así como en condiciones de baja oxigenación. Los resultados de estos experimentos se compararán con respecto a los valores de P₅₀ y n de la solución de Mb libre, así como los valores de Oxyglobin® (Biopure Corp., Cambridge, MA), que es el único agente terapéutico de oxígeno aprobado por la FDA para uso veterinario.

Además de estas mediciones de equilibrio, la cinética de la difusión de oxígeno a través de las membranas de PEM y la unión a liberación de Mb para diferentes dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC se determinan utilizando un microelectrodo de oxígeno altamente sensible. Las mediciones de diversos PEM se comparan con las de las dispersiones de polimerosomas libres de Mb y vacías (sin Mb) para delinear los roles de difusión y unión en la captación de O₂. Los resultados de estos experimentos se analizan con la ayuda de un modelo de transporte de difusión-reacción para determinar la permeabilidad al oxígeno de diferentes membranas de polímeros; se espera una correlación entre las propiedades difusoras de diversas membranas de copolímero dibloque y las propiedades de unión al oxígeno medidas de las formulaciones de PEM.

Caracterización de las propiedades de unión a NO:

La unión a NO de las dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC en condiciones oxigenadas y desoxigenadas se estudia sistemáticamente mediante el uso de espectroscopía de flujo interrumpido.^{177, 178} El curso temporal de la unión se mide tomando exploraciones de absorbancia rápida de las diversas dispersiones de PEM oxigenadas o desoxigenadas que se mezclan rápidamente con una solución que contiene NO. Se espera que un rango de concentraciones de carga de Mb, las concentraciones de dispersión de PEM y los tamaños de PEM alteren los resultados de estos experimentos. De manera similar, las funciones de la difusión de NO y la unión en la absorción de NO por PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL, y constructos PEM basados en PEO-b-PTMC se caracterizan además por la realización de experimentos que comparan PEM, Mb libre y polimerosomas vacíos utilizando un microelectrodo de NO. A través de estos estudios exhaustivos, se establecen las constantes de velocidad de unión a NO para las dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC en diferentes condiciones y se comparan con los resultados de Mb libre en solución, liposoma encapsulado Mb (LEM) y Oxyglobin®.

Caracterización de la estabilidad e integridad de las dispersiones de PEM:

Para probar la estabilidad de varias dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC, se almacenan en solución salina y en plasma sanguíneo a 4°C y a 37°C durante varios días; los cambios en la morfología de PEM y la distribución de tamaños se evalúan utilizando cryo-TEM y DLS, respectivamente. De manera similar, los cambios in situ en la concentración de Mb, el nivel de metMb, la absorción de NO y la liberación de Mb a partir de PEM biodegradables en diversas condiciones de solución (por ejemplo, temperatura, pH, pO₂ y pNO) y en diversos puntos de tiempo se prueban utilizando las técnicas descritas en este documento. Estos estudios utilizan espectroscopía de absorción electrónica y cálculos de concentración basados en coeficientes de extinción conocidos para Mb¹⁷⁹⁻¹⁸⁸ metilado, unido a NO y oxigenado.

45 Medición de la tensión de lisis crítica, tensión por área crítica mediante aspiración con micropipeta:

La aspiración con micropipeta de los polimerosomas que encapsulan Mb sigue procedimientos análogos a los descritos en las referencias anteriores. En resumen, las micropipetas hechas de tubos de vidrio de borosilicato (Friedrich and Dimmock, Milville, NJ) se preparan utilizando un extractor de agujas/pipetas (modelo 730, David Kopf Instruments, Tujunga, CA) y se microforjan utilizando una perla de vidrio para dar a la punta un aspecto suave y borde plano. Los diámetros internos de las micropipetas varían de 1 a 6 µm y se miden utilizando un software para generación de imágenes por ordenador. Las pipetas se utilizan para recolectar los polimerosomas cargados y descargados de Mb y aplicar tensión a sus membranas. Las micropipetas se llenan con solución de PBS y se conectan a una estación de aspiración montada en el lado de un microscopio invertido Zeiss, equipado con un manómetro, un transductor de presión Validyne (modelos DP 15-32 y DP 103-14, Validyne Engineering Corp., Northridge, CA), lecturas de presión digitales, micromanipuladores (modelo WR-6, Narishige, Tokio, Japón) y milimanipuladores MellesGriot (curso x, y, z control). La presión de succión se aplica a través de una jeringa conectada al manómetro. Los experimentos se realizan en soluciones de PBS que tienen osmolalidades de 310-320 mOsm para hacer que los polimerosomas estén flácidos (la solución de vesícula interna era típicamente sacarosa 290-300 mOsm). Las osmolalidades de las soluciones se

miden utilizando un osmómetro. Dado que la sacarosa y el PBS tienen densidades e índices de refracción diferentes, los polimerosomas se asientan en la solución y son fácilmente visibles bajo contraste de fases o la óptica DIC.

Ejemplo IV

- 5 Desarrollo de dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC que son capaces de almacenamiento en seco, rehidratación en el punto de atención y administración in vivo:

Síntesis de polímeros:

- 10 Los copolímeros dibloque modificados con acrilato (por ejemplo, un polímero basados en PEO-b-PCL modificado con acrilato) se sintetizan de acuerdo con los procedimientos estándar utilizando octoato estannoso como catalizador. Por ejemplo, se encuentra que el acrílico de PEO-b-PCL tiene un peso molecular promedio en número de 14 kDa (12 y 2 kDa para los bloques de PCL y PEO, respectivamente). Estos se determinan al calibrar los picos de RMN al grupo metoxi terminal en el PEO a aproximadamente 3.4 ppm. La polidispersidad del polímero es <1.5. La acrilación del extremo OH del bloque PCL no conduce a un cambio significativo en el tamaño o la distribución del polímero después de la segunda purificación. Se ha encontrado que la eficiencia de acrilación es del 99%.

Formación de dispersiones de PEM:

- 15 Para sintetizar dispersiones de PEM que comprenden polímeros modificados con acrilato (por ejemplo, dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL-acrilato), se utiliza Mb humano puro como materiales de partida. Los Mb humanos puros se pueden adquirir en Sigma-Aldrich®. PEO(2k)-b-PCL (12k)-acrilato de polímero y 2,2dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) se secan en Teflon® rugoso mediante disolución en cloruro de metileno a una relación molar de 1:1, deposición sobre Teflon®, y evaporación del disolvente orgánico. Variando la cantidad de polímero modificado con acrilato (por ejemplo, PEO(2k)-b-PCL (12k)-polímero de acrilato, de 5 mg a 20 mg por muestra), así como las concentraciones
20 iniciales de Mb acuoso utilizadas en la formación de polimerosomas (de 100 mg/ml a 300 mg/ml), se generan dispersiones de PEM que compartimentan DMPA en sus membranas y que difieren en el grado de encapsulación de Mb acuoso. Las dispersiones de PEM se forman utilizando tres metodologías bien establecidas: 1) rehidratación con película fina, 2) hidratación directa y 3) hidratación directa con película delgada (véase el Ejemplo I). Cada uno de
25 estos métodos produce un alto rendimiento de polimerosomas estables que pueden controlarse de manera efectiva a través de la extrusión por membrana para producir suspensiones unilamelares y monodispersas de PEM que varían de 100 nm a 1 µm de diámetro en tamaño promedio. Si bien la rehidratación con película delgada puede producir una distribución de tamaño de PEM muy estrecha y posiblemente un % de encapsulación de Mb más alto debido a los volúmenes de núcleo más grandes disponibles para la encapsulación,¹¹⁶ la estabilidad de Mb y las dispersiones de
30 PEM basadas en PEO-b-PCL resultantes pueden ser demostrablemente bajas;¹⁶³ estos resultados pueden deberse al hecho de que la temperatura de hidratación para PEO-b-PCL es cercana a la temperatura de desnaturalización de Mb libre. Los polimerosomas de PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC se forman por hidratación directa o hidratación directa en película delgada a temperatura ambiente (bajo pO₂ ambiental) y se espera que permitan un mayor rendimiento de PEM con una mayor eficiencia de encapsulación de Mb. Para los estudios de imagen NIR concomitantes, las
35 constructos de PEM emisores de NIR se generan a través de la incorporación conjunta de NIRF basados en oligo(porfirina) con polímero seco (en una proporción molar de 1:40),¹⁶⁶ antes de la exposición a la solución acuosa de Mb. Los Mb no encapsulados se separan de todas las dispersiones de PEM mediante diálisis, ultrafiltración o cromatografía de exclusión por tamaño.

Estabilización de membranas PEM después de la formación:

- 40 Una vez ensamblados, los polimerosomas modificados con acrilato que comprenden las membranas de las dispersiones de PEM (por ejemplo, PEO-b-PCL-acrilato) se pueden entrecruzar mediante la exposición a la luz UV que induce una polimerización radical de los grupos acrílicos mediante la activación del fotoiniciador DMPA incorporado en las membranas del polimerosoma. Este enfoque no impide la hidrólisis del bloque biodegradable (por ejemplo, la cadena PCL de PEO-b-PCL-acrilato) y produce monómeros degradados (por ejemplo, unidades de oligo-caprolactona), PEO y
45 cadenas cinéticas de poli(ácido acrílico) como la degradación productos. Mb está protegido de la degradación fotoinducida de la formación de metMb por coencapsulación de NAC o azul de metileno con Mb dentro del núcleo acuoso de los polimerosomas. La polimerización de las membranas de las vesículas procede de la exposición de los polímeros modificados con acrilato incorporados con DMPA (por ejemplo, PEO-b-PCL-acrilato) que componen las dispersiones de PEM utilizando luz UV generada por una lámpara de curado por puntos OmniCure Serie 1000 con
50 una lente colimadora (Exfo, Ontario, Canadá; 365 nm, 55 mW/cm²) durante 10-30 min.

Liofilización y almacenamiento en fase seca:

- La liofilización se realiza mediante secado por congelación de las dispersiones de PEM modificadas con acrilato (por ejemplo, acrilato de PEM de PEO-b-PCL) después de la exposición a la luz UV mediante la colocación en nitrógeno líquido hasta que cesa el burbujeo. Las dispersiones de PEM congeladas se colocan luego en un liofilizador de mesa (FreeZone 4.5 L Benchtop Freeze Dry System, Labconco, Kansas City, MO; Modelo 77500) durante 24 h hasta que
55 las muestras estén secas. Las dispersiones de PEM secas y colapsadas se almacenan luego en un desecador bajo gas argón y se colocan a 4°C.

Hidratación en el punto de atención:

Las dispersiones de PEM modificadas con acrílico secas se sacan del desecador y se colocan en un vial. El mismo volumen original de solución acuosa se agrega de nuevo a las muestras para hidratar las vesículas. La rehidratación de polimerosomas se incrementa aún más mediante agitación en vórtice suave durante 10 minutos para lograr la resuspensión completa de la vesícula. Los polimerosomas intactos se verifican mediante DLS, que muestra una agregación de vesículas mínima y no destruye las micelas. La retención de Mb se verifica ejecutando la dispersión de PEM sobre una columna acuosa de exclusión por tamaño y tomando partes alícuotas de las bandas de ejecución para el análisis UV-vis. Solo las bandas correspondientes a los polimerosomas, según se verifica con más detalle por DLS de las alícuotas de elución, contienen Mb según lo evaluado por espectroscopía UV-vis. La estabilidad de los Mb retenidos se verifica además por los espectros UV-vis que no muestran bandas correspondientes a la generación de metMb o cualquier otro producto de desglose de Mb.

Desarrollo de dispersiones de PEM basadas en PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL y PEO-b-PTMC con dianas moleculares:

A través de métodos de conjugación química bien establecidos, las superficies de los polímeros se modifican con diversos ligandos biológicos para impartir una adhesión biológica específica de avidez múltiple. Se puede adoptar una metodología similar para generar dispersiones de PEM encapsuladas con polímeros dirigidos molecular y celularmente que sean capaces de promover, entre otras cosas, la cicatrización de heridas y una mejor eficacia de la radioterapia en los tejidos de hipoxia. Los ligandos biológicos se conjugan a estas nanopartículas a través de una reacción en fase acuosa mediada por carbodiimida-poli-vinil sulfona. El grado de cobertura de la superficie del polimerosoma con el ligando se varía sistemáticamente (de 1% a >10% del área de superficie total de los polimerosomas) mediante el uso de ligandos de diferentes concentraciones y dispersiones de PEM que se sintetizan a partir de mezclas que contienen diferentes proporciones de polímeros funcionalizados a no funcionalizados. Después de verificar la conjugación del péptido con las superficies del polimerosoma, la unión cinética de las formulaciones de PEM resultantes a dianas/receptores moleculares recombinantes se caracteriza mediante mediciones de resonancia de plasmón de superficie (Biacore SPR); las curvas dependientes de la dosis se analizan de manera similar a la descrita para el ligando biológico libre. Estos estudios revelan parámetros cinéticos de la interacción entre las dispersiones de PEM y las dianas moleculares (rata de inicio, K_{inicio} y rata de terminación, $K_{\text{terminación}}$) y el cambio en la afinidad de los ligandos (constante de disociación, K) afectados por su conjugación a los polimerosomas.

Trabajo experimental:

Se utilizan procedimientos de modificación química establecidos para funcionalizar el terminal PEO de polímeros biodegradables (por ejemplo, copolímeros dibloque de PEO-b-PCL) con grupos carboxilo y para verificar las reacciones mediante espectroscopía ^1H RMN. Las dispersiones de PEM se crean y se purifican a partir de diversas combinaciones de copolímeros funcionalizados y no funcionalizados utilizando métodos de separación estándar para producir suspensiones monodispersas de vesículas unilamelares que son estables durante varios meses. Las distribuciones de tamaño de PEM están determinadas por la dispersión dinámica de la luz (DLS). La identidad y la pureza de los ligandos se confirman mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa y espectrometría de masas MALDI. La conjugación de ligandos con grupos PEO terminados en carboxilo en la superficie del polimerosoma se lleva a cabo en una reacción acuosa mediada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). La extensión de la conjugación del ligando se determina utilizando un ensayo micro-BCA. Se generan imágenes de las dispersiones de PEM dirigidas resultantes extensivamente mediante microscopía electrónica de transmisión criogénica (crio-TEM) para verificar su estabilidad después de la conjugación del ligando. Sus distribuciones de tamaño son nuevamente medidas por DLS. El grado de conjugación del ligando se verifica mediante citometría de flujo. Las mediciones de SPR se llevan a cabo en instrumentos biosensores Biacore X y Biacore 2000 (Biacore AG, Uppsala, Suecia) a 25°C. Las dianas de ligandos recombinantes purificados recombinantes (por ejemplo, receptores de proteínas) se compran comercialmente y se inmovilizan por unión al hidrogel de dextrano en la superficie del sensor. Los constructos de PEM diana se inyectan en diversas concentraciones y su unión se monitoriza en tiempo real. Las constantes de velocidad cinética (K_{inicio} y $K_{\text{terminación}}$) y la constante de unión en equilibrio (KD) para la unión del receptor/PEM se estiman a partir del análisis cinético de los sensogramas. Los PEM sin ligandos diana o PEM irrelevantes conjugados con ligandos se utilizan como controles.

También pueden emplearse químicas alternativas de conjugación de ligandos. Por ejemplo, las reacciones de fase orgánica donde el polímero dibloque está químicamente funcionalizado y conjugado con ligandos seleccionados (moléculas pequeñas, péptidos que tienen solubilidad en fase orgánica) antes de formar dispersiones de PEM son posibles; estos métodos de acoplamiento orgánico garantizan que el terminal PEO se conjugue con el ligando antes de que se exponga a una solución acuosa donde podría perder muchos de sus grupos reactivos de superficie modificados a través de la hidrólisis competitiva. Además, como método alternativo para variar el grado de conjugación de la superficie del ligando, se crean dispersiones de PEM compuestas por copolímeros de PEO-b-PCL que varían con respecto a los tamaños de bloque de PEO y PCL. Este enfoque controla la cinética de la conjugación del ligando con las superficies de los polímeros, así como el grado de cobertura de la superficie del ligando para una formulación de PEM dada. Es posible que las formulaciones de PEM dirigidas se unan a la superficie del sensor de una manera no específica durante las mediciones de SPR, lo que afecta su regeneración y la relación señal a fondo. Si no se puede realizar una medición confiable, las características de unión de PEM conjugadas con ligando también se

estudian utilizando ELISA o calorimetría de titulación isotérmica, que son otras técnicas establecidas para estudiar la unión de nanopartículas.

Modulación de la oxigenación de tumores in vivo por PEM:

5 Las dispersiones de PEM formadas a partir de PEO-b-PCL, PEO-b-PMCL, PEO-b-PTMC y/o versiones modificadas con acrílico de estos polímeros se analizan para determinar su capacidad para alterar la oxigenación in vivo del tumor tras la inyección de la vena de la cola en ratones portadores de tumores por xenotrasplante. Los efectos codependientes del tamaño de partícula, la deformabilidad y la concentración en la administración efectiva de Mb y la oxigenación del tumor resultante también se desconstruyen. Se utiliza un sistema óptico de generación de imágenes hiperespectral que puede desconstruir espacialmente el transporte cinético de O_2 en tiempo real para evaluar la eficacia de un constructo de PEM dado para alterar las tensiones medias y mínimas de oxígeno del tumor (pO_2).^{151, 154, 156, 158} Mientras que las pO_2 medias han sido estudiadas previamente y se miden fácilmente con otras técnicas, las pO_2 mínimas de tumores distribuidas espacialmente son quizás las más responsables de conducir la tumorigénesis y proporcionar el nicho de células madre del cáncer que ayuda a los tumores a evadir el tratamiento efectivo.^{151, 154, 155, 189} Un sistema óptico de generación de imágenes hiperespectral permite el mapeo espacial de las pO_2 cinéticas, en tiempo real, y se utiliza para visualizar y cuantificar el grado de modulación PEM de las áreas con baja pO_2 tumoral. Además, el leve calentamiento del tumor localizado aumenta el tamaño de los poros de los vasos sólidos en tumores durante varias horas, ayudando en la extravasación de nanopartículas^{190,191}. Como tal, la hipertermia localizada del tumor también es capaz de aumentar el suministro de O_2 por parte de los PEM. Finalmente, se monitoriza la mioglobulinuria relacionada con PEM y sus efectos sobre la eliminación de creatinina (CCr) para evaluar la nefrotoxicidad aguda posterior al tratamiento.

Almacenamiento de animales, manejo e inyecciones de PEM:

Los ratones son comprados y alojados en instalaciones apropiadas para animales. Se implantan quirúrgicamente cámaras de ventana del pliegue dorsal de la piel en cada animal aproximadamente 1 semana antes del tratamiento. Durante el procedimiento quirúrgico, se inyectan 10000 células de carcinoma mamario 4T1 en el dorso o el flanco del ratón. Estas células están diseñadas para expresar RFP de forma constitutiva, con la expresión de GFP inducida en respuesta a la actividad de HIF-1¹⁹². Los tumores pueden crecer durante aproximadamente 1 semana, momento en el cual son lo suficientemente grandes como para ser hipóxicos y tener actividad de HIF-1.¹⁵⁸ Se preparan 100 μ L de suspensiones de PEM como se describe anteriormente y se inyectan a través de la vena de la cola en $t = 0$ y $t = 24$ h. Estos parámetros experimentales permiten la evaluación de los efectos de los PEM que se han acumulado en el espacio perivascular, que se espera que alcancen un máximo en aproximadamente 24 h. Para los estudios de hipertermia, se utiliza una unidad de alojamiento especial para variar la temperatura de la cámara de la ventana/del tumor.^{190, 191}

Visualización y cuantificación de la modulación del oxígeno del tumor cinético por PEM:

35 En los puntos de tiempo especificados anteriormente, se utilizan las imágenes hiperespectrales para evaluar los efectos de las diversas construcciones de PEM en la modificación de la pO_2 del tumor. Las temperaturas se ajustan entre 34-42°C.^{190,191} La generación hiperespectral de imágenes de la absorción de Mb se utiliza para cuantificar la saturación de Mb O_2 ,¹⁵⁸ mientras que la evaluación radiométrica de la fluorescencia y fosforescencia de nanopartículas de boro se utiliza para cuantificar el tumor absoluto pO_2 .¹⁵³ La actividad de HIF-1 también se evalúa midiendo la emisión de GFP. Esto permite la cuantificación de la oxigenación tanto vascular como tisular, así como la presencia del fenotipo hipóxico tumoral, de forma independiente y simultánea.

REIVINDICACIONES

1. Un agente de alta afinidad al oxígeno para usar en un método para aumentar la eficacia de la radiación o la quimioterapia aplicada a un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho método:
 5 administrar dicho agente de alta afinidad al oxígeno al tumor mediante la administración al sujeto de un portador de oxígeno que incorpora el agente de alta afinidad al oxígeno, en donde:
 el agente de alta afinidad al oxígeno comprende una composición de mioglobina; y
 las características del gradiente de presión parcial de oxígeno del agente de alta afinidad al oxígeno son tales que el oxígeno se libera del agente de alta afinidad al oxígeno a tensiones de oxígeno de menos de 10 mm Hg, en donde el oxígeno liberado se difunde fuera del portador de oxígeno mientras que el agente de alta afinidad al oxígeno permanece dentro del portador de oxígeno.
 10
2. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho agente de alta afinidad al oxígeno tiene un P50 para oxígeno de aproximadamente 2-3 mm Hg.
3. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho agente de alta afinidad al oxígeno comprende uno o más de mioglobina humana no modificada, mioglobina no modificada de otra especie biológica y mioglobina modificada química o genéticamente de humanos o de otra especie biológica.
 15
4. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho agente de alta afinidad al oxígeno es un aglutinante de oxígeno cooperativo o un aglutinante de oxígeno lineal.
5. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las características de gradiente de presión parcial de oxígeno de dicho agente de alta afinidad al oxígeno son tales que el oxígeno está estrechamente unido por el agente de alta afinidad al oxígeno mientras circula en un torrente sanguíneo.
 20
6. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho agente de alta afinidad al oxígeno está PEGilado o polimerizado.
7. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho agente de alta afinidad al oxígeno está encapsulado en el portador de oxígeno, y en donde el portador de oxígeno comprende
 25 un vehículo portador que protege al agente de alta afinidad al oxígeno de ser liberado en el torrente sanguíneo.
8. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho agente de alta afinidad al oxígeno está coencapsulado en un vehículo portador con al menos otro agente sensibilizador de la radiación o quimioterapéutico.
9. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el vehículo portador se selecciona de uno de entre un vehículo basado en nanopartículas, una vesícula lipídica, una vesícula de polímero sintético o un polimerosoma uni- o multilamelar.
 30
10. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el vehículo portador es una vesícula, y en donde el agente de alta afinidad al oxígeno está dentro de un núcleo acuoso o una porción membranosa de la vesícula.
11. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el vehículo portador comprende una pluralidad de polímeros biodegradables.
 35
12. Un kit, que comprende:
 un primer contenedor; y
 un segundo contenedor;
 40 en donde el primer contenedor comprende el agente de alta afinidad al oxígeno de la reivindicación 1 y en donde el segundo contenedor comprende una mezcla para rehidratación.
13. El agente de alta afinidad al oxígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde administrar al sujeto el portador de oxígeno que incorpora el agente de alta afinidad al oxígeno comprende administrar el portador de oxígeno por vía intravenosa, por inhalación, tópicamente, por el recto, por la vagina, por vía transdérmica, por vía subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intramuscular u oral.
 45

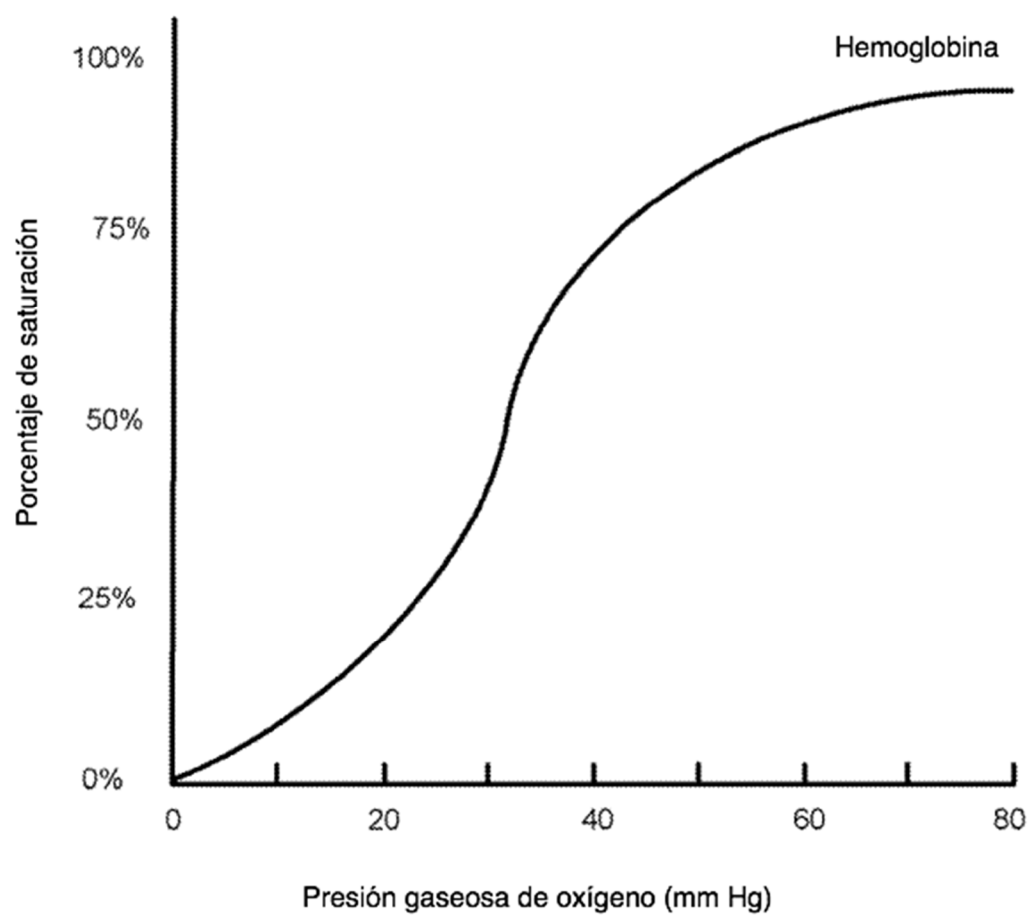


FIG. 1

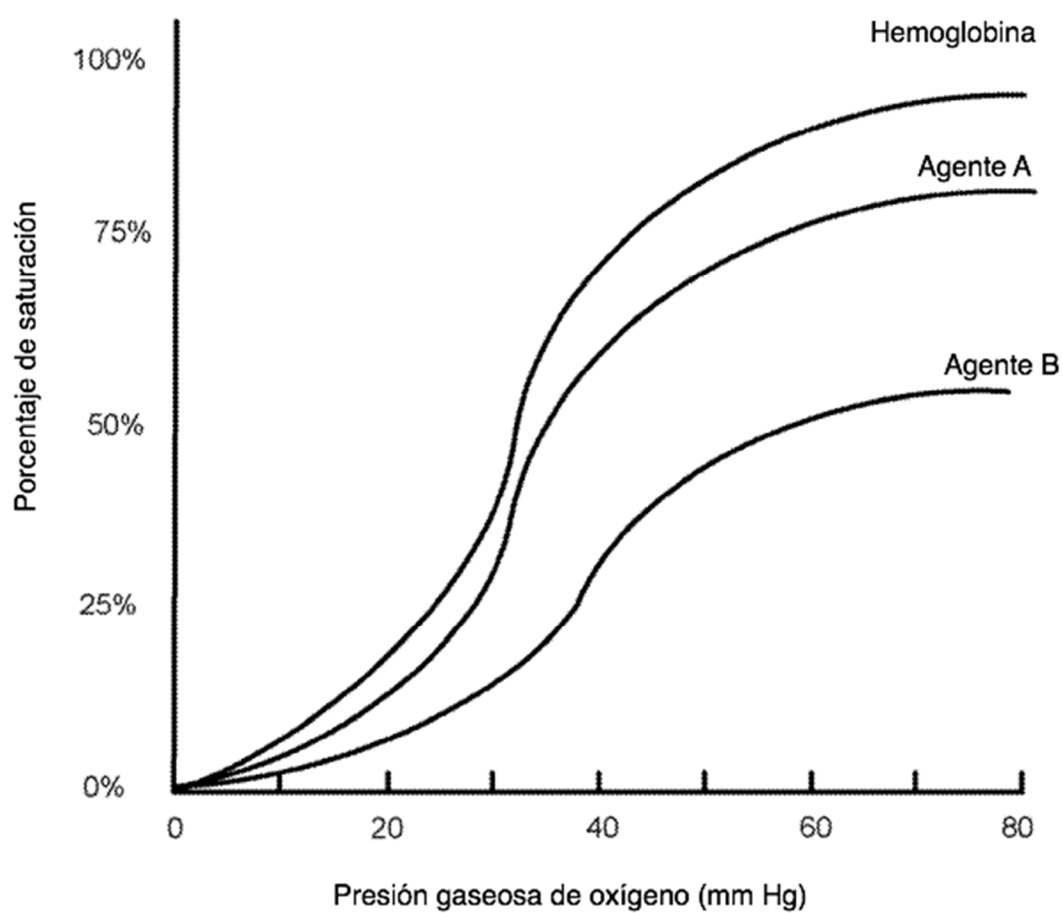


FIG. 2

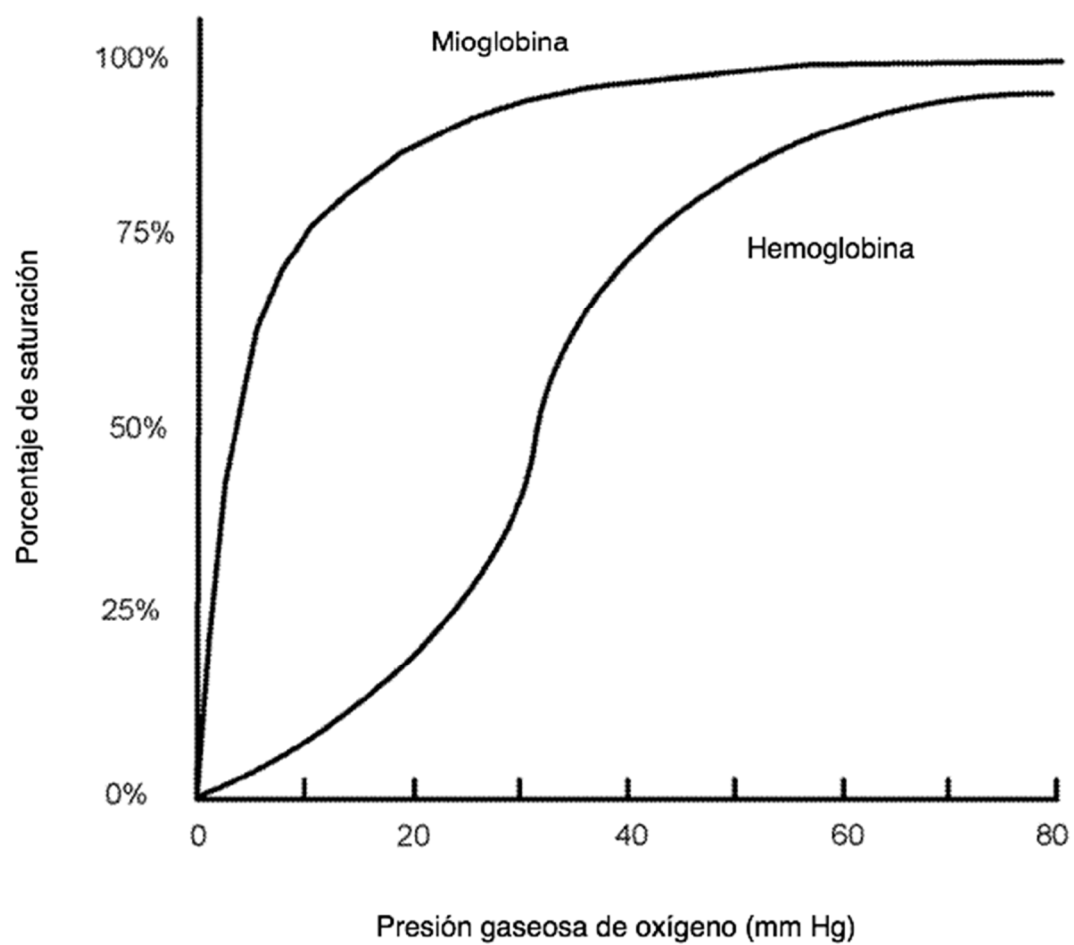


FIG. 3

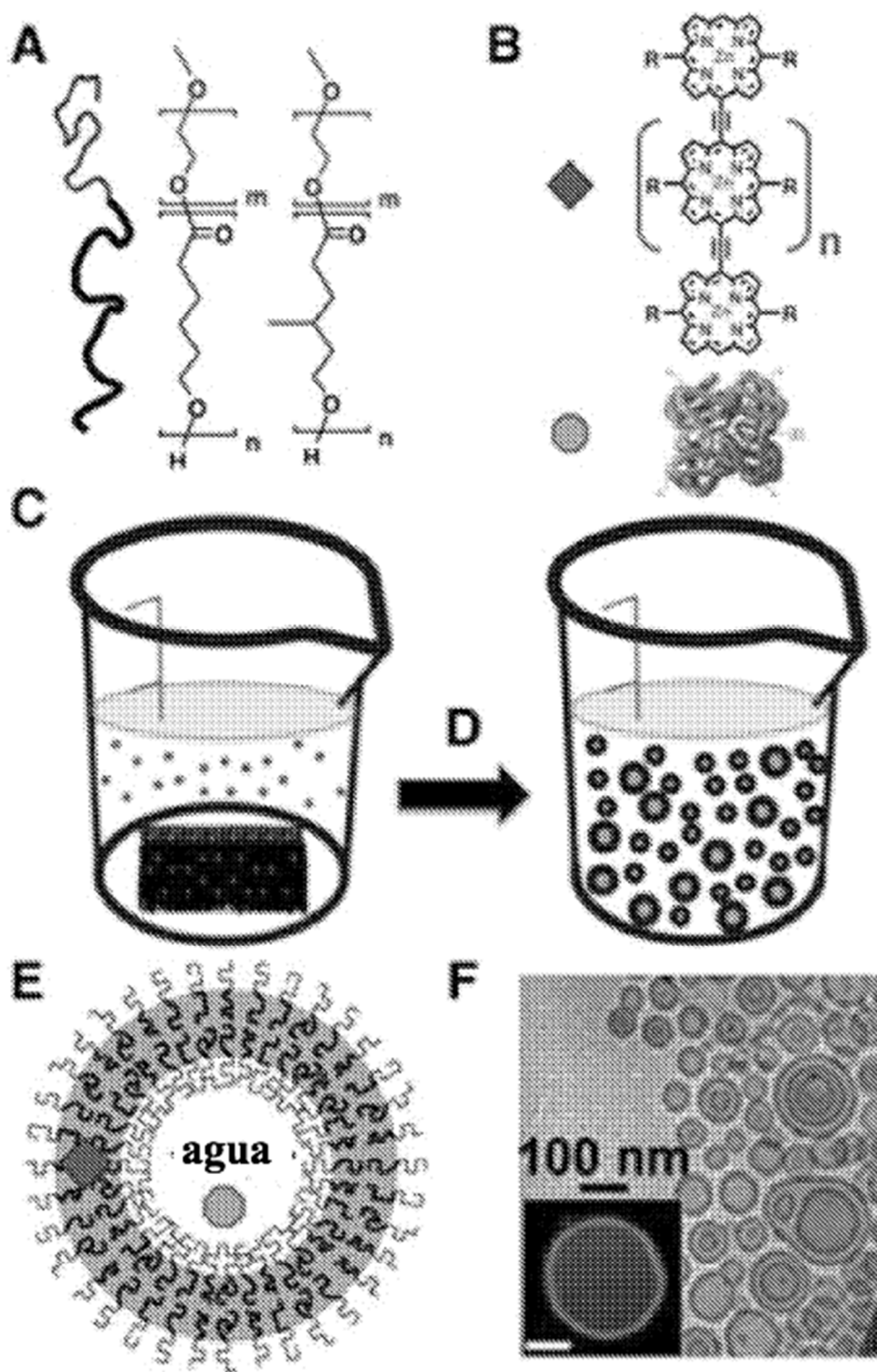


FIG. 4

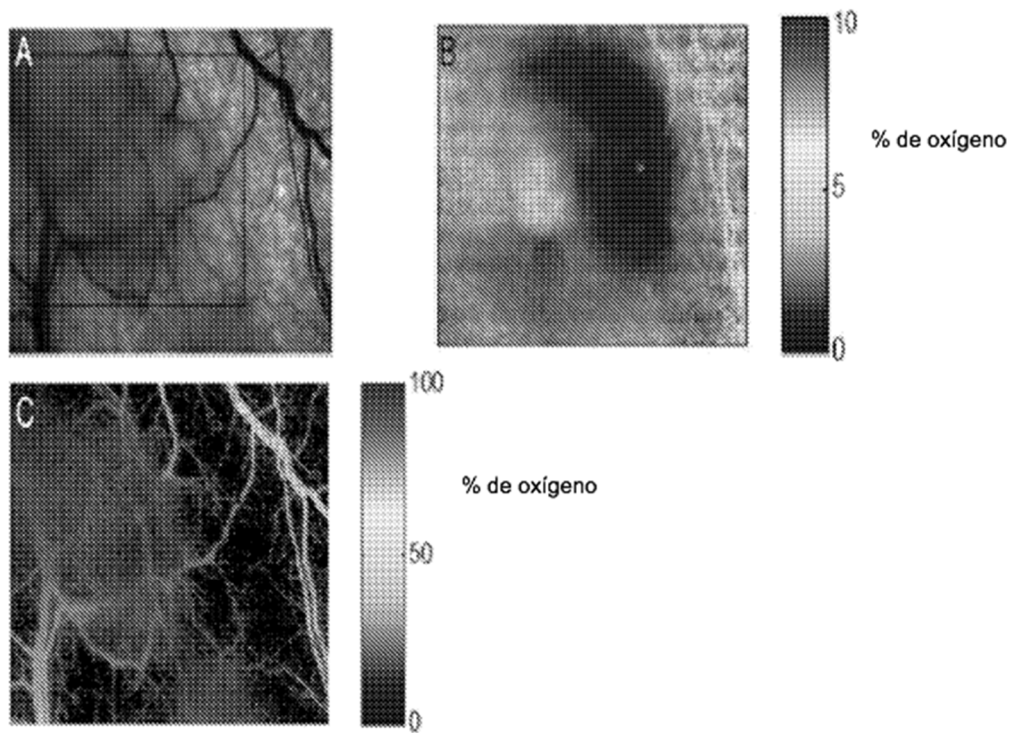


FIG. 5

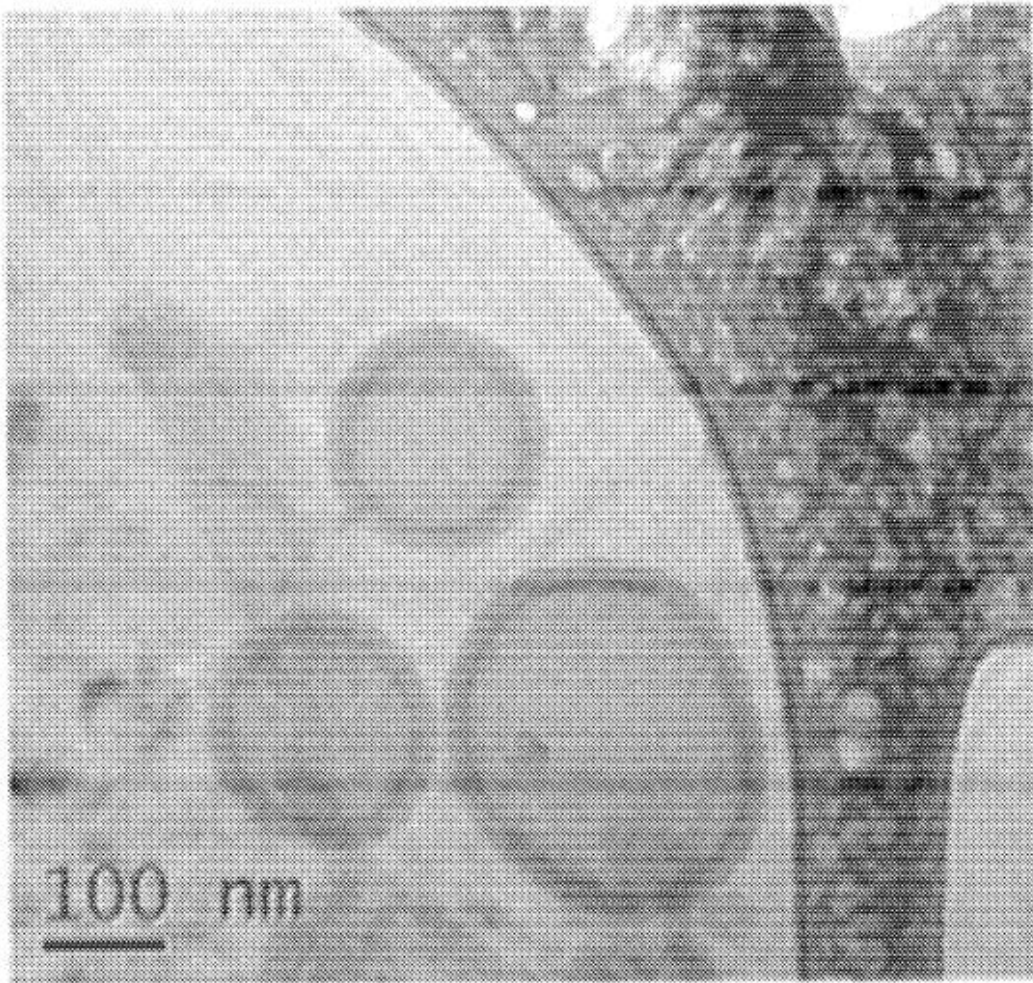


FIG. 6A

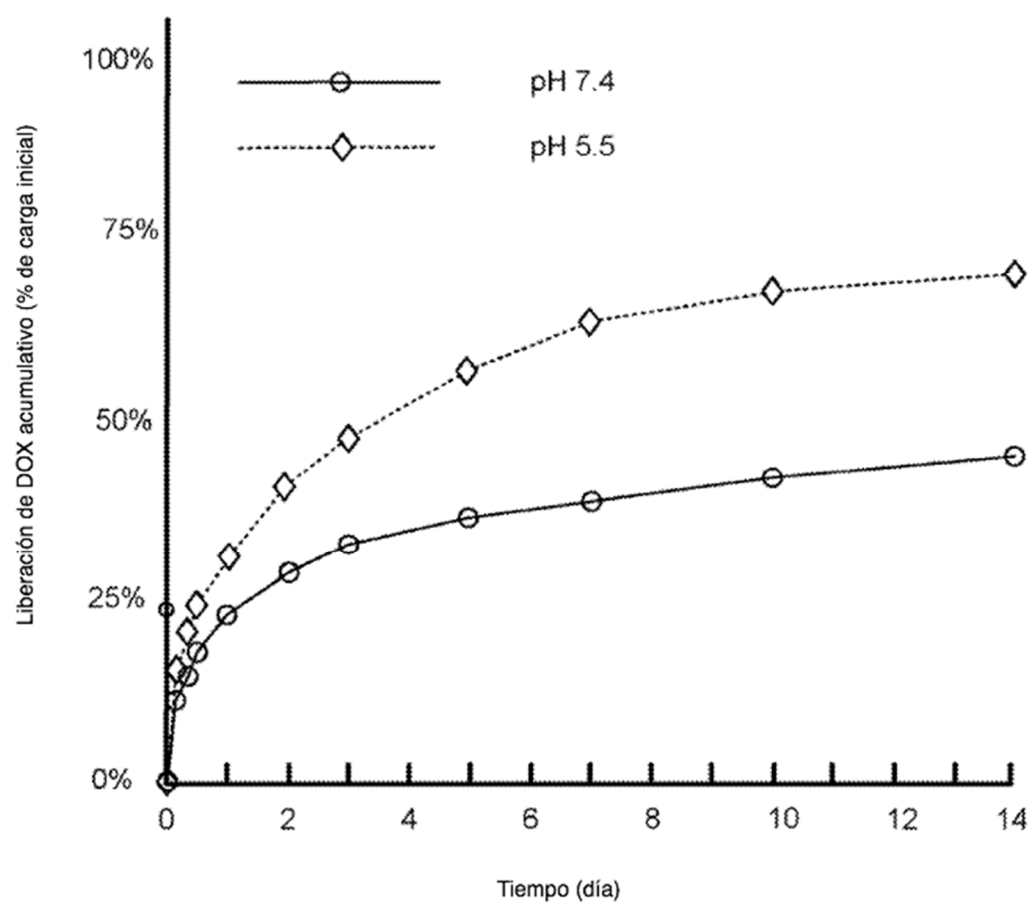


FIG. 6B

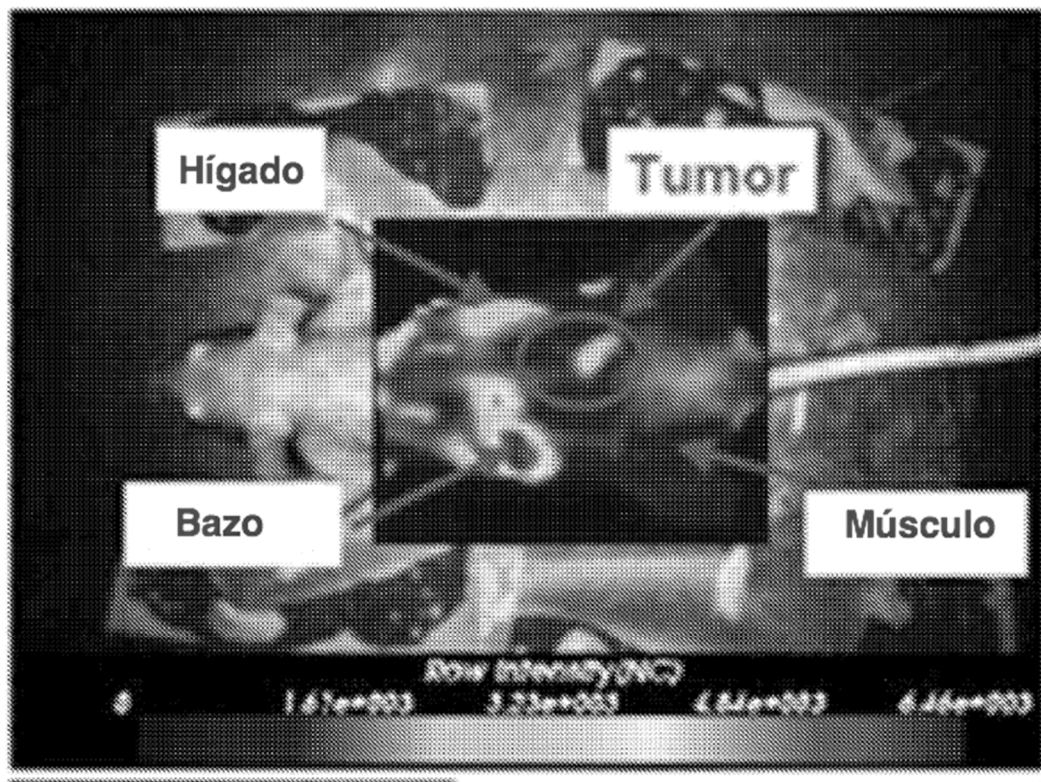


FIG. 7A

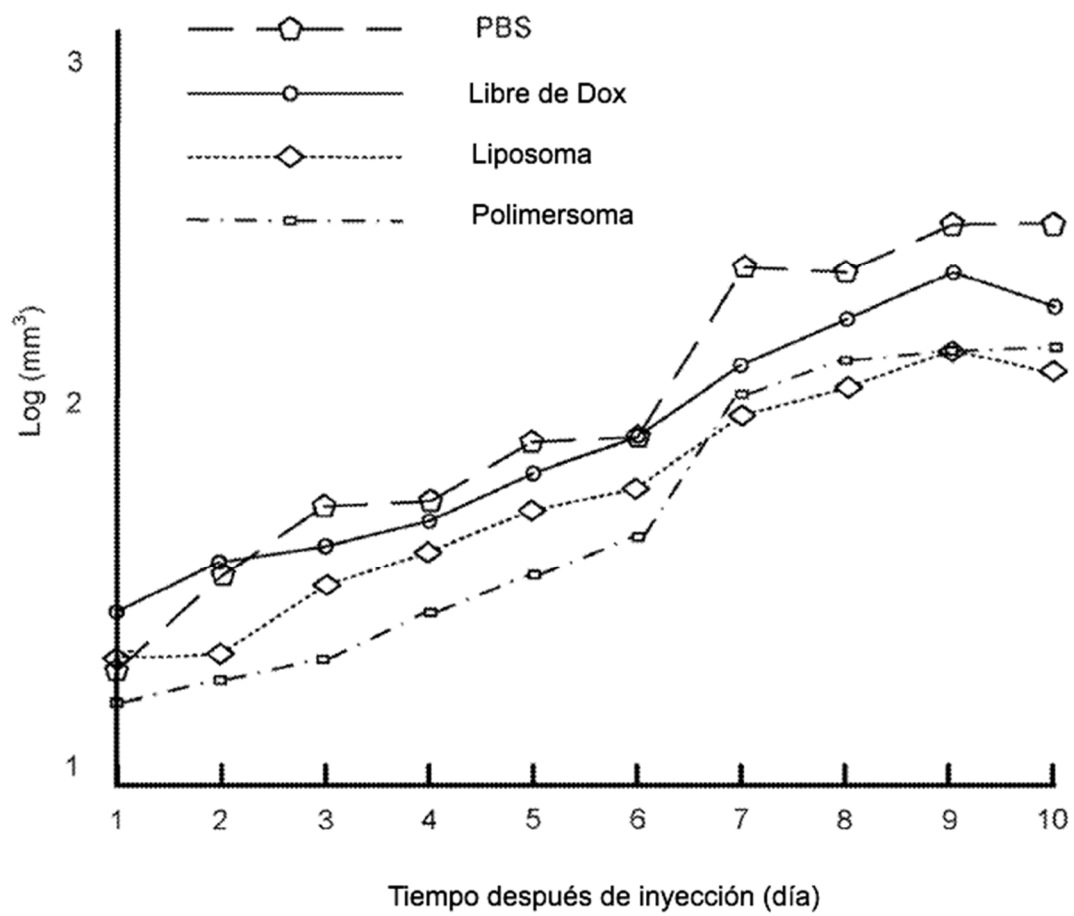


FIG. 7B

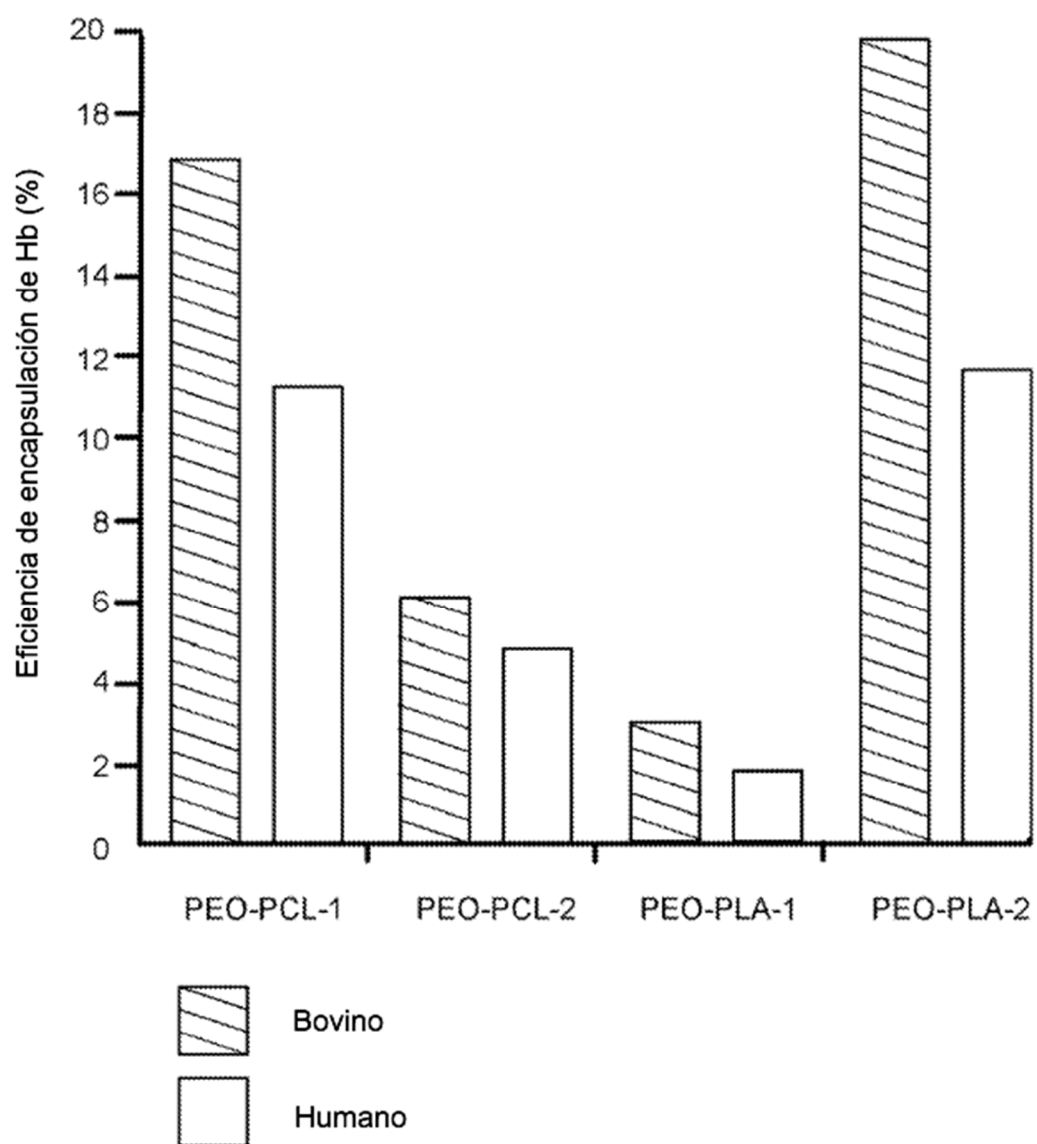


FIG. 8A

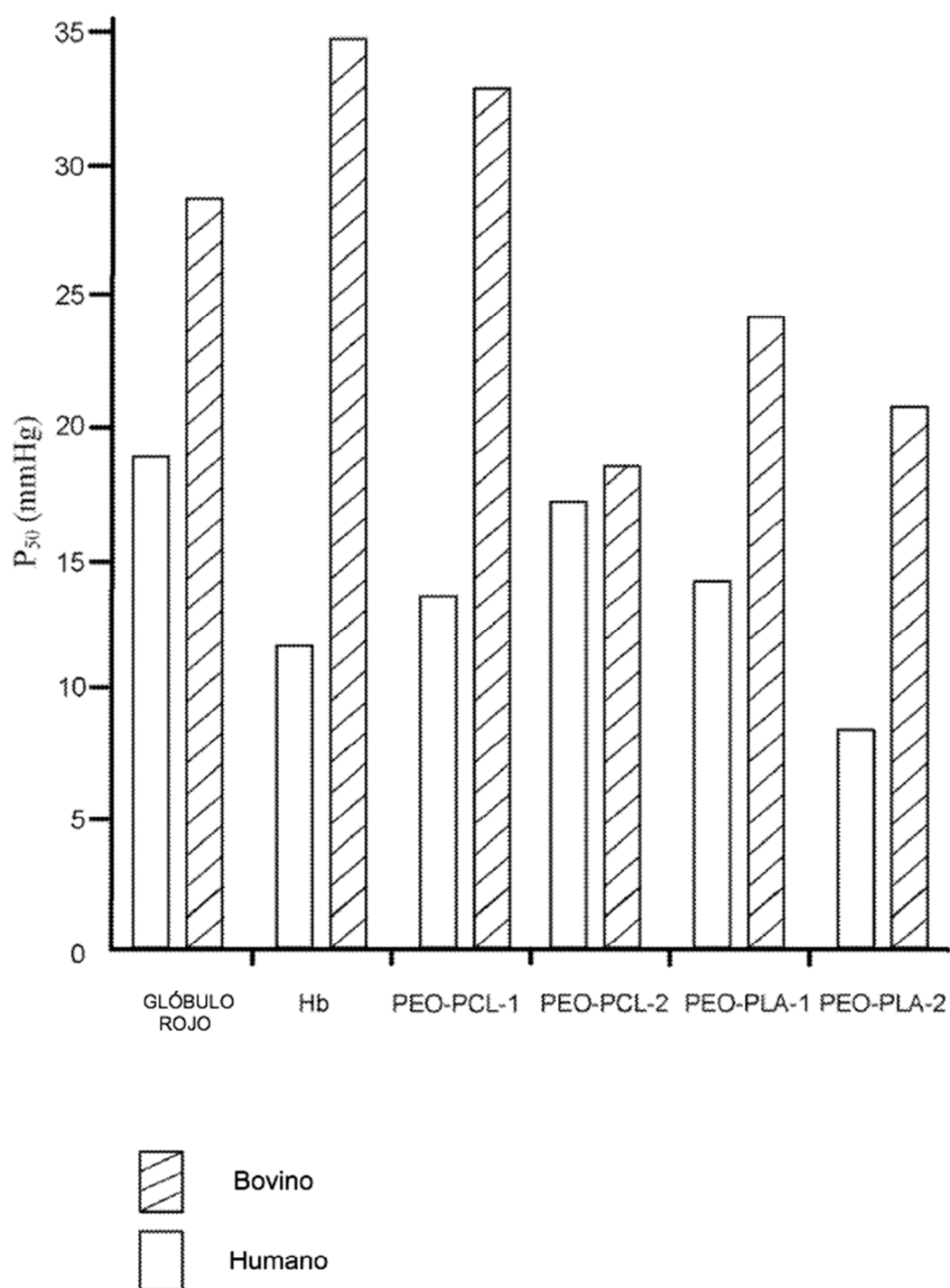


FIG. 8B

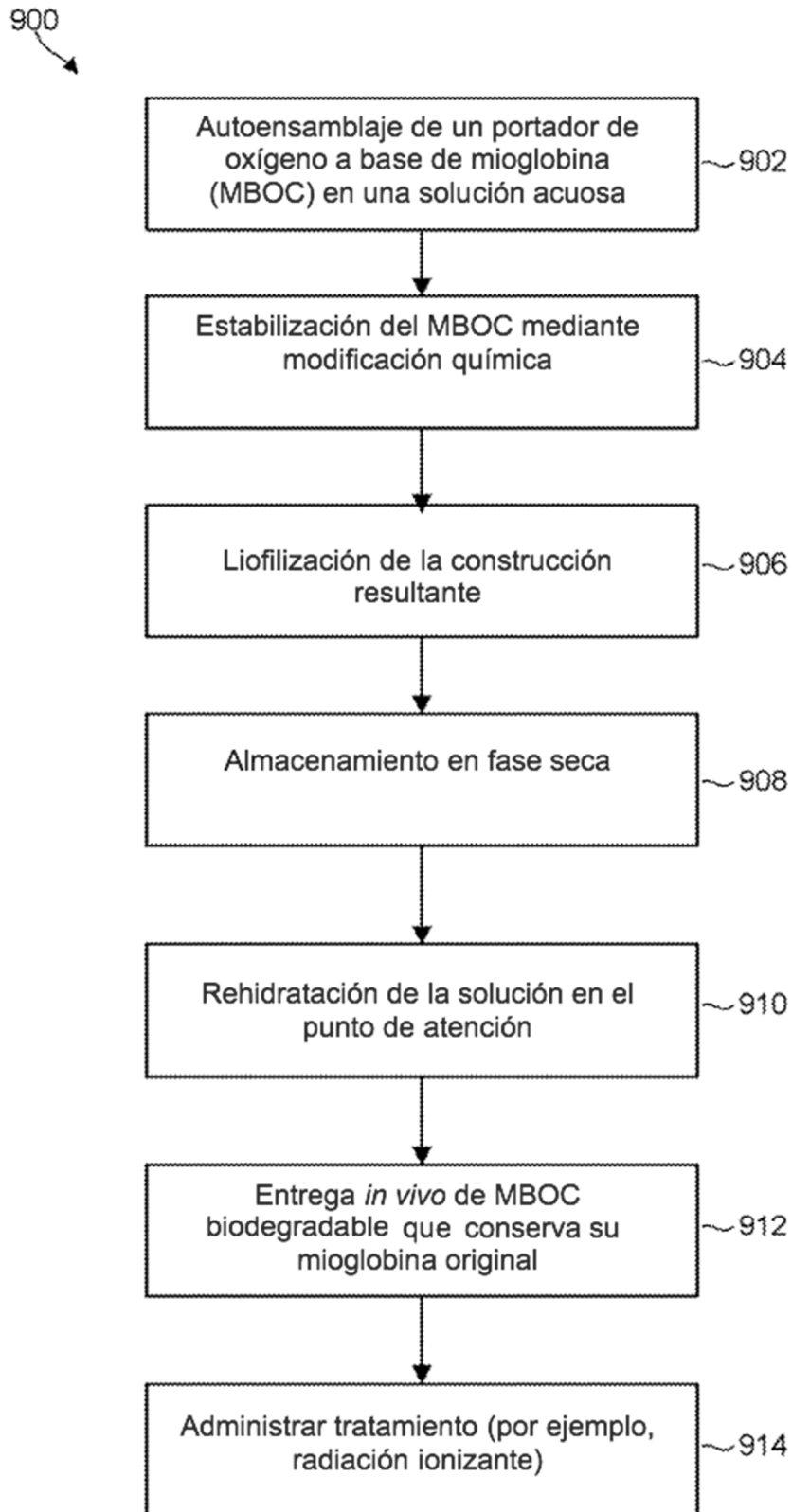


FIG. 9

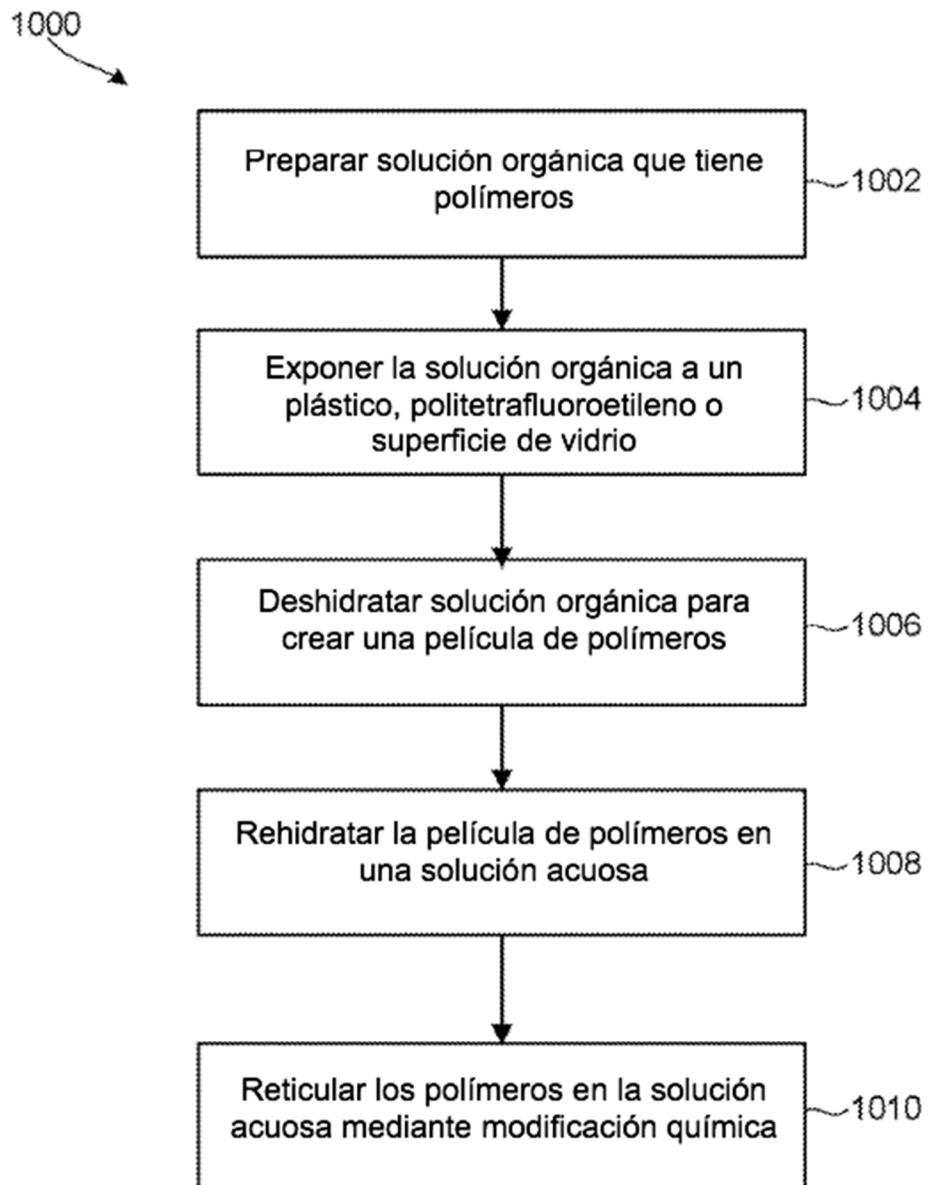


FIG. 10