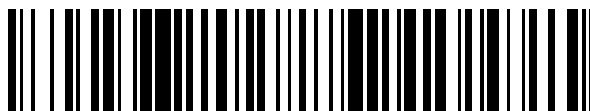


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 103**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 49/10 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2009 PCT/US2009/002706**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09134435**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2009 E 09739238 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2280736**

54 Título: **Composiciones y métodos para producir emulsiones para técnicas de resonancia magnética nuclear y otras aplicaciones**

30 Prioridad:

17.06.2008 US 132420 P
02.05.2008 US 126305 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2017

73 Titular/es:

CELSENSE INC. (100.0%)
603 Stanwix Street, Suite 348
Pittsburgh, PA 15222, US

72 Inventor/es:

AHRENS, ERIC T. y
JANJIC, JELENA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 611 103 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 producir emulsiones para técnicas de resonancia magnética nuclear y otras aplicaciones

Antecedentes

Muchos procesos biológicos se realizan por poblaciones de células. Por ejemplo, las células del sistema inmunitario se reclutan desde el torrente sanguíneo a áreas de inflamación o infección, produciéndose una acumulación de células inmunitarias en el sitio afectado. Con frecuencia se produce una marcada infiltración de células inmunitarias en tejidos afectados por enfermedades autoinmunitarias, cánceres e infecciones. De forma similar, el rechazo de trasplantes está mediado por células inmunitarias del hospedador que entran y destruyen el tejido trasplantado. También hay cada vez más indicios de que células madre que se originan en la médula ósea migran a través del torrente sanguíneo y ayudan a la regeneración de tejidos dañados.

Además, el área más prometedora aparentemente de la terapia biológica implica el campo emergente de la terapia celular. La terapia celular se define, en sentido amplio, como el tratamiento de enfermedades humanas mediante la administración de células terapéuticas que se han seleccionado, multiplicado y tratado farmacológicamente fuera del cuerpo, o *ex vivo*. Estas células pueden proceder del paciente (células autólogas), de otro ser humano (células alogénicas), de otros organismos (células xenogénicas), o de líneas celulares inmortalizadas.

Las células representan el sistema terapéutico fundamental debido a su capacidad de realizar funciones complejas y su capacidad de respuesta a cambios en el tejido circundante o en el organismo hospedador. En el modo más sencillo de terapia celular, las células pueden aislarse, cultivarse en cantidad *ex vivo*, e implantarse en pacientes para producir y secretar factores solubles que directamente se dirigen al mecanismo de la enfermedad. Las células también pueden realizar tareas tan complejas como la reconstitución de tejidos, órganos o respuestas inmunitarias basándose en su capacidad de alojarse en sitios específicos dentro del cuerpo, salir de la circulación e integrarse en tejidos específicos o diferenciarse en nuevos tejidos. Otros agentes terapéuticos celulares pueden programarse para la destrucción de tumores o el tratamiento de metástasis (por ejemplo, agentes inmunoterapéuticos).

Aunque las poblaciones de células dinámicas juegan un papel clave en enfermedades significativas, las presentes tecnologías para monitorizar la localización y el movimiento de las células *in vivo* son bastante limitadas. Típicamente, los movimientos de las células se observan únicamente en "instantáneas" obtenidas por análisis histológico de biopsias de tejidos. Sin embargo, el proceso de muestreo de un tejido con frecuencia altera el comportamiento de las células, y solo puede obtenerse un número limitado de biopsias a partir de un tejido u órgano particular. Se han hecho algunos progresos estudiando los movimientos de células mediante ensayos *in vitro* y tejidos aislados *ex vivo*. Los instrumentos existentes para el análisis no invasivo de organismos vivos, en el momento actual, son poco adecuados para el rastreo de células vivas. Las tecnologías de obtención de imágenes basadas en luz, tales como bioluminiscencia (por ejemplo, luciferasas), con frecuencia son ineficaces para visualizar estructuras profundas porque la mayoría de los tejidos de los mamíferos son ópticamente opacos. Las técnicas de tomografía de emisión de positrones (PET) que usan sondas marcadas radiactivamente son muy sensibles. Sin embargo, la instrumentación PET con frecuencia está limitada a una resolución de varios milímetros y no puede resolver detalles finos de tejidos y órganos. Además, las células marcadas no pueden detectarse durante periodos de tiempo que se extienden más allá de la semivida típica de los radioisótopos PET y, generalmente, la PET no es útil para estudios longitudinales. Para conseguir una comprensión fundamental de procesos celulares, tienen que desarrollarse nuevas formas de visualizar y cuantificar la dinámica de la población de tipos celulares específicos *in vivo*.

La formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) es una herramienta de diagnóstico clínico usada de forma generalizada porque no es invasiva, permite visualizar objetos ópticamente opacos y proporciona contraste entre tejidos blandos con una resolución espacial razonablemente alta. La IRM convencional se centra casi exclusivamente en la visualización de la anatomía y no tiene especificidad por ningún tipo celular particular. La "sonda" usada por IRM convencional es el protón ubicuo (^1H) en las moléculas de agua móviles. Se necesitan nuevas clases de sondas o reactivos de IRM exógenas para facilitar la obtención de imágenes específicas de células en sujetos vivos.

Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En ciertos aspectos, la solicitud desvela una composición acuosa como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, comprendiendo dicha composición acuosa perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, un emulsionante, una co-mezcla de tensioactivo y un aditivo, donde el emulsionante comprende ricinoleato de glicerol polietilenglicol. En ciertas realizaciones, la co-mezcla de tensioactivo comprende un 70 % en moles de lecitina, un 28 % en moles de colesterol y un 2 % en moles de DPPE. En ciertas realizaciones, el aditivo es propilenglicol. En ciertas realizaciones, la composición comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 20 % al 50 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 25 % al 35 % p/v. En ciertas

realizaciones, la composición comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 30 % al 40 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 35 % al 36 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 35,6 % p/v.

5 En ciertas realizaciones, la composición comprende el emulsionante en el intervalo del 1 % al 10 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende el emulsionante en el intervalo del 1 % al 5 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende el emulsionante en un 3 % p/v.

10 En ciertas realizaciones, la composición comprende propilenglicol en el intervalo del 1 % al 10 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende propilenglicol en el intervalo del 1 % al 5 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende propilenglicol en un 2 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende la co-mezcla de tensioactivo que comprende lecitina, colesterol y DPPE en el intervalo del 1 % al 10 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende la co-mezcla de tensioactivo que comprende lecitina, colesterol y DPPE en el intervalo del 1 % al 5 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición comprende la co-mezcla de tensioactivo que comprende lecitina, colesterol y DPPE en un 2 % p/v.

20 En ciertos aspectos, la solicitud desvela una composición acuosa como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, comprendiendo dicha composición acuosa perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 35,6 % p/v, un emulsionante en un 3,0 % p/v, una co-mezcla de tensioactivo en un 2,0 % p/v, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, y un aditivo en un 2,0 % p/v, donde el aditivo es propilenglicol y donde el emulsionante comprende ricinoleato de glicerol polietilenglicol.

25 También se describe en el presente documento una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y un copolímero de bloque, donde la composición comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 10 % al 20 % p/p, y donde la composición comprende el copolímero de bloque en el intervalo del 0,1 % al 2,0 % p/p. También se describe en el presente documento que el copolímero de bloque puede ser un copolímero tri-bloque que comprende poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno). Además, en el presente documento se describe que el copolímero de bloque puede ser un copolímero tri-bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) que comprende un contenido de PEO del 80 %.

30 Además, en el presente documento se describe que la composición puede comprender perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 12 % al 17 % p/p o en un 15 % p/p. Además, en el presente documento se describe que la composición puede comprender el copolímero de bloque en el intervalo del 0,1 % al 1,0 % p/p o en un 0,6 % p/p.

40 En el presente documento también se describe una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 15 % p/p y un copolímero de bloque en un 0,6 % p/p. También se describe en el presente documento que el copolímero de bloque puede ser un copolímero tri-bloque que comprende poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno). Además, en el presente documento se describe que el copolímero de bloque puede ser un copolímero tri-bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) que comprende un contenido de PEO del 80 %.

45 También se describe en el presente documento que la composición puede comprender además sulfato de protamina en el intervalo del 0,01 % al 1,0 % p/p, en el intervalo del 0,01 % al 0,5 % p/p, en el intervalo del 0,01 % al 0,1 % p/p o en un 0,04 % p/p.

50 En ciertos aspectos, la solicitud desvela una emulsión que comprende una composición de una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, la emulsión tiene un tamaño medio de gotas menor de 200 nm de diámetro. En ciertas realizaciones, la emulsión es estable a temperaturas que varían de 4 °C a 37 °C. En ciertas realizaciones, la emulsión tiene un índice de polidispersidad que varía de 0,1 a 0,2.

55 En ciertos aspectos, la solicitud desvela un método para preparar una emulsión como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, que comprende métodos de alta energía. En ciertas realizaciones, el método de alta energía es microfluidización. En ciertas realizaciones, el método de alta energía es sonicación.

60 En ciertos aspectos, la solicitud desvela un método para marcar una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula *ex vivo* con una emulsión como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas en condiciones tales que el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se asocia con la célula.

65 En ciertos aspectos, la solicitud desvela un método para detectar una célula en un sujeto, comprendiendo el método: a) administrar al sujeto una célula que está marcada con una emulsión como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas; y b) examinar al menos una parte del sujeto por una técnica de resonancia magnética nuclear, detectándose de esta manera la célula marcada en el sujeto.

En el presente documento también se describe un método para detectar células trasplantadas en un receptor de un

trasplante, comprendiendo el método: a) administrar células para trasplante a un receptor de un trasplante, estando al menos una parte dichas células para el trasplante marcadas con una emulsión de la solicitud; b) examinar al menos una parte del sujeto mediante una técnica de resonancia magnética nuclear, detectándose de esta manera las células marcadas.

En el presente documento también se describe un método para cuantificar el número de células *in vivo*, comprendiendo el método: a) administrar al sujeto células que están marcadas con una emulsión de la solicitud; b) examinar al menos una parte del sujeto mediante una técnica de resonancia magnética nuclear, detectándose de esta manera las células marcadas en el sujeto; y c) cuantificar el número de células marcadas en una región de interés (ROI).

Además, en el presente documento también se describe un método para cuantificar el número de leucocitos *in vivo*, comprendiendo el método: a) administrar al sujeto una emulsión de la solicitud; b) extraer una muestra de sangre periférica del sujeto y medir la carga celular eficaz de leucocitos; c) examinar al menos una parte del sujeto por una técnica de resonancia magnética nuclear, detectándose de esta manera las células marcadas en el sujeto; y d) cuantificar el número de células marcadas en una región de interés (ROI). También se describe en el presente documento que la población de células puede separarse de la muestra antes de la medición de la carga celular y la proporción de dichas células se usa para cuantificar el número de células marcadas en esa población en una ROI.

También se describe en el presente documento un método para marcar una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula *in vivo* con una emulsión de la solicitud en tales condiciones que el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se asocia con la célula.

Además, en el presente documento se describe un método para detectar una célula en un sujeto, comprendiendo el método: a) administrar al sujeto una emulsión de la solicitud; y b) examinar al menos una parte del sujeto por una técnica de resonancia magnética nuclear, detectándose de esta manera la célula marcada en el sujeto.

En ciertos aspectos, la solicitud desvela un método para medir la presión parcial de oxígeno en un tejido, comprendiendo el método poner en contacto el tejido *in vivo* con una emulsión como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas en tales condiciones que el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se asocia con el tejido.

En ciertos aspectos, la solicitud desvela una emulsión como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas para uso en un método para detectar una permeabilidad vascular elevada en un tejido, donde el tejido se va a poner en contacto *in vivo* con la emulsión en condiciones tales que el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se asocia con el tejido.

En ciertos aspectos, la solicitud desvela una formulación celular marcada para la administración a un sujeto, comprendiendo la formulación: a) una célula; y b) una emulsión como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas que está asociada con la célula.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra datos recogidos para la Emulsión 3, que contiene perfluoro-15-corona 5 éter y emulsionado con Cremophor EL. A) Se midió la dispersión de luz dinámica (DLS) para mostrar la distribución del tamaño de gotas de la emulsión. B) Se evaluó la estabilidad a largo plazo (6 meses) a una temperatura de almacenamiento convencional de 5 °C. Estos datos muestran el diámetro medio medido y la polidispersidad (ambos en unidades de nm) a lo largo del tiempo. C) La estabilidad en suero de la emulsión se evaluó midiendo el diámetro y la polidispersidad en presencia de suero por DLS. Los datos son la media de n=3 mediciones independientes y se presentan como la media $\pm$ desviación típica (DT).

La **Figura 2** muestra datos recogidos del marcaje de la nanoemulsión 3 con colorante fluorescente. A) Se midió la dependencia de la intensidad de la fluorescencia de la concentración de colorante tanto en agua como unido a la emulsión. B) Se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia de Dil en agua y unido a la emulsión.

La **Figura 3** muestra una comparación del tamaño de gotas de la nanoemulsión 3 marcada con colorante fluorescente Dil (línea de trazos) y no marcada (línea continua).

La **Figura 4** muestra la citotoxicidad de la nanoemulsión 3 y la captación en células RAW. A) Se expusieron células a diferentes dosis de nanoemulsión 3 durante 3 y 24 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante recuento celular. B) Se midió la captación en células RAW sedimentadas por RMN ^{19}F Después de una exposición de 18 h. Los datos representan la media de n=3 sedimentos celulares, y las barras de error son $\pm$ DT.

La **Figura 5** muestra un espectro representativo de RMN ^{19}F de las células RAW marcadas con la formulación 3. Como patrón interno se usó ácido trifluoroacético con un desplazamiento químico a -76,00 ppm, mientras que las células marcadas se muestran a -92,90 ppm.

La **Figura 6** muestra la producción de citocinas en células RAW marcadas con la formulación 3. Se cultivaron células RAW marcadas con formulación 3 (1×10^6 células/ml) y se expusieron a 250 ng/ml de LPS. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo después de 24 horas y se ensayaron con respecto a la presencia de IL-6 y TNF-alfa. Las mediciones de citocinas se determinaron por ELISA. Los datos son la media de dos experimentos independientes y

se muestran como media $\pm$ DT.

La **Figura 7** muestra el tamaño medio de gotas de la nanoemulsión 5 el día 1 y el día 342 después de la formulación (línea continua y de trazos, respectivamente). Los datos demuestran la estabilidad a largo plazo, el pequeño tamaño de partículas y la estrecha distribución de partículas de la nanoemulsión 5.

5 La **Figura 8** muestra el tiempo de eliminación en sangre de las formulaciones 3 y 5 inyectadas por vía intravenosa en ratón. Las dos formulaciones tienen una semivida en sangre comparable. Se midieron los datos promediados usando RMN ^{19}F de muestras de sangre seriadas tomadas en puntos de tiempo discretos después de la inyección a partir de una cohorte de animales ($n=5$).

10 La **Figura 9** muestra datos típicos de IRM $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ *in vivo* en un modelo de inflamación usando la nanoemulsión 3. Los datos de ^{19}F (pseudocolor) muestran una acumulación altamente localizada de células inflamatorias que rodean una esponja implantada quirúrgicamente empapada en adyuvante Completo de Freund antes de la implantación. La imagen de ^1H (escala de grises) proporciona el fondo anatómico en este ratón anestesiado.

15 La **Figura 10** muestra la cuantificación del perfil de inflamación debajo de la médula espinal de una rata con encefalomielitis alérgica experimental (EAE). A los animales que mostraban signos clínicos de EAE (estadio 2) se les administró una inyección intravenosa de nanoemulsión 3 y, 48 horas después, la rata se sacrificó y se ensayó la inflamación usando un espectro de RMN ^{19}F de alta resolución de segmentos fijos intactos de la médula espinal.

Descripción detallada

20 1. Visión general

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona nuevos métodos y reactivos caracterizados en las reivindicaciones adjuntas para marcar células *ex vivo* con un reactivo de formación de imágenes de resonancia magnética nuclear, tal como un reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo, y cuantificar las células marcadas *in vivo* o *ex vivo*.
 25 Las células marcadas pueden detectarse por una técnica de resonancia magnética nuclear de ^{19}F (por ejemplo, IRM/SRM) y cuantificarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Las técnicas de resonancia magnética nuclear de ^{19}F son excelentes herramientas de formación de imágenes para sistemas biológicos debido a la ausencia de señales endógenas de fondo. El flúor está presente, si lo está, a niveles extremadamente bajos en los organismos vivos, y generalmente no está en una forma química que sea detectable por técnicas de resonancia magnética nuclear en estado líquido. Esto es bastante distinto de lo que ocurre en la IRM de ^1H convencional que, aunque proporciona la visualización de detalles anatómicos finos, no permite la detección selectiva de poblaciones celulares particulares. Ciertos métodos desvelados en el presente documento permiten la exploración total o parcial del cuerpo para visualizar la distribución de células marcadas en un sujeto vivo. La localización anatómica precisa de las células marcadas detectadas por resonancia magnética nuclear de ^{19}F puede determinarse, por ejemplo, por superposición de una imagen de IRM de ^1H que proporcione detalles anatómicos. En realizaciones preferidas, la imagen de ^1H se adquiere durante la misma sesión de imágenes que la imagen de ^{19}F (sin mover el objeto) para asegurar el registro. Además, las técnicas de resonancia magnética nuclear desveladas en el presente documento pueden aplicarse eficazmente en contextos *ex vivo*, como ocurre en las muestras de tejido, órganos escindidos y cultivos celulares. La tecnología de formación de imágenes desvelada en el presente documento puede aplicarse a un gran número de problemas biológicos y médicos.

En ciertos aspectos, un método de la invención puede comprender marcar células *ex vivo* con un reactivo de formación de imágenes de ^{19}F , administrar las células marcadas a un sujeto y detectar las células marcadas en el sujeto. Las células a marcar pueden ser una fracción celular o muestra de tejido en bruto, o las células pueden cultivarse y/o someterse a enriquecimiento antes de marcarse. Por ejemplo, pueden seleccionarse tipos celulares particulares por clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) antes del marcaje. En la técnica se conocen otros métodos de clasificación o enriquecimiento selectivo para los diversos tipos celulares diferentes que pueden ser de interés. Los tipos de células que están marcadas también pueden controlarse por la naturaleza del reactivo de formación de imágenes. Por ejemplo, las suspensiones coloidales sencillas del reactivo de formación de imágenes tenderán a captarse más rápidamente por células con actividad fagocítica. Como otro ejemplo, un reactivo de formación de imágenes puede formularse con o unirse covalentemente a un resto de dirección que facilite la dirección selectiva del reactivo de formación de imágenes a una población particular de células. Más adelante se describen adicionalmente reactivos de formación de imágenes. Después del marcaje, las células pueden administrarse inmediatamente o las células pueden almacenarse, cultivarse adicionalmente, purificarse, enriquecerse, segregarse o procesarse de cualquier forma que no sea incompatible con el uso deseado de dichas células.

En el presente documento también se describe que las células marcadas pueden administrarse para un fin terapéutico. La tecnología descrita en el presente documento puede usarse para supervisar el tráfico de agentes terapéuticos celulares *in vivo* o en cualquier otro medio deseado, tal como un explante de tejido. Durante muchos años se han usado trasplantes de células de médula ósea en receptores de terapias ablativas para cánceres. También se han usado diversas poblaciones de células purificadas en lugar de médula ósea, tales como poblaciones celulares enriquecidas en células madre hematopoyéticas; por ejemplo, pueden recogerse células de sangre de cordón umbilical o sangre periférica. Después de entrar en el torrente sanguíneo, las células madre generalmente se desplazan hasta la médula ósea, donde empiezan a producir nuevos glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. Este injerto normalmente se produce en un periodo de aproximadamente 2 a 4 semanas después

del trasplante. Tradicionalmente, el injerto se supervisa mediante ensayos frecuentes de recuento de sangre, y la recuperación completa de la función inmunitaria generalmente requiere varios meses (para receptores de trasplantes autólogos) a años (para pacientes que reciben trasplantes alogénicos o singénicos). El muestreo de células por aspiración de la médula ósea puede proporcionar una información adicional sobre la función de las células trasplantadas. Estas técnicas de supervisión pueden mejorarse por el marcaje *ex vivo* de las células a trasplantar (o alguna pequeña fracción de dichas células), permitiendo de esta manera una supervisión no invasiva de la localización y movimiento de las células trasplantadas por técnicas de resonancia magnética nuclear. El trasplante alogénico no mieloablativo (es decir, el trasplante de intensidad reducida) es una terapia celular similar que puede ser eficaz para tratar varios tipos de cáncer. En general, esta técnica se basa en una menor dosis de radiación y/o agente quimioterapéutico y una enfermedad de injerto frente a hospedador limitada (la acción de células inmunitarias del trasplante contra cualquier célula cancerosa del hospedador residual) para proporcionar una actividad anticancerosa suficiente, así como el potencial hematopoyético de las células del injerto de restaurar el sistema hematopoyético del paciente. Como ocurre con un injerto ablativo tradicional, las técnicas descritas en el presente documento pueden usarse para supervisar las localizaciones y movimientos de células de injerto en un trasplante alogénico no mieloablativo.

También se están desarrollando agentes terapéuticos celulares para uso en la liberación de proteínas terapéuticas. También se describe en el presente documento que pueden aislarse células, cultivarse en cantidad *ex vivo* y después implantarse para producir y secretar factores solubles, que pueden ser activos localmente (por ejemplo, enzimas, citocinas y neurotransmisores) o a una distancia (por ejemplo, hormonas y reguladores del crecimiento). También pueden administrarse células a un paciente para realizar fines terapéuticos complejos, tales como la reconstitución de tejidos, órganos o respuestas inmunitarias basándose en su capacidad de alojarse en sitios específicos dentro del cuerpo, salir de la circulación e integrarse en tejidos circundantes o diferenciarse para reemplazar tejidos dañados. También se han propuesto terapias de células madre para una miríada de enfermedades que incluyen trastornos neurológicos, particularmente los caracterizados por muerte celular (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, ictus y lesión cerebral causada por traumatismo), trastornos cardiovasculares (por ejemplo, infarto de miocardio), regeneración muscular (por ejemplo, en pacientes que padecen caquexia u otros trastornos debilitantes), regeneración pancreática en diabetes, regeneración hepática, etc. En cualquier caso, las células, o una subpoblación de las mismas, pueden marcarse con un reactivo de formación de imágenes *ex vivo* antes de la administración, permitiendo de esta manera la supervisión de estas células *in vivo*. La supervisión *in vivo* por una técnica de resonancia magnética nuclear puede ser útil, por ejemplo, para evaluar la viabilidad de las células administradas. Un médico puede adaptar un programa de dosificación dependiendo del grado en el que se detectan células marcadas en un paciente después de su administración. La supervisión *in vivo* también puede ser útil para determinar si las células terapéuticas se han localizado en una localización deseada. En general, será posible investigar correlaciones entre el comportamiento de migración de células terapéuticas *in vivo*, así como el número y/o la supervivencia de células terapéuticas *in vivo*, y los resultados terapéuticos. Cuando se han establecido dichas correlaciones, la formación de imágenes *in vivo* de las células terapéuticas puede usarse como indicador de pronóstico que puede ser útil para seleccionar la dosificación, los modos de administración y las intervenciones terapéuticas adicionales apropiadas que beneficiarán al paciente. Ciertos avances de formación de imágenes descritos en el presente documento proporcionarán beneficio a una amplia serie de estrategias terapéuticas celulares, porque estas metodologías de formación de imágenes podrán detectar *cuándo*, *dónde* y *si* las células terapéuticas se han liberado en las dianas deseadas *in vivo*. Además, la detección de las células marcadas puede mejorarse por la cuantificación de células marcadas en un ROI, tal como un órgano o tejido particular.

Un ejemplo de una aplicación de tecnología desvelada en el presente documento es el rastreo de células dendríticas (CD). Se sabe que las CD son las células presentadoras de antígeno más eficaces y tienen la capacidad de estimular a las células T vírgenes para iniciar una respuesta inmunitaria. Como las CD son los estimuladores más potentes de la respuesta inmunitaria en el cuerpo, las CD representan una posible estrategia terapéutica para aumentar la "visibilidad" de tumores para el sistema inmunitario de un paciente. Las CD son el centro de las vacunas de tumores que se están desarrollando. Se usan diversos métodos para exponer las células dendríticas a antígenos tumorales *ex vivo*, después de lo cual, las células dendríticas educadas se vuelven a infundir para estimular el desarrollo de la destrucción del tumor mediada por células T. En el documento WO2005072780 se presentan datos que aplican un método descrito en el presente documento al marcaje y rastreo de CD y otros tipos celulares.

Además de las CD, otros tipos celulares han demostrado ser prometedores para la inmunoterapia en cáncer y otras enfermedades tales como diabetes, aunque su progreso se ha visto impedido por muchos factores, incluyendo la incapacidad de observar su movimiento después del trasplante en animales y seres humanos. Las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), cuando se recogen, se tratan *ex vivo* y se trasplantan, han demostrado la capacidad de destruir las células tumorales metastásicas. Otros tipos celulares tratados *ex vivo* y trasplantados para promover la inmunidad del cáncer incluyen células asesinas activadas por linfocinas (LAK), linfocitos infiltrantes de tumores y monocitos activados asesinos. El trasplante de células T, que son glóbulos blancos que atacan a las células patógenas, ha demostrado ser prometedor contra una diversidad de cánceres, incluyendo el cáncer pancreático, en el que se están iniciando ensayos clínicos, y contra la esclerosis múltiple y la infección por VIH.

Además, en el presente documento se describe que pueden administrarse células marcadas a un sujeto con fines no terapéuticos. Por ejemplo, las células pueden marcarse *ex vivo*, administrarse a un sujeto y después detectarse, con

la expectativa de que las células marcadas se comporten de forma similar a células parecidas no marcadas *in vivo* y, por lo tanto, puedan usarse para supervisar el comportamiento de poblaciones de células endógenas. La supervisión puede usarse para rastrear movimientos de células, particularmente en el caso de células que se sabe que se mueven mucho, tales como las células del sistema inmunitario, muchos tipos de células madre y células presentes en la sangre. La supervisión también puede usarse para el rastreo de la viabilidad o adherencia de células no móviles en el sitio del implante. Las células de muchos tejidos, tales como el músculo, hígado, páncreas, riñón, cerebro o piel tenderán a ser relativamente estacionarias, pero la desaparición del marcador puede indicar una alta tasa de muerte, baja adherencia u otra información. Las técnicas modernas de cultivo y clasificación de células permiten el agrupamiento selectivo y el marcaje de prácticamente cualquier población celular deseada, incluyendo diversos tipos de células madre, tipos de células inmunitarias y otros tipos de células sanguíneas. Por ejemplo, pueden usarse marcadores de la superficie celular para clasificar poblaciones mixtas de células para purificar una población de interés. Como se describe en el documento WO2005072780 y en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/792003, tanto las células T como las células dendríticas pueden marcarse *ex vivo* y detectarse *in vivo*.

Como ejemplo, pueden usarse células inmunitarias marcadas como representantes detectables para los movimientos de las células inmunitarias en un paciente. Las células inmunitarias participan y son marcadores para una serie de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, así como para cánceres y para la formación de placas ateroscleróticas. Como metodología general, en un paciente puede detectarse cualquier proceso que implique el reclutamiento de células inmunitarias mediante la administración al paciente de células inmunitarias marcadas. La acumulación de un marcador en un área particular proporciona una indicación del grado de respuesta inmunitaria que se produce en esa parte del cuerpo. Tradicionalmente, estos tipos de estudios implican técnicas histológicas que son incompatibles con sujetos vivos. Ciertos métodos de la divulgación pueden facilitar el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas. La capacidad de rastrear poblaciones seleccionadas de células inmunitarias de forma no invasiva y sin el uso de radioisótopos puede impactar en muchas áreas de la inmunología básica y clínica, tales como esclerosis múltiple, diabetes, supervisión del rechazo de trasplante de órganos y cáncer. Por ejemplo, los tumores con frecuencia están altamente infiltrados por células inmunitarias. Pueden tomarse imágenes de las células marcadas en un sujeto para revelar la localización de un tumor, y en algunos casos puede ser útil como una exploración de detección no invasiva. La temprana detección de los cánceres ha sido un problema crítico, ya que la mayoría de los cánceres en estadio temprano se tratan fácilmente por cirugía sin recurrir a agentes quimioterapéuticos debilitantes. De forma similar, el progreso de otras enfermedades inflamatorias puede supervisarse por el rastreo de la de la dinámica de células inmunitarias en el paciente. También puede evaluarse la eficacia de la terapia inmunosupresora. En el caso de un receptor de trasplante de órganos, el receptor podría recibir una dosis de células inmunitarias marcadas antes de recibir el trasplante. La supervisión *in vivo* de la acumulación de células inmunitarias en el trasplante entonces podría usarse como un signo de advertencia temprano en las cavidades óseas del receptor, así como la supervivencia y el movimiento de las células marcadas en el receptor. Un médico puede usar información relacionada con el tráfico de las células del donante en un receptor como una indicación precoz del probable éxito o fracaso del procedimiento. Este tipo de detección precoz permitirá a los médicos adaptar el régimen terapéutico después del trasplante de acuerdo con ello. Otro agente terapéutico celular para el cáncer en el que puede aplicarse la tecnología de detección es el trasplante alogénico no mieloablativo o de intensidad reducida. Este procedimiento puede usarse con una infusión de linfocitos del donante para reforzar el efecto de injerto contra tumor que destruye las células cancerosas. En este caso, podría marcarse la población entera, o una fracción, de las células trasplantadas antes de la infusión. Después podría usarse una técnica de resonancia magnética nuclear para determinar hacia donde se mueven las células en el cuerpo, lo cual puede ser indicativo de la eficacia del procedimiento. Como con frecuencia es deseable limitar la dosis de células alogénicas para minimizar el rechazo, el patrón de tráfico de células puede usarse para calibrar la dosis. En las terapias celulares para el cáncer anteriores, puede ser deseable marcar selectivamente una o más subpoblaciones de las células trasplantadas (por ejemplo, células T o células madre CD34+) que se cree que tienen eficacia terapéutica.

Como ejemplo adicional, las células para uso en un trasplante de células de médula ósea, o un trasplante de células madre de sangre periférica, pueden marcarse *ex vivo* como se describe en el presente documento, administrarse y supervisarse *in vivo* mediante una técnica de resonancia magnética nuclear. Dicha supervisión puede usarse para evaluar el injerto de células del donante en las cavidades óseas del receptor, así como la supervivencia y el movimiento de las células marcadas en el receptor. Un médico puede usar información relacionada con el tráfico de las células del donante en un receptor como una indicación precoz del probable éxito o fracaso del procedimiento. Este tipo de detección precoz permitirá a los médicos adaptar el régimen terapéutico después del trasplante de acuerdo con ello. Otro agente terapéutico celular para el cáncer en el que puede aplicarse la tecnología de detección es el trasplante alogénico no mieloablativo o de intensidad reducida. Este procedimiento puede usarse con una infusión de linfocitos del donante para reforzar el efecto de injerto contra tumor que destruye las células cancerosas. En este caso, podría marcarse la población entera, o una fracción, de las células trasplantadas antes de la infusión. Después podría usarse una técnica de resonancia magnética nuclear para determinar hacia donde se mueven las células en el cuerpo, lo cual puede ser indicativo de la eficacia del procedimiento. Como con frecuencia es deseable limitar la dosis de células alogénicas para minimizar el rechazo, el patrón de tráfico de células puede usarse para calibrar la dosis. En las terapias celulares para el cáncer anteriores, puede ser deseable marcar selectivamente una o más subpoblaciones de las células trasplantadas (por ejemplo, células T o células madre CD34+) que se cree que tienen eficacia terapéutica.

Como ejemplo adicional, las células implicadas en la formación de un nuevo tejido, tal como en la angiogénesis, pueden marcarse, administrarse a un sujeto y detectarse para identificar puntos clave de formación de tejido. Por ejemplo, pueden marcarse células del músculo liso y/o células precursoras endoteliales e introducirse en el torrente sanguíneo. Es de esperar que dichas células se acumulen en sitios de actividad angiogénica. La actividad angiogénica puede asociarse con acontecimientos fisiológicos y patológicos tales como el ciclo menstrual, un embarazo precoz, la formación de vasos colaterales en respuesta a bloqueos arteriales, el desarrollo de tumores y la curación de heridas. De forma similar, pueden marcarse células implicadas en la curación de heridas, tales como fibroblastos, y administrarse sistémicamente o en un sitio en el que se sospecha que existe una lesión para supervisar el comportamiento celular.

Por ejemplo, puede proporcionarse un medicamento o dispositivo de liberación que contenga agregados celulares del linaje de los cardiomiocitos o células derivadas de los mismos, marcados, para el tratamiento de un cuerpo humano o animal, incluyendo formulaciones para terapia cardíaca. Las células de linaje de los cardiomiocitos pueden administrarse a un paciente en un método para reconstituir o suplementar la actividad contráctil y/o de marcapasos en el tejido cardíaco (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20060040389, 20050112104, 20050244384).

Además, en el presente documento se describe que las células del linaje de los cardiomiocitos marcadas pueden usarse para regenerar o reparar el músculo cardíaco estriado que se ha dañado por una enfermedad o por degeneración. Las células del linaje de los cardiomiocitos marcadas se integran con el tejido sano del receptor reemplazando la función de las células muertas o dañadas, regenerándose de esta manera el músculo cardíaco en su conjunto. El músculo cardíaco normalmente no tiene potencial reparador. Las células del linaje de los cardiomiocitos marcadas se usan, por ejemplo, en la regeneración del músculo cardíaco para varias indicaciones principales: (i) implantes de corazón isquémico, (ii) terapia para pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, (iii) prevención de enfermedades adicionales para pacientes sometidos a un injerto de bypass de arteria coronaria, (iv) regeneración de tejidos conductores, (v) regeneración del músculo liso de vasos y (vi) regeneración de válvulas.

La administración de las células puede dirigirse al corazón por una diversidad de procedimientos tales como la administración localizada. Las células madre mesenquimáticas pueden proceder de un espectro de fuentes que incluyen, en orden de preferencia: autólogas, alogénicas o xenogénicas. También se describe en el presente documento la supervisión del progreso de estas células *in vivo*.

Las células del linaje de los cardiomiocitos pueden ser células precursoras de cardiomiocitos o cardiomiocitos diferenciados. Los cardiomiocitos diferenciados incluyen uno o más de cardiomiocitos primarios, cardiomiocitos nodales (marcapasos); cardiomiocitos de conducción; y cardiomiocitos de trabajo (contráctiles), que pueden ser de tipo auricular o ventricular. Además, en el presente documento se describe que las células pueden proceder de una muestra de músculo (u otra muestra) que contiene células progenitoras musculares tales como células satélite (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20050244384). También se describe en el presente documento que las células pueden ser células madre mesenquimáticas (MSC) (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20050112104).

Un “precursor de cardiomiocitos” se define como una célula que es capaz (sin desdiferenciación o reprogramación) de producir una descendencia que incluye cardiomiocitos. Dichos precursores pueden expresar marcadores típicos del linaje, incluyendo, sin limitación, troponina I cardíaca (cTnI), troponina T cardíaca (cTnT), cadena pesada de miosina sarcomérica (MHC), GATA4, Nkx2.5, N-cadherina, 1-adrenoceptor beta (1-AR beta), ANF, la familia MEF-2 de factores de transcripción, creatina quinasa MB (CK-MB), mioglobina o factor natriurético auricular (ANF).

En ciertos casos, puede ocurrir que las células están tan asociadas con un sitio o estructura biológica de interés que las células marcadas pueden administrarse con el único fin de ayudar a la visualización de dicha estructura. Como se ha mencionado anteriormente, las células inmunitarias de forma característica se infiltran en los tumores. Por consiguiente, pueden administrarse células inmunitarias marcadas con el objetivo de visualizar tumores.

La tecnología desvelada en el presente documento puede aplicarse a estudios de modelos animales de enfermedades humanas. Diversos modelos animales de enfermedades pueden mostrar una supervivencia o dinámica alterada de una o más poblaciones celulares. Dichas poblaciones celulares pueden marcarse, administrarse al animal y supervisarse. Por ejemplo, puede supervisarse la infiltración de células inmunitarias en el páncreas del modelo de ratón NOD para la diabetes. Otros ejemplos de modelos animales incluyen: encefalomiелitis alérgica experimental (modelo de esclerosis múltiple), modelos tumorales de gliosarcoma y rechazo de trasplantes de órganos. Mediante el rastreo de poblaciones definidas fenotípicamente de células inmunitarias en estos modelos, se pueden esclarecer aspectos de la etiología de la enfermedad y supervisar cómo se ve afectado el tráfico de las células por los agentes terapéuticos. Este método puede usarse, por ejemplo, para seleccionar fármacos que tienen un efecto deseado en un modelo animal. Un ensayo de selección de fármacos puede comprender administrar células marcadas a un animal y detectar las células *in vivo* en presencia de un agente de ensayo. Los cambios en el comportamiento celular que están correlacionados con la presencia del agente de ensayo pueden ser indicativos de un efecto terapéutico. Dichos cambios pueden detectarse por comparación con una referencia adecuada que incluye, por ejemplo, el mismo animal antes y después del tratamiento con el agente de ensayo u otro animal no tratado. Además de un agente de ensayo, los métodos pueden usarse para evaluar los efectos de las condiciones de ensayo, tales como un régimen de ejercicio, lesiones, alteración genética, etc. Como ejemplo, es de esperar que un fármaco para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria reduzca la tendencia de las células inmunitarias de acumularse en un tejido afectado. Además de las evaluaciones en estado estacionario, los métodos desvelados en el presente documento pueden usarse para evaluar las propiedades cinéticas de las células, tales como la tasa a la que las células llegan a un sitio particular y el tiempo de persistencia de la señal en un sitio. Los ensayos de selección de fármacos pueden ser particularmente potentes cuando se combinan con supervisión *in vivo* de poblaciones celulares muy bien definidas, tales como ciertos grupos de células inmunitarias que están implicadas en diversos trastornos. Por ejemplo, la supervisión de células T citotóxicas marcadas puede ser particularmente útil

para identificar fármacos que pueden ser útiles para prevenir el rechazo de trasplantes. La capacidad de supervisar células *in vivo* proporciona un ensayo potente que puede aplicarse al análisis de esencialmente cualquier animal experimental, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los diversos ratones transgénicos o mutantes de otra forma que se han generado.

Varios grupos han estudiado el marcaje y la visualización de células inmunitarias usando agentes de contraste de MRI. Otros investigadores han usado agentes de contraste de MRI para marcar tipos celulares tales como células madre y precursores neuronales. La mayoría de estos estudios hacen que las células sean magnéticamente distintas mediante la incorporación de agentes de óxido de hierro superparamagnéticos (SPIO). También se han usado células marcadas con agentes de contraste que incorporan otros tipos de iones metálicos, particularmente gadolinio y manganeso. En estudios que utilizan estos agentes basados en iones metálicos, no se obtienen directamente imágenes de los compuestos; en su lugar, se observa su efecto indirecto sobre el agua circundante. La presencia del agente tiende a acortar los tiempos de relajación (T_1 , T_2 o T_2^*) del agua en las proximidades del compuesto; estos efectos pueden detectarse en imágenes ponderadas en tiempos de relajación. Los agentes SPIO, por ejemplo, confieren contraste a imágenes de ^1H convencionales alterando localmente el campo magnético experimentado por las moléculas de agua móviles cercanas, lo cual a su vez modula T_1 , T_2 o T_2^* . Los métodos descritos en el presente documento son claramente diferentes de todos los métodos que usan agentes de contraste basados en iones metálicos porque las señales de los núcleos de ^{19}F en los reactivos de formación de imágenes pueden detectarse directamente y, opcionalmente, proporcionar imágenes.

Un inconveniente intrínseco de la detección de células marcadas usando agentes de contraste basados en iones metálicos es que, con frecuencia, uno se encuentra con una situación en la que es necesario interpretar cambios sutiles en un contraste de escala de grises en regiones que se cree que contienen células marcadas. La gran señal de fondo de ^1H procedente de la alta concentración de agua móvil presente en los tejidos puede hacer difícil identificar de forma inequívoca regiones que contienen células marcadas; esto es especialmente problemático sin la biodistribución de células marcadas no se conoce *a priori*. Los resultados de una imagen "instantánea" con frecuencia son ambiguos en cuanto a si las células marcadas están presentes en un tejido específico. Este es un problema particularmente molesto cuando se intenta detectar células marcadas con SPIO en órganos cargados de hierro que aparecen intrínsecamente oscuros en imágenes anatómicas (ponderados en T_2 o T_2^*), tales como en el hígado o el bazo. Con frecuencia, se tiene que recurrir a detectar los cambios de intensidad de la imagen en lapsos de tiempo en un órgano particular durante un periodo de varias horas para verificar que se han acumulado células marcadas. Además, la cuantificación de células marcadas *in vivo* en regiones de interés usando agentes de contraste basados en iones metálicos es problemática, y generalmente no hay una forma sencilla y fiable de hacer esto usando IRM ponderada en tiempos de relajación o usando mapas cuantitativos de IRM con tiempos de relajación.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la solicitud pueden encontrar aplicación en espectroscopia por RM de ^{19}F (SRM), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) y formación de imágenes espectroscópicas por resonancia magnética (ISRM).

En otro aspecto de la solicitud, las emulsiones de la solicitud pueden usarse para el marcaje *in situ* de macrófagos y monocitos residentes. En esta aplicación, se inyecta por vía intravenosa (iv) directamente una embolada de emulsión. Aquí, la emulsión se tampona apropiadamente (por ejemplo, un pH fisiológicamente seguro, osmolaridad, etc.) para una inyección iv segura. Después de la inyección, las gotas de emulsión se retiran de la sangre por células fagocíticas residentes, tales como neutrófilos, macrófagos y monocitos. Estas células marcadas participan en acontecimientos inflamatorios dentro del cuerpo. Cuando en un sitio se acumulan cantidades suficientes de estas células marcadas *in situ*, se vuelven detectables usando SRM/IRM de ^{19}F *in vivo* o en tejido escindido (de una biopsia o necropsia). La cantidad absoluta de núcleos de ^{19}F o la cantidad de señales de ^{19}F presentes en un tejido (medidas *in vivo* o *ex vivo*) se correlaciona directamente con el grado o extensión de inflamación presente. Además, en el presente documento se describe que la señal de ^{19}F puede ser un diagnóstico de inflamación, biomarcador cuantitativo o indicador de inflamación.

Una embolada de emulsión puede inyectarse iv, y las gotas de emulsión se captan por fagocitos residentes que migran a un tumor. La detección de ^{19}F en el tumor es una herramienta de diagnóstico que identifica la localización del tumor, así como la distribución y el grado de su actividad de macrófagos o de inflamación. Además, se sabe que el perfluoro-15-corona-5 éter, un componente principal de las emulsiones, se coordina o se une al oxígeno. En la técnica se sabe que esta molécula, en presencia de oxígeno, tiene sus tiempos de relajación de RMN de ^{19}F (T_1 , T_2 y T_2^*) acortados en una cantidad que es linealmente proporcional a la presión parcial de oxígeno ($p\text{O}_2$) local. En particular, el tiempo de relajación de la red de spin de ^{19}F (T_1) de perfluoro-15-corona-5 éter es muy sensible a la $p\text{O}_2$ (C.H. Sotak, *et al.*, *Magn. Reson. Med.* 29, 188 (1993)). De esta manera, las mediciones de T_1 del perfluoro-15-corona-5 éter intersticial e incorporado en los macrófagos en el tumor pueden usarse para medir la $p\text{O}_2$, que puede ser un marcador sensible de la eficacia de una diversidad de agentes terapéuticos para el cáncer. Las emulsiones de la solicitud pueden usarse para ensayar la hipoxia o la hiperoxia. La detección de $p\text{O}_2$ en los tejidos puede conseguirse mediante inyección directa de emulsiones en el tejido.

También se describe en el presente documento que las emulsiones de la solicitud pueden usarse para detectar una amplia serie de lesiones y enfermedades en las que está presente la inflamación. Además, en el presente

documento se describe que la enfermedad puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, lupus, enfermedad de Crohn, neuritis óptica, etc.), rechazo de trasplantes de órganos, enfermedades infecciosas y lesión traumática cerebral y de la médula espinal.

Las emulsiones de la solicitud pueden usarse para obtener imágenes de lesiones del hígado a través de una imagen de ^{19}F de la distribución de la emulsión en ese órgano. Las emulsiones de la solicitud que se inyectan por vía iv pueden eliminarse por el hígado y captarse por las células hepáticas. Las lesiones del hígado pueden dar como resultado distribuciones anómalas y heterogéneas de captación de la emulsión e intensidad de las imágenes de ^{19}F .

Las emulsiones de la solicitud pueden usarse como sonda de oxigenación de tejidos. Las emulsiones de la solicitud pueden servir como sensor para el pO₂ en tejidos usando SRM/IRM de ^{19}F . El perfluoro-15-corona-5 éter se coordina con el oxígeno, cambiando de esta manera su valor de T1 ^{19}F varias veces. De esta manera, una medición del T1 ^{19}F por SRM o IRM (por ejemplo, usando un mapa de imágenes de T1) proporciona una medición cuantitativa de la pO₂. (Véase Taylor J, y Deutsch C. Biophys J 53: 227-233, 1988; Mason, R. P.; Rodbumrung, W.; Antich, P. P. NMR Biomed 9: 125-134; 1996; Laukemper-Ostendorf, S.; Scholz, A.; Burger, K.; Heussel, C. P.; Schmittner, M.; Weiler, N.; Markstaller, K.; Eberle, B.; Kauczor, H. U.; Quintel, M.; Thelen, M.; Schreiber, W. G. Magn Reson Med 47: 82-89; 2002; y Kim, J. G.; Zhao, D.; Song, Y.; Constantinescu, A.; Mason, R. P.; Liu, H. J Biomed Opt 8: 53-62; 2003).

Las emulsiones de la solicitud se pueden acumular en áreas con una permeabilidad vascular elevada, tales como, por ejemplo, en tumores. Las emulsiones de la solicitud pueden usarse para ensayar la perfusión de tejidos, proporcionar la posibilidad de determinar los volúmenes de sangre en tejidos, para acortar selectivamente los tiempos de relajación o densidades de la sangre y para visualizar gráficamente la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Las emulsiones de la solicitud pueden usarse para el diagnóstico específico de tumores malignos, el control temprano de terapias en caso de terapia citostática, antiflogística o vasodilatadora, la detección precoz de áreas infraperfundidas (por ejemplo, en el miocardio), angiografía en enfermedades vasculares y la detección y diagnóstico de inflamaciones estériles o infecciosas.

Las emulsiones de la solicitud pueden usarse como un portador de oxígeno artificial o sustituto de sangre artificial (véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040057906, patentes de Estados Unidos n.º 4.838.274 y 5.785.950 y el documento WO 96/40057). Las emulsiones pueden usarse *in vivo* o *ex vivo*. Las emulsiones de la divulgación pueden tener disueltas en su interior grandes cantidades de gases, incluyendo oxígeno, dióxido de carbono y aire, por unidad de volumen. Por consiguiente, pueden usarse fluorocarburos (FC) y perfluorocarburos (PFC) como portadores en aplicaciones en las que debe suministrarse oxígeno a los órganos y tejidos.

De esta manera, los métodos y composiciones desvelados en el presente documento proporcionan herramientas muy necesarias en los campos de la medicina y la biología.

2. Emulsiones

El reactivo de formación de imágenes usado en los presentes métodos es un fluorocarburo, es decir, una molécula que incluye al menos un enlace carbono-flúor. Gracias a los átomos de ^{19}F , los reactivos de formación de imágenes desvelados en el presente documento pueden detectarse por IRM de ^{19}F y otras técnicas de resonancia magnética nuclear, tales como técnicas de SRM. Un reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo puede tener una o más de las siguientes propiedades: 1) una citotoxicidad reducida; 2) un espectro de RMN de ^{19}F que es sencillo, teniendo idealmente una sola resonancia estrecha para minimizar los artefactos de desplazamiento químico; 3) alta sensibilidad con un gran número de átomos de flúor equivalentes de RMN en cada molécula; 4) formulado para permitir el marcaje eficaz de muchos tipos celulares y no restringido a células fagocíticas. Preferentemente, el reactivo de formación de imágenes comprende una pluralidad de átomos de flúor unidos a carbono, por ejemplo, más de 5, más de 10, más de 15 o más de 20 átomos de flúor unidos a carbono. Preferentemente, al menos 4, al menos 8, al menos 12 o al menos 16 de los átomos de flúor tienen un desplazamiento químico de RMN aproximadamente equivalente.

Para el marcaje de células en cultivo, los reactivos de formación de imágenes pueden emplearse en una o más de al menos tres modalidades: 1) reactivos de formación de imágenes que se internalizan o se absorben de otra manera por las células diana sin la formación de ninguna asociación covalente u otra asociación de unión; 2) reactivos de formación de imágenes que se unen covalentemente a las células diana; y 3) reactivos de formación de imágenes acoplados a moléculas, tales como anticuerpos o ligandos, que se unen a moléculas presentes en las células diana.

Los reactivos de formación de imágenes del primer tipo incluyen los éteres de perfluoro corona y otros perfluoropoliéteres (PFPE) que se captan por las células y, preferentemente, quedan retenidos en las células sin degradación durante un periodo de tiempo sustancial, por ejemplo, teniendo una semivida en la célula de al menos 1 hora, 4 horas, al menos aproximadamente un día, al menos aproximadamente tres días, o incluso al menos aproximadamente una semana. Por razones obvias, se prefiere que el reactivo de formación de imágenes no interfiera con las funciones celulares normales o presente citotoxicidad a las concentraciones empleadas para el

marcaje. Como se demuestra en el presente documento, los perfluoropoliéteres muestran un efecto tóxico reducido en las células marcadas.

Los reactivos de formación de imágenes del segundo tipo incluyen compuestos electrófilos que reaccionan con sitios nucleófilos en la superficie celular, tales como grupos tiol, amino y/o hidroxilo expuestos. Por consiguiente, los reactivos de formación de imágenes tales como maleimidas, yoduros de alquilo, N-hidroxisuccinimida o ésteres de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS o ésteres de sulfo-NHS), acil succinimidas y similares, pueden formar enlaces covalentes con las superficies celulares. Otras técnicas usadas en el acoplamiento de proteínas pueden adaptarse para acoplar reactivos de formación de imágenes a las proteínas de la superficie celular. Véase Means *et al.* (1990) *Bioconjugate Chemistry* 1: 2-12, para estrategias adicionales de dicho acoplamiento.

Los reactivos de formación de imágenes del tercer tipo pueden prepararse mediante la reacción de reactivos de formación de imágenes del segundo tipo no con las propias células, sino con un resto funcional que sea un ligando o anticuerpo que se dirige a la célula. Los ligandos y anticuerpos adecuados pueden seleccionarse para la aplicación de complemento o un fragmento de cualquiera de estas. Las células tratadas con esta molécula indiscriminada *ex vivo* absorberán el reactivo de formación de imágenes. Cuando dichas células marcadas se implantan en un animal, tal como un mamífero, el reactivo de formación de imágenes puede usarse para visualizar y/o rastrear las células implantadas por técnicas de resonancia magnética nuclear.

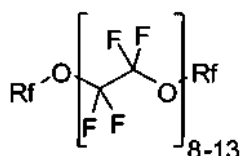
Como alternativa, un reactivo de formación de imágenes puede acoplarse a un péptido de internalización indiscriminado, tal como proteína antepennepedia, proteína de transactivación de VIH (TAT), mastoparín, melitina, bombolitina, hemolisina delta, pardaxina, exotoxina A de pseudomonas, clatrina, toxina diftérica, proteína C9 del complemento o un fragmento de cualquiera de estas. Las células tratadas con esta molécula indiscriminada *ex vivo* absorberán el reactivo de formación de imágenes. Cuando dichas células marcadas se implantan en un animal, tal como un mamífero, el reactivo de formación de imágenes puede usarse para visualizar y/o rastrear las células implantadas por técnicas de resonancia magnética nuclear.

El péptido de internalización puede proceder de la proteína antepennepedia de *Drosophila* u homólogos de la misma. Se ha demostrado que el homeodominio de 60 aminoácidos de longitud de la homeoproteína antepennepedia se transloca a través de las membranas biológicas y puede facilitar la translocación de polipéptidos heterólogos a los que se acopla. Véase, por ejemplo, Derossi *et al.* (1994) *J Biol Chem* 269: 10444-10450; y Perez *et al.* (1992) *J Cell Sci* 102: 717-722. Se ha demostrado que fragmentos tan pequeños como fragmentos de 16 aminoácidos de longitud de esta proteína son suficientes para dirigir la internalización. Véase Derossi *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271: 18188-18193.

Otro ejemplo de un péptido de internalización es la proteína transactivadora de VIH (TAT). Esta proteína parece estar dividida en cuatro dominios (Kuppuswamy *et al.* (1989) *Nucl. Acids Res.* 17: 3551-3561). La proteína TAT purificada se capta por las células en cultivos tisulares (Frankel y Pabo, (1989) *Cell* 55: 1189-1193) y los péptidos, tales como el fragmento que corresponde a los restos 37-62 de TAT, se captan rápidamente por la célula *in vitro* (Green y Loewenstein, (1989) *Cell* 55: 1179-1188). La región altamente básica media la internalización y dirección del resto de internalización al núcleo (Ruben *et al.*, (1989) *J. Virol.* 63: 1-8). Los péptidos o análogos que incluyen una secuencia presente en la región altamente básica pueden conjugarse con reactivos de formación de imágenes fluorados para ayudar a la internalización y dirección de esos reactivos al medio intracelular.

La presente invención proporciona nuevas composiciones caracterizadas en las reivindicaciones adjuntas que comprenden reactivos de formación de imágenes. Con más detalle, la presente invención proporciona una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, un emulsionante, una co-mezcla de tensioactivo y un aditivo, donde el emulsionante comprende ricinoleato de glicerol polietilenglicol. En ciertas realizaciones, la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina (es decir, fosfatidilcolina de huevo lipóide), colesterol y dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE). En ciertas de estas realizaciones, la co-mezcla de tensioactivo comprende un 70 % en moles de lecitina; un 28 % en moles de colesterol y un 2 % en moles de DPPI. En ciertas realizaciones, el aditivo es propilenglicol.

Como se usa en el presente documento, la expresión "óxido de PFPE" se refiere a perfluoropoli(etilenglicol) dialquil éter (por ejemplo, como puede adquirirse de Exfluor Inc., TX),



Óxido de PFPE
(Rf = CF₃, CF₂CF₃),

donde Rf es CF₃ y CF₂CF₃ en una relación de 2:1, basándose en el análisis de RMN de ¹⁹F.

El emulsionante también descrito en el presente documento puede ser un solubilizante no iónico. De acuerdo con la presente invención, el emulsionante comprende ricinoleato de glicerol polietilenglicol. En ciertas de estas realizaciones, el emulsionante comprende además ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol, polietilenglicoles libres y glicerol etoxilado.

En ciertas realizaciones, el emulsionante se prepara haciendo reaccionar aceite de ricino y óxido de etileno en una relación molar de 1:35. Pueden obtenerse emulsionantes ejemplares de BASF Corporation y se venden con el nombre comercial Cremophor® EL.

En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 20 % al 50 % p/v, tal como del 25 % al 45 % p/v, tal como del 30 % al 40 % p/v, tal como un 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 % o 40 % p/v. En ciertas de estas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 35 % al 36 % p/v, tal como en un 35,1 %, 35,2 %, 35,3 %, 35,4 %, 35,5 %, 35,6 %, 35,7 %, 35,8 % o 35,9 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 35,6 % p/v.

En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende Cremophor® EL en el intervalo del 1 % al 10 % p/v, tal como del 1 % al 5 % p/v, tal como un 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende Cremophor® EL en un 3 % p/v.

En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y propilenglicol comprende propilenglicol en el intervalo del 1 % al 10 % p/v, tal como del 1 % al 5 % p/v, tal como un 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y propilenglicol comprende propilenglicol en un 2 % p/v.

En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) y una co-mezcla de tensioactivo, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, comprende la co-mezcla de tensioactivo, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, en el intervalo del 1 % al 10 % p/v, tal como del 1 % al 5 % p/v, tal como un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, o 5 % p/v. En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) y una co-mezcla de tensioactivo, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, comprende la co-mezcla de tensioactivo, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, en un 2 % p/v.

En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende además polietilamina. En ciertas de estas realizaciones, la composición acuosa comprende polietilamina en el intervalo del 0,01 % al 5,0 % p/p. En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE), un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) y polietilamina comprende además sulfato de protamina. En ciertas de estas realizaciones, la composición acuosa comprende además sulfato de protamina en el intervalo del 0,01 % al 5,0 % p/p.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 35,6 % p/v, Cremophor® EL en un 3,0 % p/v, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) en un 2,0 % p/v y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) en un 2,0 % p/v.

Los términos emulsión y nanoemulsión, como se usan en esta memoria descriptiva, son equivalentes a menos que se indique específicamente lo contrario. En ciertas realizaciones, la emulsión puede comprender además un copolímero de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol. En ciertas realizaciones, la emulsión puede comprender además un Pluronic™. Los tensioactivos Pluronic™ no iónicos, bloque de poli(óxido de etileno) (PEO)/poli(óxido de propileno) (PPO)/poli(óxido de etileno) (PEO) (tipo ABA), copolímeros de bloque (PEO/PPO/PEO) presentan un amplio intervalo de hidrofilia/hidrofobia en función de la relación de PEO/PPO, de forma que se puede esperar

obtener diferentes morfologías de fases separadas con polímeros tales como PLA, así como diferentes grados de hidratación de la matriz. En particular, la hidratación juega un papel importante en la determinación de la degradación del polímero a través de la hidrólisis del esqueleto del éster. Estos tensioactivos poliméricos presentaron toxicidades mínimas *in vivo* y algunos de ellos están en uso clínico, como se describe por BASF Corporation en su boletín técnico de 1989; Attwood, *et al.*, Int. J. Pharm. 26, 25 (1985); y patente de Estados Unidos n.º 4.188.373 de Krezanoski. Estos materiales pueden obtenerse en BASF Corporation. En ciertas realizaciones, las emulsiones de la presente invención comprenden además copolímero tri-bloque que comprende poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno).

En ciertas realizaciones, las emulsiones de la presente invención comprenden un copolímero tri-bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) que comprende un 80 % de contenido de PEO. En ciertas de estas realizaciones, el valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) del copolímero tri-bloque es 29, donde el valor de HLB puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$HLB = -36 \frac{m}{2n + m} + 33$$

donde n representa el número de unidades repetidas en el segmento de PEO del polímero y m representa el número de unidades repetidas en el segmento de PPO del polímero.

Pueden obtenerse copolímeros tri-bloque ejemplares en BASF Corporation y se venden con el nombre comercial de Pluronic™ F68.

En el presente documento también se describe una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68. La composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68, puede comprender perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 10 % al 20 % p/p, tal como del 12 % al 17 % p/p, tal como un 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 % o 17 % p/p. También se describe en el presente documento que la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68, puede comprender perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 15 % p/p y que la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68, puede comprender el Pluronic™ F68 en el intervalo del 0,1 % al 2,0 % p/p, tal como del 0,1 % al 1,0 % p/p, tal como un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 % o 1,0 % p/p. Además, en el presente documento se describe que la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68 puede comprender el Pluronic™ F68 en un 0,6 % p/p.

En el presente documento también se describe una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 15 % p/p y el Pluronic™ F68 en un 0,6 % p/p.

Además, en el presente documento se describe que la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68 puede comprender además sulfato de protamina. También se describe en el presente documento que la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, el Pluronic™ F68 y sulfato de protamina puede comprender sulfato de protamina en el intervalo del 0,01 % al 1,0 % p/p, tal como del 0,01 % al 0,5 % p/p, tal como del 0,01 % al 0,10 % p/p, tal como un 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 % o 0,10 % p/p. Además, en el presente documento se describe que la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, el Pluronic™ F68 y sulfato de protamina puede comprender sulfato de protamina en un 0,04 % p/p.

También se describe en el presente documento que la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68 además puede comprender polietilamina. También se describe en el presente documento una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 15 % p/p, el Pluronic™ F68 en un 0,6 % p/p y sulfato de protamina en un 0,04 % p/p.

La presente invención también proporciona formulaciones de las composiciones de la presente invención caracterizadas en las reivindicaciones adjuntas que son adecuadas para la captación por las células. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden formularse como una emulsión. Como ejemplo, la presente invención proporciona una emulsión que comprende una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo y un aditivo. En ciertas realizaciones, la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE). En ciertas de estas realizaciones, la co-mezcla de tensioactivo comprende un 70 % en moles de lecitina; un 28 % en moles de colesterol; y un 2 % en moles de DPPI. En ciertas realizaciones, el aditivo es propilenglicol.

En ciertas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el

intervalo del 20 % al 50 % p/v, tal como del 25 % al 45 % p/v, tal como del 30 % al 40 % p/v, tal como un 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 % o 40 % p/v. En ciertas de estas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 35 % al 36 % p/v, tal como un 35,1 %, 35,2 %, 35,3 %, 35,4 %, 35,5 %, 35,6 %, 35,7 %, 35,8 %, o 35,9 % p/v. En ciertas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 35,6 % p/v.

En ciertas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende Cremophor® EL en el intervalo del 1 % al 10 % p/v, tal como del 1 % al 5 % p/v, tal como un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, o 5 % p/v. En ciertas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) comprende Cremophor® EL en un 3 % p/v.

En ciertas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y propilenglicol comprende propilenglicol en el intervalo del 1 % al 10 % p/v, tal como del 1 % al 5 % p/v, tal como un 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % p/v. En ciertas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) y propilenglicol comprende propilenglicol en un 2 % p/v.

En ciertas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) y una co-mezcla de tensioactivo, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, comprende la co-mezcla de tensioactivo, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, en el intervalo del 1 % al 10 % p/v, tal como del 1 % al 5 % p/v, tal como un 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % p/v.

En ciertas realizaciones de la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, Cremophor® EL, un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) y una co-mezcla de tensioactivo, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, comprende la co-mezcla de tensioactivo, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE en un 2 % p/v.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una emulsión que comprende una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 35,6 % p/v, Cremophor® EL en un 3,0 % p/v, una co-mezcla de tensioactivo (por ejemplo, que comprende lecitina, colesterol y DPPE) en un 2,0 % p/v y un aditivo (por ejemplo, propilenglicol) en un 2,0 % p/v.

En el presente documento también se describe una emulsión que comprende una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68. Además, en el presente documento se describe que, en la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68, puede comprender perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en el intervalo del 10 % al 20 % p/p, tal como del 12 % al 17 % p/p, tal como un 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 % o 17 % p/p. En el presente documento también se describe que, en la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68 puede comprender perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 15 % p/p. Además, en el presente documento se describe que, en la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68 puede comprender el Pluronic™ F68 en el intervalo del 0,1 % al 2,0 % p/p, tal como del 0,1 % al 1,0 % p/p, tal como un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 % o 1,0 % p/p. También se describe en el presente documento que, en la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68 puede comprender el Pluronic™ F68 en un 0,6 % p/p.

En el presente documento también se describe una emulsión que comprende una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 15 % p/p y el Pluronic™ F68 en un 0,6 % p/p.

Además, en el presente documento también se describe que, en la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE y el Pluronic™ F68 puede comprender además sulfato de protamina. Además, en el presente documento se describe que, en la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, el Pluronic™ F68 y el sulfato de protamina puede comprender sulfato de protamina en el intervalo del 0,01 % al 1,0 % p/p, tal como del 0,01 % al 0,5 % p/p, tal como del 0,01 % al 0,10 % p/p, tal como un 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 % o 0,10 % p/p. Además, en el presente documento se describe que, en la emulsión anterior, la composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, el Pluronic™ F68 y sulfato de protamina puede comprender

sulfato de protamina en un 0,04 % p/p.

En el presente documento también se describe una emulsión que comprende una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en un 15 % p/p, el Pluronic™ F68 en un 0,6 % p/p y sulfato de protamina en un 0,04 % p/p.

En ciertas realizaciones, las composiciones y las emulsiones de la presente invención comprenden Cremophor® EL, un solubilizante no iónico y un emulsionante que comprende ricinoleato de polietilenglicol, obtenido por la reacción de aceite de ricino con óxido de etileno en una relación molar de 1:35. Este material puede obtenerse de BASF Corporation.

En ciertas realizaciones, la emulsión puede comprender además un lípido. En ciertas realizaciones de emulsiones de la presente invención que comprenden además un lípido, el lípido es DMPC. En ciertas realizaciones de emulsiones de la presente invención que comprenden además un lípido, la emulsión comprende además un Pluronic™. En ciertas realizaciones, el Pluronic™ es F68.

En ciertas realizaciones, la emulsión puede comprender además polietilamina.

En ciertas realizaciones, la emulsión puede comprender además sulfato de protamina.

En ciertas realizaciones de emulsiones de la presente invención que comprenden además sulfato de protamina, la emulsión comprende además un Pluronic™. En ciertas realizaciones, el Pluronic™ es F68. En ciertas realizaciones, la emulsión de la presente invención comprende además sulfato de protamina.

Las emulsiones de la presente invención preferentemente tendrán una distribución de tamaños de gotas que permitirán la captación celular adecuada. En ciertas realizaciones, puede ser ventajoso un tamaño de gotas uniforme. El grado deseado de uniformidad del tamaño de las gotas puede variar dependiendo de la aplicación. En ciertas realizaciones, la emulsión tiene un tamaño medio de gotas menor de 500 nm, o menor de 400 nm, o menor de 300 nm, o menor de 200 nm de diámetro. Opcionalmente, un 25 % o 50 % o 75 % o más de las gotas caerán dentro del intervalo seleccionado. Los tamaños de las gotas pueden evaluarse, por ejemplo, por técnicas de dispersión de luz o por visualización de las gotas de emulsión usando micrografías EM. En ciertos tipos celulares que tienen una cantidad relativamente pequeña de citoplasma, tales como la mayoría de las células madre, las emulsiones tienen un tamaño medio de gotas menor de 200 nm, o menor de 100 nm, o menor de 50 nm de diámetro.

En ciertas realizaciones, es ventajoso un tamaño de gotas pequeño. En ciertas realizaciones, el tamaño de gotas pequeño aumenta el tiempo de circulación en aplicaciones en las que la emulsión se inyecta por vía iv. En ciertas realizaciones, las gotas se separan de las células por circulación. En ciertas realizaciones, el pequeño tamaño de las gotas aumenta el marcaje de las células *ex vivo*.

En ciertas realizaciones, el pequeño tamaño de gotas aumenta el marcaje uniforme.

Las emulsiones para uso en células preferentemente deben ser estables en un amplio intervalo de temperaturas. En ciertas realizaciones, las emulsiones serán estables a la temperatura corporal (37 °C en el caso de los seres humanos) y a una temperatura de almacenamiento, tal como 4 °C o la temperatura ambiente (20-25 °C). Por ejemplo, con frecuencia será deseable almacenar la emulsión a una temperatura fría, en el intervalo de 2 - 10 °C, tal como 4 °C, y después calentar la emulsión temperatura ambiente (por ejemplo, de 18 a 28 °C y, más típicamente, de 20 a 25 °C). Después de marcar las células, la emulsión experimentará una temperatura de aproximadamente 37 °C. Por consiguiente, una emulsión preferida retendrá el intervalo deseado de tamaño de gotas a temperaturas que varían desde las temperaturas de refrigeración hasta la temperatura corporal. En ciertas realizaciones, la emulsión es estable a temperaturas que varían de 4 °C a 37 °C.

En ciertas realizaciones, la emulsión tiene un índice de polidispersidad que varía de 0,1 a 0,2.

Las propiedades de una emulsión pueden controlarse principalmente por las propiedades del propio reactivo de formación de imágenes, la naturaleza de los tensioactivos y/o disolventes usados, y los tipos de dispositivo de procesamiento (por ejemplo, sonicador, microfluidizador, homogeneizador, etc.). En las patentes de Estados Unidos n.º 5.330.681 y 4.990.283 se describen ampliamente métodos para formar emulsiones con ciertas moléculas de PFPE. Puede ser eficaz una fase continua de un compuesto polihidroxilado, tal como polialcoholes y sacáridos en una solución acuosa concentrada. Los siguientes polialcoholes y sacáridos han resultado ser particularmente eficaces: glicerol, xilitol, manitol, sorbitol, glucosa, fructosa, sacarosa, maltitol, compuestos diméricos de glicerol (diglicerol o bis(2,3-di-hidroxipropil) éter, compuestos polihidroxilados solubles en agua sólidos tales como azúcares y productos de condensación de glicerol como triglicerol y tetraglicerol. La dispersión en la emulsión puede realizarse en presencia de tensioactivos convencionales, incluyendo tensioactivos catiónicos, aniónicos, anfóteros y no iónicos. Los ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen lauril sulfato sódico, sulfosuccinato (hemiéster sulfosuccínico), coco-anfocarboxiglicinato, cetil fosfato potásico, alquil polioxietileno-éter carboxilato sódico, cloruro de benzalconio

potásico, alquil amidopropil betaína, alcohol etoxilado cetil-estearílico y monooleato de sorbitan-etoxilato (20), Tween 20. Aunque pueden usarse ecuaciones termodinámicas para intentar predecir mezclas de reactivos de formación de imágenes que darán lugar a emulsiones que tienen los tamaños de gotas y la estabilidad deseados, generalmente se acepta que lo más eficaz será el ensayo real de diversas mezclas. La emulsificación de mezclas es sencilla y rápida, permitiendo un rápido ensayo de una amplia serie de combinaciones para identificar las que dan lugar a emulsiones que son adecuadas para uso en los métodos desvelados en el presente documento.

En las aplicaciones que implican el marcaje *ex vivo*, se diseñan emulsiones preferidas para facilitar la captación del reactivo de formación de imágenes por las células objeto. Un tensioactivo puede diseñarse para formar emulsiones estables que lleven una gran cantidad de perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE en la fase acuosa. Además, puede tener propiedades que aumenten la liberación intracelular de las gotas de la emulsión en el tiempo de incubación más corto posible. El aumento de la carga intracelular de perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE mejora la sensibilidad a las células marcadas. Además, la minimización del tiempo de cultivo puede ser importante cuando se trabaja con los cultivos celulares primarios. La eficacia de la captación intracelular depende del tipo celular. Por ejemplo, los macrófagos y algunas células dendríticas captarán por endocitosis casi cualquier partícula, mientras que otros tipos celulares de interés solo pueden ser débilmente fagocíticos. En cualquier caso, la eficacia de la captación puede reforzarse sustancialmente al diseñar el tensioactivo de forma que la superficie de la gota de la emulsión tenga propiedades que promuevan la captación celular en cultivo (es decir, gotas de emulsión de "autoliberación") (véase Janjic *et al.*, JACS, 2008, 130 (9), 2832 -2841 y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/062.710). La superficie de la gota de emulsión puede fabricarse de manera que tenga propiedades lipófilas, u opcionalmente catiónicas, mediante un diseño de tensioactivo apropiado. Por ejemplo, el tensioactivo puede incorporar lípidos, tales como lípidos catiónicos o neutros, emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas o liposomas, que tienden a unirse o a fusionarse con la superficie celular, aumentando de esta manera la captación de la gota de emulsión. La superficie de la gota de emulsión también puede incorporar señales de liberación de células tales como poliaminas. Los ejemplos incluyen emulsiones que tienen poliaminas, tales como polietilenimina o sulfato de protamina, incorporadas en la capa de tensioactivo de la gota de la emulsión durante el procesamiento.

En ciertas realizaciones, un sistema coloidal para uso como vehículo de liberación *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (es decir, una vesícula de membrana artificial). La preparación y uso de dichos sistemas es bien conocido en la técnica. Se describen lípidos catiónicos adecuados en lo siguiente: Feigner *et al.*, 1987, PNAS 84, 7413-7417; Eppstein *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 4.897.355), (Rose, patente de Estados Unidos n.º 5.279.833; Eppand *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.283.185; Gebeyehu *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.334.761; Nantz *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.527.928; Bailey *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.552.155; Jesse, patente de Estados Unidos n.º 5.578.475). Otros enfoques incluyen la incorporación en los péptidos tensioactivos (por ejemplo, oligo-Arg9 y péptidos de tipo TAT) que facilitan la entrada en las células, o anticuerpos que se dirigen a moléculas específicas de la superficie celular. Además, en ciertas realizaciones, se pueden incorporar pequeñas proteínas catiónicas en el tensioactivo, tales como sulfato de protamina, para aumentar la captación celular. El sulfato de protamina es no tóxico para las células y tiene la aprobación de la FDA para uso en seres humanos como antagonista de heparina. En ciertas realizaciones, se usan sistemas de dispersión coloidales, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas y perlas. En el presente documento se describen otros enfoques para aumentar la captación de los fluorocarburos emulsionados, tal como mediante el uso de agentes de transfección adicionales o mediante el uso de electroporación de las células.

En realizaciones preferidas, las emulsiones tienen propiedades de "autoliberación" sin tener que añadir reactivos potenciadores de la captación. Dichas emulsiones preferentemente son estables y tienen una vida útil de un periodo de meses o años.

Se entiende que los tensioactivos y reactivos potenciadores de la captación no deben considerarse grupos exclusivos y, en algunos casos, pueden superponerse.

3. Células y marcaje

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse con una amplia serie de células, incluyendo células tanto procariotas como eucariotas, y preferentemente células de mamífero. Las tecnologías para la preparación de células incluyen cultivo celular, clonación, transferencia nuclear, modificación genética y encapsulación, donde la clonación no incluye el proceso de clonación de seres humanos.

Una lista parcial de células de mamífero adecuadas incluye: células sanguíneas, mioblastos, células de médula ósea, células de sangre periférica, células de sangre de cordón umbilical, cardiomiocitos (y precursores de los mismos), condrocitos (células de cartílago), células dendríticas, tejido neural fetal, fibroblastos, hepatocitos (células hepáticas), células de islotes del páncreas, queratinocitos (células de la piel) y células madre. En ciertas realizaciones preferidas, las células a usar son una población fraccionada de células inmunitarias. Las subpoblaciones reconocidas de células inmunitarias incluyen los linfocitos, tales como linfocitos B (receptores Fc, MHC de clase II, CD19+, CD21+), linfocitos T hELer (CD3+, CD4+, CD8-), linfocitos T citolíticos (CD3+, CD4-, CD8+), células asesinas naturales (CD16+), los fagocitos mononucleares, incluyendo monocitos, neutrófilos y

macrófagos, y células dendríticas. Otros tipos celulares que pueden ser de interés incluyen eosinófilos y basófilos.

Las células pueden ser autólogas (es decir, proceder del mismo individuo) o singénicas (es decir, derivadas de un individuo genéticamente idéntico, tal como un hermano de camada singénico o un gemelo idéntico), aunque también se contemplan células alogénicas (es decir, células derivadas de un individuo genéticamente diferente de la misma especie). Aunque es menos preferido, también pueden administrarse células xenogénicas (es decir, derivadas de una especie diferente de la del receptor), tales como células de cerdos transgénicos. Cuando las células del donante son xenogénicas, se prefiere que las células se obtengan a partir de un individuo de una especie dentro del mismo orden, más preferentemente la misma superfamilia o familia (por ejemplo, cuando el receptor es un ser humano, se prefiere que las células procedan de un primate, más preferentemente un miembro de la superfamilia *Hominoidea*).

Cuando es médica y éticamente apropiado, las células pueden obtenerse de cualquier estadio del desarrollo del individuo donante, incluyendo un bebé (por ejemplo, desde el nacimiento hasta aproximadamente tres años de edad en seres humanos), niño (por ejemplo, desde aproximadamente tres años de edad a aproximadamente 13 años de edad en seres humanos), adolescente (por ejemplo, de aproximadamente 13 años de edad a aproximadamente 18 años de edad en seres humanos), adulto joven (por ejemplo, de aproximadamente 18 años de edad a aproximadamente 35 años de edad en seres humanos), adulto (de aproximadamente 35 años de edad a aproximadamente 55 años de edad en seres humanos) o anciano (por ejemplo, de aproximadamente 55 años o más en seres humanos), donde las células no proceden de un embrión humano.

En muchas realizaciones, las células se marcan poniendo en contacto las células con una emulsión del reactivo de formación de imágenes, de tal forma que el reactivo se capte por las células. Mediante dicho método pueden marcarse células tanto fagocíticas como no fagocíticas. Por ejemplo, como se demuestra en el documento WO2005072780, pueden marcarse tanto células dendríticas (fagocíticas) como células de gliosarcoma (no fagocíticas) poniendo en contacto las células con una emulsión del reactivo de formación de imágenes.

En ciertos aspectos, un método de la invención puede comprender marcar las células *in vivo* con un reactivo de formación de imágenes de ^{19}F y detectar las células marcadas en el sujeto. Las células a marcar pueden determinarse por propiedades específicas de las células, tales como la actividad fagocítica. Las células que se marcan pueden controlarse por la vía de administración del reactivo de formación de imágenes. Los tipos de células que se marcan pueden controlarse por la naturaleza del reactivo de formación de imágenes. Por ejemplo, las suspensiones coloidales sencillas del reactivo de formación de imágenes tenderán a captarse más rápidamente por las células con actividad fagocítica. Como otro ejemplo, un reactivo de formación de imágenes puede formularse o unirse covalentemente a un resto de dirección que facilita la dirección selectiva del reactivo de formación de imágenes a una población particular de células. En ciertas realizaciones, el reactivo de formación de imágenes comprende perfluoro-15-corona éter.

En ciertas realizaciones, las células a marcar son células madre, donde las células madre no son células madre embrionarias humanas. Las terapias de células madre comúnmente se usan como parte de un régimen ablativo para el tratamiento de cánceres con radiación de alta dosis y/o agentes quimioterapéuticos. Los regímenes ablativos generalmente emplean células madre hematopoyéticas, o poblaciones de células que contienen células madre hematopoyéticas, como las que pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea. Las células de este tipo, o una parte de las mismas, pueden marcarse y rastrearse *in vivo* para supervisar la supervivencia y el injerto en la localización apropiada. Cada vez son más atractivos otros tipos de células madre como agentes terapéuticos para una amplia diversidad de trastornos.

Como ejemplo, las células pueden ser células madre embrionarias de ratón, o células ES de otro animal modelo. El marcaje de dichas células puede ser útil para rastrear el destino de dichas células administradas a ratones, opcionalmente como parte de un programa de investigación preclínica para el desarrollo de terapias con células madre embrionarias. Los ejemplos de células madre embrionarias de ratón incluyen: la línea celular JM1 ES descrita en M. Qiu *et al.*, Genes Dev 9, 2523 (1995) y la línea ROSA descrita en G. Friedrich, P. Soriano, Genes Dev 5, 1513 (1991), y las células ES de ratón descritas en la patente de Estados Unidos n.º 6.190.910. Están disponibles muchas otras líneas ES de ratón en Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Los ejemplos de células madre embrionarias humanas también descritas en el presente documento incluyen las adquiribles a través de los siguientes proveedores: Arcos Bioscience, Inc., Foster City, California, CyThera, Inc., San Diego, California, BresaGen, Inc., Athens, Georgia, ES Cell International, Melbourne, Australia, Geron Corporation, Menlo Park, California, Göteborg University, Göteborg, Suecia, Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia, Maria Biotech Co. Ltd. - Maria Infertility Hospital Medical Institute, Seúl, Korea, MizMedi Hospital - Seoul National University, Seúl, Korea, National Centre for Biological Sciences/ Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore, India, Pochon CHA University, Seúl, Korea, Reliance Life Sciences, Mumbai, India, ReNeuron, Surrey, Reino Unido, StemCells, Inc., Palo Alto, California, Technion University, Haifa, Israel, University of California, San Francisco, California, y Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wisconsin. Además, se describen ejemplos de células madre embrionarias en las siguientes patentes de Estados Unidos y solicitudes de patente publicadas: 6.245.566; 6.200.806; 6.090.622; 6.331.406; 6.090.622; 5.843.780; 20020045259; 20020068045. Además, las células ES humanas también descritas en el presente documento pueden seleccionarse de la lista de líneas celulares aprobadas proporcionada por los institutos nacionales de la salud y accesibles en <http://escr.nih.gov>. Además, puede seleccionarse una línea de células madre

embrionaria que también se describe en el presente documento del grupo que comprende: la línea WA09 obtenida del Dr. J. Thomson (Univ. de Wisconsin) y las líneas UC01 y UC06, ambas en el registro NIH actual.

- En ciertas realizaciones, una célula madre para uso en los métodos desvelados es una célula madre de origen neural o neuroendocrino, tal como una célula madre del sistema nervioso central (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.468.794; 6.040.180; 5.753.506; 5.766.948), el bulbo olfatorio o tejidos neurales periféricos (véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas 20030003574; 20020123143; 20020016002 y Gritti *et al.* 2002 J Neurosci 22(2):437-45), la médula espinal (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.361.996, 5.851.832) o un linaje neuroendocrino, tal como la glándula suprarrenal, glándula pituitaria o ciertas partes del intestino (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.171.610, y células PC12 como se describe en Kimura *et al.* 1994 J. Biol. Chem. 269: 18961-67). En realizaciones preferidas, se obtiene una célula madre neural de un tejido periférico o un tejido que cicatriza fácilmente, proporcionando de esta manera una población autóloga de células para el trasplante.
- En ciertos métodos desvelados pueden emplearse células madre hematopoyéticas o mesenquimáticas. Los estudios recientes sugieren que las células hematopoyéticas derivadas de médula ósea (HSC) y las células madre mesenquimáticas (MSC), que se aíslan fácilmente, tienen un potencial de diferenciación más amplio que el que se ha reconocido previamente. Las HSC purificadas no solo dan lugar a todas las células de la sangre, sino que también pueden desarrollarse en células normalmente procedentes del endodermo, como hepatocitos (Krause *et al.*, 2001, Cell 105: 369-77; Lagasse *et al.*, 2000 Nat Med 6: 1229-34). De forma similar, es de esperar que las HSC de sangre periférica y de sangre de cordón umbilical proporcionen un espectro útil de potencial de desarrollo. Las MSC parecen ser similarmente multipotentes, produciendo una descendencia que, por ejemplo, puede expresar marcadores de células neurales (Pittenger *et al.*, 1999 Science 284: 143-7; Zhao *et al.*, 2002 Exp Neurol 174: 11-20). Los ejemplos de células madre hematopoyéticas incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 4.714.680; 5.061.620; 5.437.994; 5.914.108; 5.925.567; 5.763.197; 5.750.397; 5.716.827; 5.643.741; 5.061.620. Los ejemplos de células madre mesenquimáticas incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.486.359; 5.827.735; 5.942.225; 5.972.703, los descritos en las publicaciones PCT n.º WO 00/53795; WO 00/02654; WO 98/20907, y los descritos en Pittenger *et al.* y Zhao *et al.*, *supra*.
- Las líneas de células madre preferentemente proceden de mamíferos, tales como roedores (por ejemplo, ratón o rata), primates (por ejemplo, monos, chimpancés o seres humanos), cerdos y rumiantes (por ejemplo, vacas, ovejas y cabras) y particularmente de seres humanos, donde la línea de células madre no procede de células madre embrionarias humanas. En ciertas realizaciones, las células madre proceden de una fuente autóloga o una fuente compatible con el tipo HLA. Por ejemplo, pueden obtenerse células madre de un sujeto que necesita células productoras de hormonas pancreáticas (por ejemplo, pacientes diabéticos que necesitan células productoras de insulina) y cultivarse para generar células productoras de insulina autólogas. Otras fuentes de células madre se obtienen fácilmente a partir de un sujeto, tales como células madre de tejido muscular, células madre de la piel (dermis o epidermis) y células madre de la grasa.
- En algunas realizaciones preferidas, las células para administración a un ser humano deben cumplir las directrices de las buenas prácticas con tejidos establecidas por la administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) o una agencia reguladora equivalente en otro país. Los métodos para desarrollar dicha línea celular pueden incluir pruebas en donantes, y medios para evitar la exposición a células y productos no humanos.
- Las células derivadas de un donante (opcionalmente el paciente es el donante) pueden administrarse como células fraccionadas o no fraccionadas, según lo dicte el objetivo de las células a administrar. Las células pueden fraccionarse para enriquecerse en ciertos tipos celulares antes de la administración. Los métodos de fraccionamiento son bien conocidos en la técnica y, generalmente, implican tanto selección positiva (es decir, retención de células basándose en una propiedad particular) como selección negativa (es decir, eliminación de células basándose en una propiedad particular). Como será evidente para un experto en la materia, las propiedades particulares (por ejemplo, marcadores de superficie) que se usan para la selección positiva y negativa dependerán de la población deseada de células. Los métodos usados para la selección/enriquecimiento de células pueden incluir tecnología de inmunoafinidad o método de centrifugación por densidad. La tecnología de inmunoafinidad puede adquirir una diversidad de formas, como es bien conocido en la técnica, pero generalmente utiliza un anticuerpo o derivado de anticuerpo en combinación con algún tipo de tecnología de segregación. La tecnología de segregación generalmente da como resultado la segregación física de células unidas por el anticuerpo y células no unidas por el anticuerpo, aunque en algunos casos la tecnología de segregación que destruye las células unidas por el anticuerpo puede usarse para una selección negativa.
- Para la selección/enriquecimiento de las células seleccionadas a usar puede utilizarse cualquier tecnología de inmunoafinidad adecuada, incluyendo clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), panning, separación inmunomagnética, cromatografía de inmunoafinidad, fijación del complemento mediada por anticuerpos, inmunotoxina, segregación en gradiente de densidad y similares. Después del procesamiento en el proceso de inmunoafinidad, las células deseadas (las células unidas por el reactivo de inmunoafinidad en el caso de selección positiva, y las células no unidas por el reactivo de inmunoafinidad en el caso de selección negativa) se recogen y se someten a rondas adicionales de selección de inmunoafinidad/enriquecimiento, o se reservan para la administración

al paciente.

La selección de inmunoafinidad/enriquecimiento típicamente se realiza incubando una preparación de células que comprende el tipo celular deseado con un anticuerpo o reactivo de afinidad derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo específico para un marcador de superficie dado), utilizando después el reactivo de afinidad unido para seleccionar para o contra las células a las que se une el anticuerpo. El proceso de selección generalmente implica una separación física, tal como la que puede conseguirse dirigiendo gotas que contienen células individuales al interior de diferentes recipientes dependiendo de la presencia o ausencia de los reactivos de afinidad unidos (FACS), utilizando un anticuerpo unido (directa o indirectamente) a un sustrato en fase sólida (panning, cromatografía de inmunoafinidad), o utilizando un campo magnético para recoger las células que se unen a gotas magnéticas a través del reactivo de afinidad (separación inmunomagnética). Como alternativa, las células indeseables pueden eliminarse de la preparación usando un reactivo de afinidad que dirige un ataque citotóxico a las células unidas por el reactivo de afinidad. El ataque citotóxico puede activarse por el reactivo de afinidad (por ejemplo, fijación del complemento) o puede localizarse en las células diana por el reactivo de afinidad (por ejemplo, inmunotoxina, tal como cadena B de ricina).

Aunque es de esperar que los métodos desvelados en el presente documento se usen frecuentemente para la supervisión de células *in vivo*, debe indicarse que las metodologías son igualmente eficaces para la supervisión de células en cultivo, en una muestra de tejido u otro material celular *ex vivo*. Para los usos terapéuticos, las células pueden marcarse en una etapa deseada durante la preparación para la administración al paciente.

Pueden usarse una diversidad de métodos para marcar las células con un reactivo de formación de imágenes. En general, las células se pondrán en contacto con el reactivo de formación de imágenes de tal forma que el reactivo de formación de imágenes se asocie con la célula. Las condiciones con frecuencia serán condiciones de cultivo celular convencionales diseñadas para mantener la viabilidad celular. El término "asociado" pretende incluir cualquier manera por la que el reactivo de formación de imágenes y la célula se mantengan en una proximidad física suficiente durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el reactivo de formación de imágenes proporcione información útil sobre la posición de la célula, ya sea *in vivo* o *in vitro*. El reactivo de formación de imágenes puede localizarse intracelularmente, por ejemplo, después de fagocitosis o de la entrada mediada por un tensioactivo en la célula. Las células inmunitarias, tales como células dendríticas, macrófagos y células T con frecuencia son altamente fagocíticas y los datos presentados en el presente documento y en otros estudios demuestran que dichas células, y otros tipos de células fagocíticas, se marcan fácilmente. También pueden marcarse otros tipos celulares, tales como células madre, independientemente de la actividad fagocítica. El reactivo de formación de imágenes puede insertarse en una membrana celular o unirse de forma covalente o no covalente con un componente extracelular de la célula. Por ejemplo, ciertos fluorocarburos lineales descritos en el presente documento pueden derivatizarse para unirse a uno o más restos de dirección. Un resto de dirección se seleccionará para facilitar la asociación de tejido de formación de imágenes con la célula a marcar. Un resto de dirección puede diseñarse para causar la inserción no específica del fluorocarburo en una membrana celular (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos hidrófoba u otro resto hidrófobo tal como un resto de palmitoílo o un resto de miristoílo) o para facilitar la entrada no específica en la célula. Un resto de dirección puede unirse a un componente de la superficie celular, como ocurre en el caso de ligandos receptores. Un resto de dirección puede ser un miembro de un par de unión específico, donde el compañero de unión es un componente de la superficie celular. El resto de dirección puede ser, por ejemplo, un ligando para un receptor, o un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal o cualquiera de los diversos agentes de unión polipeptídicos que comprenden una parte variable de una inmunoglobulina (por ejemplo, fragmento Fv, fragmento Fv monocaténario (scFv), fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, anticuerpo de un solo dominio, anticuerpo camelizado, anticuerpo humanizado, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos). En ciertas realizaciones, el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo comprende perfluoro-15-corona éter.

El marcaje celular con emulsiones de fluorocarburos también puede facilitarse usando agentes de transfección para ayudar a la liberación celular. Con frecuencia, los agentes de transfección consisten en lípidos catiónicos, liposomas catiónicos, policationes y similares. El agente de transfección se premezcla con el agente de marcaje de emulsión de fluorocarburo, con lo que se asocia con, o recubre, las gotas de emulsión. Las gotas de emulsión tratadas con agente de transfección después se añaden a las células cultivadas y se incuban de forma que las células se marcan. Los agentes de transfección comunes incluyen Lipofectamine (Invitrogen, Inc) FuGene, DOTAP (Roche Diagnostics, Inc.) y poli-L-lisina. También pueden usarse proteínas pequeñas como agentes de transfección, tales como muchos tipos de protaminas. Las protaminas, las proteínas de unión al ADN principales en el núcleo del esperma en la mayoría de los vertebrados, empaquetan el ADN en un volumen menor del 5 % de un núcleo de célula somática. Las protaminas son proteínas sencillas de bajo peso molecular que son ricas en arginina y fuertemente básicas. Las protaminas disponibles en el mercado proceden del esperma de salmón y ciertas especies distintas de peces. El término "protamina", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido rico en arginina, catiónico y de bajo peso molecular. La molécula de protamina típicamente comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 aminoácidos y generalmente se caracteriza por contener al menos un 20 %, 50 % o 70 % de arginina.

Las protaminas con frecuencia se formulan como sales, con uno o más contraiones tales como sulfato, fosfato y

cloruro.

Los datos proporcionados en esta solicitud muestran que las protaminas (por ejemplo, el sulfato de protamina) son muy eficaces en la liberación de gotas de emulsión de fluorocarburo PFPE en células cultivadas. Los sulfatos de protamina adecuados pueden proceder de una diversidad de fuentes (por ejemplo, salmón, arenque, trucha, etc.) y ser de diversas calidades y formas (por ejemplo, USP, calidades II, III, X, etc.), con y sin histonas o cualquier derivado recombinante. Los ejemplos de otras soluciones de protamina que pueden usarse como agentes de transfección incluyen fosfato de protamina, cloruro de protamina, sulfato-2 de protamina, sulfato-3 de protamina, sulfato-10 de protamina y base libre de protamina.

Los datos proporcionados en esta solicitud muestran nanoemulsiones autoliberables preparadas con reactivos de formación de imágenes de fluorocarburo (por ejemplo, perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE) e incorporan un tensioactivo Pluronic™, opcionalmente con sulfato de protamina, o Cremophor® EL con un emulsionante y un aditivo. La simple co-incubación de las células con ciertas nanoemulsiones autoliberables proporciona un marcaje celular suficiente para la formación de imágenes, sin necesidad de reactivos de transfección.

Cuando las células se van a usar en un régimen terapéutico, se han usado diversos métodos para liberar las células, incluyendo inyecciones y el uso de dispositivos especiales para implantar células en diversos órganos. La presente invención no se restringe a ningún método de liberación particular. Las células marcadas pueden supervisarse independientemente de si las células se liberan directamente en un sitio particular o se liberan sistémicamente. Por ejemplo, se obtuvieron imágenes de forma satisfactoria de CD marcadas después de una implantación focal directamente en tejidos o una inyección intravenosa, y se obtuvieron imágenes de las células T después de la inyección intraperitoneal. Las células pueden insertarse en un dispositivo de liberación que facilita la introducción por inyección o implantación en los sujetos. Dichos dispositivos de liberación pueden incluir tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar las células y fluidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En una realización preferida, los tubos además tienen una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la cual las células de la divulgación pueden introducirse en el sujeto en una localización deseada. Las células pueden prepararse para la liberación en una diversidad de formas diferentes. Por ejemplo, las células pueden suspenderse en una solución o gel o incluirse en una matriz de soporte cuando están contenidas en dicho dispositivo de liberación. Las células pueden mezclarse con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células de la divulgación siguen siendo viables. Los vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampón acuoso, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de dichos vehículos y diluyentes es bien conocido en la técnica. La solución es preferentemente estéril y fluida. Preferentemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y está conservada frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Las soluciones de la divulgación pueden prepararse incorporando células como se describe en el presente documento en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, cuando se requiera, otros ingredientes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtración.

4. Técnicas de resonancia magnética nuclear

Como se describe en el presente documento, pueden usarse técnicas de resonancia magnética nuclear para detectar poblaciones de células marcadas. El término “detectar” se usa para incluir cualquier esfuerzo para determinar la presencia o ausencia de una molécula o célula marcada, particularmente por una técnica de resonancia magnética nuclear. El término “detectar” también pretende incluir mediciones más sofisticadas, incluyendo mediciones cuantitativas y la generación de imágenes bi- o tridimensionales. Por ejemplo, puede usarse IRM para generar imágenes de dichas células. En muchos casos, las células marcadas pueden administrarse a un sujeto vivo. Después de la administración de las células, puede examinarse alguna parte del sujeto, o el sujeto entero, por IRM para generar un conjunto de datos de IRM. En otros casos, la emulsión se inyecta directamente por vía iv y, posteriormente, se toman imágenes del sujeto en uno o más puntos de tiempo. Se pretende que una “serie de datos”, según se usa el término en el presente documento, incluya datos de partida reunidos durante el sondeo de resonancia magnética del material objeto, los parámetros de adquisición, así como la información procesada, transformada o extraída de los datos de partida. Los datos de partida incluyen señales transitorias obtenidas por IRM/SRM, incluyendo la caída libre de la inducción, los ecos de espín, los ecos estimulados y/o ecos de gradiente. Los ejemplos de información procesada incluyen representaciones gráficas bidimensionales o tridimensionales del material objeto. La información procesada también puede incluir imágenes de magnitud, los componentes de imágenes reales e imaginarias, así como las imágenes de mapa de fases asociadas. Otro ejemplo de información extraída es una puntuación que representa la cantidad o concentración de reactivo de formación de imágenes o señal de ^{19}F en el material objeto. Mediante el uso de la cantidad de señal de ^{19}F en el material objeto, y una calibración de la cantidad media de reactivo de formación de imágenes por célula antes de la implantación (en el caso del marcaje *ex vivo*), se puede estimar el número absoluto de células en el material objeto. La cantidad de señal de ^{19}F presente en un material objeto puede representarse o calcularse de muchas formas; por ejemplo, puede medirse la relación media entre señal y ruido (SNR) de la señal de ^{19}F para una región de interés (ROI) y usarse para calcular la abundancia de células marcadas. En ciertas realizaciones, la intensidad media, o sumatorio en forma de píxel o vóxel de la señal de ^{19}F puede usarse para calcular la abundancia de células marcadas. Este tipo de datos puede reunirse en una sola región del sujeto tal como, por ejemplo, el bazo u otro órgano de importancia

particular para las células marcadas. Las células marcadas pueden examinarse en contextos distintos que en el sujeto. Puede ser deseable examinar las células marcadas en cultivo. En ciertas realizaciones, las células marcadas pueden aplicarse o generarse dentro de una muestra de tejido o cultivo tisular y, por lo tanto, pueden obtenerse imágenes de las células marcadas también en esos contextos. Por ejemplo, un órgano, tejido u otro material celular a trasplantar puede ponerse en contacto con un reactivo de formación de imágenes para generar células marcadas antes de la implantación de dicho trasplante en un sujeto.

En general, los agentes de marcaje de la divulgación se diseñan para uso en sistemas de detección IRM convencionales. En la realización más común de IRM, se observa el núcleo de hidrógeno (protón, ^1H) en moléculas de agua móvil contenidas en materiales objeto. Para detectar los marcadores desvelados en el presente documento, se detecta un núcleo alternativo, ^{19}F . La IRM de ^{19}F tiene una sensibilidad intrínseca solo ligeramente menor en comparación con ^1H ; la sensibilidad relativa es de aproximadamente 0,83. Ambos tienen un espín nuclear de $+1/2$. La abundancia isotópica natural de ^{19}F es de un 100 %, que es comparable a un 99,985 % en el caso de ^1H . Los principios físicos detrás de la detección y formación de imágenes son los mismos para la IRM tanto de ^1H como de ^{19}F . El material objeto se pone en un campo magnético estático grande. El campo tiende a alinear el momento magnético asociado con los núcleos de ^1H o ^{19}F a lo largo de la dirección del campo. Los núcleos se alteran del equilibrio por radiación de radiofrecuencia (RF) pulsátil a la frecuencia de Larmor, que es una frecuencia característica proporcional a la fuerza del campo magnético en el que los núcleos absorben energía de forma resonante. Después de retirar la RF, los núcleos inducen un voltaje transitorio en una antena receptora; este voltaje transitorio constituye la señal de resonancia magnética nuclear (RMN). Tanto en la frecuencia como en la fase de la señal de RMN está codificada información espacial mediante la aplicación selectiva de gradientes de campo magnético que se superponen sobre el campo estático grande. Los voltajes transitorios generalmente se digitalizan, y después estas señales pueden procesarse, por ejemplo, usando un ordenador para producir imágenes.

A una fuerza de campo magnético constante, la frecuencia de Larmor de ^{19}F es solo ligeramente menor (~6 %) en comparación con ^1H . De esta manera, es sencillo adaptar exploraciones convencionales de IRM, tanto en hardware como en software, para adquirir datos de ^{19}F . La detección de ^{19}F puede acoplarse con diferentes tipos de exploraciones de resonancia magnética, tales como IRM, SRM u otras técnicas. Típicamente, será deseable obtener una imagen de IRM de ^1H para comparar con la imagen de ^{19}F . En un organismo vivo u otro tejido biológico, la IRM de protón proporcionará una imagen del material objeto y permitirá definir el contexto anatómico de las células marcadas detectadas en la imagen de ^{19}F . En una realización preferida de la divulgación, se recogen datos tanto para ^{19}F como para ^1H durante la misma sesión; el objeto no se mueve durante estas adquisiciones para asegurar mejor que las dos series de datos están en registro espacial. Normalmente, se adquieren series de datos de ^{19}F y ^1H secuencialmente, en cualquier orden. Puede construirse una bobina de RF (es decir, antena) que pueda sintonizarse eléctricamente a partir de la frecuencia de Larmor de ^{19}F y ^1H . La sintonización entre estas dos frecuencias puede realizarse manualmente (por ejemplo, a través de un inductor o capacitor variable electromecánico), o eléctricamente, a través de una circuitería electrónica activa. Como alternativa, con las modificaciones apropiadas en el hardware y/o software del instrumento de IRM, las dos series de datos pueden adquirirse simultáneamente, por ejemplo, para conservar el tiempo de formación de imágenes. La adquisición simultánea de las series de datos de ^{19}F y ^1H requiere una bobina de RF o antena que pueda sintonizarse eléctricamente de forma simultánea a la frecuencia de Larmor de ^{19}F y ^1H (es decir, una bobina sintonizada doble). Como alternativa, la bobina de RF puede ser de "banda amplia", con una resonancia eléctrica sintonizada ampliamente que cubre las dos frecuencias de Larmor (es decir, ^{19}F y ^1H). Otras técnicas de formación de imágenes, tales como detección de fluorescencia, pueden acoplarse con IRM de ^{19}F . Esto será particularmente deseable cuando un reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se ha modificado con un resto fluorescente. En otras realizaciones, la exploración de MRI de ^{19}F puede combinarse con una exploración PET en el mismo sujeto o paciente mediante el uso de reactivos de marcaje de fluorocarburo $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ radiactivos en modelo dual como se describe en el presente documento.

El examen de IRM puede realizarse de acuerdo con cualquier metodología adecuada conocida en la técnica. Durante los años se han desarrollado muchos tipos diferentes de secuencias de pulsos de IRM, o el conjunto de instrucciones usadas por el aparato de IRM para organizar la recogida de datos, y técnicas de procesamiento de señales (por ejemplo, transformada de Fourier y reconstrucción de proyección), para recoger y procesar los datos de las imágenes (por ejemplo, véase *Magnetic Resonance Imaging, Tercera Edición*, editores D. D. Stark y W. G. Bradley, Mosby, Inc., St. Louis MO 1999). Los reactivos y métodos de esta divulgación no se restringen a ningún método de procesamiento o secuencia de pulsos de imágenes particular de las señales de RMN de partida. Por ejemplo, los métodos de IRM que pueden aplicarse a esta divulgación incluyen en sentido amplio eco de espín, eco simulado, eco de gradiente, imágenes basadas en caída libre de la inducción y cualquier combinación de las mismas. Las técnicas de obtención de imágenes rápidas, en las que se adquiere más de una línea en el espacio k o segmentos grandes de espacio k a partir de cada señal excitada, también son muy adecuadas para adquirir los datos de ^{19}F (o de ^1H). Los ejemplos de técnicas de formación de imágenes rápidas incluyen enfoques de eco de espín rápidos (por ejemplo, FSE, turbo SE, TSE, RARE o HASTE), formación de imágenes ecoplanares (EPI), técnicas de eco de gradiente y eco de espín combinadas (por ejemplo, GRASE), imágenes en espiral e imágenes en ráfaga. El desarrollo de secuencias de pulsos y métodos de procesamiento de señales nuevos y mejorados es un campo que evoluciona continuamente, y las personas expertas en la materia pueden encontrar múltiples formas para obtener imágenes de las células marcadas con ^{19}F en su contexto anatómico.

Como otro ejemplo de técnica de resonancia magnética nuclear, la SRM puede usarse para detectar la presencia de células marcadas con fluorocarburo en tejidos u órganos localizados. Normalmente, los métodos de SRM se realizan en un escáner de IRM convencional. Con frecuencia, el volumen de interés (VOI) localizado se define dentro de una exploración de IRM de ^1H anatómica convencional. Posteriormente, la magnitud de la señal de RMN de ^{19}F observada dentro del VOI se relaciona directamente con el número de células marcadas, y/o la concentración media de PFPE por célula presente en el tejido u órgano. Los métodos para aislar un VOI dentro de un sujeto más grande son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, *Magnetic Resonance Imaging, Tercera Edición*, Capítulo 9, Editores D. D. Stark y W. G. Bradley, Mosby, Inc., St. Louis MO 1999). Los ejemplos incluyen el uso de una bobina de superficie de RF localizada cerca del VOI, spoiling de superficie, métodos de gradiente B_1 de bobina de superficie, técnicas de gradiente B_0 con selección de rodajas, STEAM, PRESS, espectroscopia *in vivo* guiada por la imagen (ISIS) y formación de imágenes por espectroscopia de resonancia magnética (MRSI). El desarrollo de secuencias de pulsos y métodos de procesamiento de señales nuevos y mejorados está evolucionando continuamente para la SRM, y los expertos en la materia pueden encontrar múltiples formas para detectar las señales de RMN de ^{19}F que proceden de las células marcadas con fluorocarburo en VOI.

En ciertos casos, el material objeto es un espécimen de tejido fijado o conservado de otra manera que se ha obtenido por biopsia o necropsia a partir del animal o ser humano. El material objeto después se somete a RMN de ^{19}F en estado líquido, uni- o multidimensional, de alta resolución, convencional para determinar la cantidad de flúor presente en la muestra. El contenido de flúor se relaciona directamente con el número de células marcadas en el espécimen de material objeto. En el caso del marcaje *in situ* de fagocitos residentes (por ejemplo, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células del hígado) con la emulsión de flúor como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, usando nanoemulsión 3), la cantidad de ^{19}F medida en la muestra es directamente proporcional al número de estos fagocitos presentes en el tejido. De esta manera se puede ensayar la cantidad relativa de inflamación en los tejidos intactos sin tener que usar histología o cualquier otra técnica destructiva y engorrosa. En ciertas realizaciones, para analizar el contenido de ^{19}F del tejido, se usa RMN de ^{19}F de una dimensión. En ciertas realizaciones, se añadirá un compuesto de referencia de ^{19}F a la muestra de un número conocido de espines de ^{19}F que tiene un desplazamiento químico que es diferente del de la composición de la emulsión de marcaje de células (véase más adelante). En ciertas realizaciones, las áreas relativas integradas bajo el pico de emulsión y el pico de referencia pueden usarse para calcular el número absoluto de átomos de flúor presentes en la muestra de tejido. En ciertas realizaciones, el peso de la muestra de tejido también se puede incorporar en este cálculo para extraer la densidad media de flúor de la muestra de tejido, y este parámetro puede considerarse un índice cuantitativo de inflamación o "índice de inflamación".

En el presente documento también se describe un método para cuantificar los números de células marcadas *in vivo* o en materiales del sujeto dentro de un ROI. Un ROI puede incluir todas las células marcadas en un sujeto o células marcadas en órganos específicos tales como el páncreas, tejidos específicos tales como ganglios linfáticos o cualquier región de uno o más vóxeles que muestran una señal IRM/SRM de ^{19}F detectable. Un ROI puede ser un área no definida de otra manera más allá de un experimento particular. Hay varias formas en que las células marcadas pueden cuantificarse en los materiales objeto o *in vivo*, como se describe en el presente documento.

En el caso del marcaje *ex vivo*, la calibración de la "dosis celular" media del agente de marcaje de ^{19}F antes de la implantación de una población celular particular con frecuencia es un prerrequisito para determinaciones celulares cuantitativas en materiales objeto o en el paciente. Es de esperar que diferentes tipos celulares tengan diferentes capacidades innatas de captar los agentes de marcaje *in vitro* y, por lo tanto, también variará la dosis celular del agente de marcaje. Además, diferentes células del mismo tipo adquiridas de diferentes fuentes (por ejemplo, diferentes pacientes) pueden tener diferentes afinidades por el agente de marcaje. De esta manera, puede requerirse una calibración de la dosis celular. Esta calibración puede usarse, inicialmente, para modificar el protocolo de marcaje (es decir, las condiciones de incubación, la duración del tiempo durante el que las células se incuban con emulsión de fluorocarburo de marcaje, concentración de emulsión de fluorocarburo en medio de cultivo durante el marcaje, etc.) para conseguir un cierto intervalo de dosis celulares antes de que las células marcadas se usen realmente en un sujeto del que se van a obtener imágenes. Como alternativa, se pueden fijar las condiciones y el protocolo de marcaje y medir el valor medio de ^{19}F marcado por célula, tal cual, para la posterior cuantificación en el sujeto del que se desean obtener imágenes. En ciertas realizaciones, el número medio de moléculas de ^{19}F (F) por célula de una población de células marcadas se mide (es decir, se calibra) *in vitro* antes de la administración de las células al sujeto o paciente. En ciertas realizaciones, el número medio de moléculas de ^{19}F (F) por célula de una población de células marcadas se calibra en una población de ensayo de células de un tipo particular, no necesariamente destinada a un paciente, sino que se usa para calibrar la dosis celular del agente de marcaje como consecuencia de un protocolo de marcaje o conjunto de condiciones particular; opcionalmente, el valor de la dosis celular después se usa para el marcaje futuro y experimentos de obtención de imágenes *in vivo* en el mismo tipo de población de células con el mismo protocolo de marcaje.

La dosis celular de agente de marcaje puede ensayarse *in vitro* usando una diversidad de técnicas cuantitativas. Por ejemplo, se puede usar un espectro de RMN de ^{19}F unidimensional (1D) obtenido a partir de un sedimento celular, suspensión celular o lisado celular, de un número conocido de células marcadas. A partir de este espectro, se puede calcular el área integrada del espectro de ^{19}F o una parte del mismo, procedente del reactivo de marcaje asociado con las células. El área integrada del espectro de ^{19}F , denominado $S_{\text{células}}$ es directamente proporcional a la cantidad

total de ^{19}F en el sedimento, suspensión o lisado celular. Para medir el número absoluto de núcleos de ^{19}F , las $S_{\text{células}}$ medidas pueden normalizarse a un patrón de ^{19}F . Un patrón de ^{19}F puede ser, por ejemplo, una solución de un volumen y concentración conocidos de un agente fluoroquímico, donde se puede calcular el número total de núcleos de ^{19}F en el patrón, denominado $F_{\text{patrón}}$. Una referencia adecuada del agente fluoroquímico idealmente tiene un espectro sencillo de RMN de ^{19}F , preferentemente con una sola resonancia estrecha (por ejemplo, ácido trifluoroacético o TFA) y, opcionalmente, un desplazamiento químico de ^{19}F que es significativamente diferente del correspondiente al fluorocarburo de marcaje. El patrón de ^{19}F puede ponerse en el mismo tubo de RMN que el material de célula marcada a medir, en un tubo separado u, opcionalmente, puede medirse en otro experimento usando el mismo instrumento de RMN. Entonces puede medirse el área integrada del espectro procedente del patrón de ^{19}F , denominado $S_{\text{patrón}}$. Posteriormente, puede calcularse el número medio de ^{19}F por célula marcada, denominado F_c , por ejemplo, usando la fórmula:

$$F_c = \frac{S_{\text{células}}}{S_{\text{patrón}}} F_{\text{patrón}} \frac{1}{N_{\text{células}}}$$

donde $N_{\text{células}}$ es el número de células marcadas contenidas en la muestra de ensayo *in vitro*. En la técnica son bien conocidos métodos de RMN cuantitativos para ^{19}F y otros núcleos, y los expertos pueden encontrar muchas variaciones del procedimiento de calibración de dosis celular descrito anteriormente. Además de RMN de ^{19}F , hay otros métodos cuantitativos que pueden usarse para ensayar la dosis celular del reactivo de marcaje. Por ejemplo, un reactivo puede marcarse con fluorescencia, luminiscencia, ópticamente o radiactivamente (véase la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 1 2007-0258886).

De forma similar, en el caso del marcaje celular *in situ* de fagocitos circulantes después de la inyección iv de una emulsión, para medir el marcaje celular eficaz, se puede extraer una parte de sangre periférica del sujeto y medir la carga celular eficaz de leucocitos usando los métodos descritos anteriormente. Además, puede usarse una o más de las diversas técnicas de enriquecimiento o clasificación de células para clasificar células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos) antes de la medición de la carga (anteriormente) para definir mejor qué población celular se ha marcado *in situ*. Después puede usarse el parámetro de marcaje celular medido para calcular el número aparente de células inflamatorias presentes en el tejido usando los métodos de resonancia magnética descritos en el presente documento.

Para extraer la cuantificación precisa de células marcadas y/o la puntuación de inflamación relativa de los conjuntos de datos de IRM/SRM de ^{19}F , pueden emplearse calibraciones y patrones adicionales. Por ejemplo, se puede usar una referencia de ^{19}F externa calibrada (es decir, fantoma) durante la exploración real de IRM/SRM de ^{19}F del material objeto que contiene las células marcadas. Se usa la intensidad de imagen del fantoma calibrado, por ejemplo, cuando se analizan los conjuntos de datos de IRM/SRM de ^{19}F para demostrar un patrón absoluto para el número de núcleos de ^{19}F cuando se examina el material objeto o el paciente. El fantoma calibrado se usa para normalizar la sensibilidad del sistema de IRM/SRM particular que se ha cargado con un sujeto particular del que se desean obtener imágenes. La referencia de ^{19}F puede ser, por ejemplo, uno o más vasos que contienen una solución de una concentración conocida de núcleos de ^{19}F . En realizaciones preferidas, la solución contiene una concentración diluida del reactivo de marcaje de fluorocarburo emulsionado. Opcionalmente, la solución contiene reactivo de marcaje de fluorocarburo no emulsionado, un gel o líquido, por ejemplo, que se ha diluido en un disolvente adecuado. Opcionalmente, la solución puede estar compuesta por otro agente fluoroquímico, idealmente con un espectro de RMN de ^{19}F sencillo, preferentemente con una sola resonancia de RMN estrecha (por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA) o trifluoroacetamida (TFM) y otros ácidos fluorados, trifluorotolueno o trifluoroetanol). En realizaciones preferidas, los valores de T1 y T2 de la solución de referencia son similares a los del reactivo de marcaje. Opcionalmente, la solución puede contener células marcadas con perfluorocarburo, o lisados de las mismas. La referencia no celular tiene la ventaja de mayores tiempos de almacenamiento. Opcionalmente, la solución puede tomar la forma de un gel. El recipiente que contiene la solución preferentemente se puede sellar y puede tomar una diversidad de geometrías; las geometrías de recipientes preferidas incluyen elipsoidal, cilíndrica, esférica y formas de tubos paralelos. Pueden usarse uno o más recipientes que contienen solución de referencia de ^{19}F durante la IRM/SRM de ^{19}F de la materia objeto. Si se usan múltiples referencias de ^{19}F (es decir, recipientes), pueden contener la misma concentración de ^{19}F o diferentes concentraciones y, en el caso de esto último, idealmente contienen concentraciones graduadas del agente fluoroquímico. La colocación del o de los recipientes de referencia de ^{19}F calibrados puede ser preferentemente externa o al lado de u, opcionalmente, dentro del sujeto o paciente del que se desean obtener imágenes, antes de la adquisición de los datos. En realizaciones preferidas, se obtienen imágenes de la referencia usando IRM de ^{19}F a lo largo del sujeto en el mismo campo de visión (FOV) de la imagen. Opcionalmente, se adquieren los datos de SRM de ^{19}F en la referencia de forma secuencial o en paralelo con el conjunto de datos del sujeto. Opcionalmente, pueden adquirirse datos de la referencia usando IRM/SRM adquiridas en una exploración separada. Opcionalmente, la referencia externa no se explora junto con un sujeto en cada examen de IRM/SRM de ^{19}F , sino que más bien, se usan valores de la intensidad de la señal de ^{19}F de referencia adquirida usando IRM/SRM a partir de una exploración de un objeto comparable o un objeto simulado. En una exploración dada de IRM/SRM de ^{19}F , pueden extraerse muestras del patrón de ^{19}F calibrado por uno o más vóxeles. La intensidad de ^{19}F observable producida por un vóxel puede ser proporcional a la concentración del agente fluoroquímico en la solución (o gel) y el volumen del vóxel. Con frecuencia, en una exploración de IRM de

^{19}F , el patrón de referencia comprende muchos vóxeles. Con frecuencia, se calcula la intensidad media de uno, varios o todos los vóxeles en el patrón de referencia. Opcionalmente, la intensidad media de la imagen se calcula sobre una ROI definida dentro de la imagen de ^{19}F del patrón de referencia. Opcionalmente, la geometría física del recipiente de patrón de referencia contribuye a definir la intensidad de la señal de ^{19}F observada; por ejemplo, el o los compartimientos de volumen que contiene la solución de referencia de ^{19}F es más pequeño que el volumen del vóxel. En otras realizaciones, la referencia externa calibrada se basa en una solución con una intensidad de señal de ^1H de un miembro conocido de ^1H detectable; en este caso, la sensibilidad de la señal de ^{19}F en el material objeto es una referencia a un patrón calibrado de ^1H . Idealmente, la solución o gel en la referencia calibrada de ^1H (contenida en un recipiente como se ha descrito anteriormente) produce un espectro de RMN de ^1H sencillo, preferentemente con una sola resonancia RMN estrecha (por ejemplo, H_2O o mezclas de $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$). A diferencia de lo que ocurriría con un núcleo diferente, el uso de la referencia del patrón de ^1H es igual en muchos otros aspectos a lo que se ha descrito anteriormente para la referencia de ^{19}F . Opcionalmente, el patrón de referencia calibrado contiene cualquier otro núcleo activo de IRM/SRM. En algunas realizaciones, la referencia es un órgano o tejido interno detectado a través de IRM/SRM ^1H , donde los datos pueden ser de partida o estar normalizados. En otras realizaciones, la referencia es un patrón que no se explora con el sujeto, sino que se calibra por factores relevantes tales como el peso del paciente o el tamaño de la cavidad corporal.

Mediante la combinación o manipulación por ordenador de dos o más parámetros clave a partir del conjunto de datos de IRM/SRM de ^{19}F , se puede calcular el número de células marcadas y/o la cantidad relativa de inflamación presente en un ROI como se ha descrito en el presente documento. Por ejemplo, un conjunto clave de parámetros puede incluir: (i) la dosis celular de agente de marcaje (es decir F_c) medida *in vitro*; (ii) el conjunto de datos de IRM/SRM de ^{19}F *in vivo* tomados en el sujeto en uno o más puntos de tiempo después de la administración de células marcadas; (iii) el volumen del vóxel; (iv) el área de vóxel en plano (es decir, el área del píxel de imagen); (v) opcionalmente, el conjunto de datos de IRM/SRM a partir del patrón de referencia de ^{19}F ; (vi) opcionalmente, el ruido de Johnson medido de los datos de IRM/SRM de ^{19}F en el material objeto; (vii) opcionalmente, la relación entre señal y ruido (SNR) medida de uno o más vóxeles del conjunto de datos de IRM/SRM de ^{19}F en el material objeto; (viii) opcionalmente, la SNR medida de uno o más vóxeles del conjunto de datos de IRM/SRM de ^{19}F del patrón de referencia; (ix) opcionalmente, los tiempos de relajación de RMN de ^{19}F (T_1 , T_2 y T_2^*) del material objeto; (x), opcionalmente los tiempos de relajación de RMN de ^{19}F (T_1 , T_2 y T_2^*) del patrón de referencia (por ejemplo, véase *Magnetic Resonance Imaging, Tercera Edición*, capítulo 4, editores D. D. Stark y W. G. Bradley, Mosby, Inc., St. Louis MO 1999). Los expertos en la materia pueden obtener otros parámetros, combinaciones de los conjuntos anteriores o derivaciones de los mismos, particularmente a partir del conjunto de datos de IRM/SRM ^{19}F , que pueden usarse para cuantificar el número de células marcadas *in situ*. En ciertas realizaciones, el conjunto anterior de parámetros clave puede usarse para obtener medidas cuantitativas o estadísticas de la exactitud o confianza del número medido de células marcadas.

Hay muchas formas de combinar los parámetros clave (i-x, anteriores), cualquier subserie de estos o cualquiera de sus combinaciones o aproximaciones, para estimar el número eficaz de células marcadas vistas por IRM de ^{19}F en el material objeto, denominado N_c . Por ejemplo, se puede usar una ecuación de la forma

$$N_c = \frac{[F_R]v}{I_R} \frac{1}{F_c} \sum_{i=1}^{N_{ROI}} I_c^{(i)}$$

en la que: N_c = número total de células marcadas en el ROI; $[F_R]$ = concentración de ^{19}F en la solución (o gel) de referencia de ^{19}F calibrada; v = volumen de vóxel; I_R = intensidad media de la referencia de ^{19}F calibrada tomada con la exploración de IRM/SRM, promediada sobre uno o más vóxel; F_c = dosis celular media de ^{19}F del agente marcador medida *in vitro*; N_{ROI} = número de vóxeles en la ROI que contiene células marcadas; $I_c^{(i)}$ = intensidad de imagen del i^o vóxel en la ROI que contiene las células marcadas; i = índice sin unidad para vóxeles en la ROI que contiene células marcadas.

También hay muchas formas de conseguir una aproximación de N_c a partir del conjunto de datos de ^{19}F . Por ejemplo, se podría usar la expresión

$$N_c \approx \frac{I_c^{avg}}{I_R} [F_R]v \frac{1}{F_c} N_{ROI}$$

en la que I_c^{avg} es la intensidad media de la ROI que contiene las células marcadas (es decir, la intensidad media de los vóxeles de N_{ROI}). Como otro ejemplo, se podría usar

$$N_c \approx \frac{I_c^{avg}}{I_R} V_c \frac{1}{F_c} [F_R]$$

en la que V_c es el volumen total de la ROI que contiene las células marcadas. Como ejemplo adicional, se podría usar

$$N_c \approx \frac{I_c^{avg}}{I_R} \frac{V_c}{V_R} \frac{1}{F_c} N_R$$

en la que V_R es el volumen eficaz de la referencia en la IRM/SRM ^{19}F y N_R es el número de núcleos de ^{19}F en V_R . Obsérvese que, en todas las fórmulas anteriores, las diversas intensidades (es decir, I_R , I_c^{avg} , $I_c^{(i)}$) pueden normalizarse con respecto al ruido de la imagen y, de esta manera, las fórmulas anteriores pueden expresarse de forma equivalente en términos de los valores de SNR apropiados para las regiones particulares. Por lo tanto, hay muchas formas de estimar el número de células marcadas, N_c , y muchas formas similares de estas expresiones básicas pueden obtenerse por manipulaciones matemáticas básicas, sin embargo, todas se basan en el mismo contenido básico contenido dentro de los parámetros de entrada descritos por (i-x). Además, no es necesario expresar la cuantificación de las células marcadas en una ROI en términos de números absolutos o números de células eficaces. Pueden obtenerse otros índices cuantitativos que sean indicativos de la cantidad de células en una ROI. Por ejemplo, se puede calcular la relación I_c^{avg}/I_R , o la relación de valores de SNR medios observados en la ROI y la referencia; todos estos caen dentro de subconjuntos de los parámetros y/o las expresiones anteriores.

Debe indicarse que el análisis anterior del número de células e índices relacionados supone que los tiempos de relajación de RMN de ^{19}F (es decir, particularmente T1 y/o T2) del marcador de fluorocarburo es aproximadamente igual que el material en el patrón de referencia de ^{19}F calibrado. En caso de que los tiempos de relajación no sean comparables, un experto en la materia puede corregir fácilmente esto empleando las ecuaciones de intensidad de IRM conocidas del protocolo particular de formación de imágenes que se use, expresado en términos de T1 y T2.

Opcionalmente, el conjunto de datos de IRM de ^{19}F del material objeto puede someterse a un procesamiento posterior antes de realizar el cálculo real de cuantificación celular (como se ha descrito anteriormente). Por ejemplo, los algoritmos de procesamiento posterior pueden incluir la "eliminación del ruido" del conjunto de datos de ^{19}F . Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la umbralización de la imagen para quitar el ruido de baja intensidad; esto implica el reajuste de la intensidad de la imagen de forma que los valores bajos se fijen a cero. En imágenes de IRM de magnitud, con frecuencia aparece ruido de Johnson aleatorio y se distribuye uniformemente a través del FOV de la imagen. Es bien conocido en la técnica que se puede fijar un umbral de la intensidad de imagen de bajo nivel de forma que las regiones que se sabe que no contienen una señal verdadera (es decir, carecen de núcleos de ^{19}F y/o ^1H) parecen tener una intensidad nula o casi nula. Este proceso puede realizarse de una forma ad hoc (es decir, "manualmente" o por inspección visual) o mediante el uso de un algoritmo informático. En otras realizaciones, la eliminación del ruido del conjunto de datos puede conseguirse usando otros algoritmos, por ejemplo, usando análisis wavelet, y en la técnica se conocen muchos métodos para la eliminación del ruido de las imágenes: Khare, A., *et al.*, INTERNATIONAL JOURNAL OF WAVELETS MULTIREOLUTION AND INFORMATION PROCESSING, 3 (4): 477-496 DEC 2005; Cruz-Enriquez, H., *et al.*, IMAGE ANALYSIS AND RECOGNITION, 3656: 247-254 2005; Awate, SP., *et al.*, INFORMATION PROCESSING IN MEDICAL IMAGING, PROCEEDINGS, 3565: 677-688 2005; Ganesan, R., *et al.*, IIE TRANSACTIONS, 36 (9): 787-806 SEP 2004; Scheunders, P., IEEE TRANSACTIONS ON IMAGE PROCESSING, 13 (4): 475-483 APR 2004; Ghugre, NR., MAGNETIC RESONANCE IMAGING, 21 (8): 913-921 OCT 2003; Bao, P., *et al.*, IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING, 22 (9): 1089-1099 SEP 2003; Wu, ZQ., *et al.*, ELECTRONICS LETTERS, 39 (7): 603-605 APR 3 2003; LaConte, SM., *et al.*, MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, 44 (5): 746-757 NOV 2000; Laine, AF., ANNUAL REVIEW OF BIOMEDICAL ENGINEERING, 2: 511-550 2000; Zaroubi, S., *et al.*, MAGNETIC RESONANCE IMAGING, 18 (1): 59-68 JAN 2000; Nowak, RD., IEEE TRANSACTIONS ON IMAGE PROCESSING, 8 (10): 1408-1419 OCT 1999; y Healy, DM., *et al.*, ANNALS OF BIOMEDICAL ENGINEERING, 23 (5): 637-665 SEP-OCT 1995.

En la técnica se conocen otros tipos de algoritmos de procesamiento posterior que pueden aplicarse al conjunto de datos de IRM de ^{19}F antes o después de la cuantificación, tales como el llenado con ceros (A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance, 2ª Edición, Ray Freeman, Addison Wesley Longman Press 1997) y diversas interpolaciones de imágenes, eliminación de ruido y algoritmos de suavizado de imágenes (por ejemplo, véase The Image Processing Handbook, 3ª Edición, John C. Russ, CRC Press/IEEE Press).

En ciertas realizaciones, el conjunto anterior de parámetros clave (i-x) puede usarse para obtener medidas cuantitativas o estadísticas de la exactitud o confianza del número medido de células marcadas o índices relacionados. Los conjuntos de datos de IRM/SRM de ^{19}F con frecuencia se someten a limitaciones de SRN dentro de la ROI y, por lo tanto, con frecuencia esto es útil para calcular una medición de la confianza o exactitud de la medición. En la técnica se conocen muchos métodos para el análisis estadístico de IRM y otras imágenes de tipo biomédico. Se entiende que la realización reivindicada incluye estos métodos conocidos.

5. Formulaciones farmacéuticas y usos

Los métodos de administración de las emulsiones de la solicitud son bien conocidos para los expertos en la materia. Para conseguir la actividad deseada, las emulsiones pueden administrarse en una diversidad de formas de dosificación unitarias. La dosis variará de acuerdo con la emulsión particular. La dosis también variará dependiendo de la forma de administración, la salud general, condición, tamaño y edad del paciente.

En ciertas realizaciones, la administración de las emulsiones puede realizarse por vía intravascular, por ejemplo, a través de una infusión intravenosa por inyección. En ciertas realizaciones, pueden usarse otras vías de administración. Se encuentran formulaciones adecuadas para inyección en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17a ed. (1985). Dichas formulaciones deben ser estériles y no pirogénicas, y generalmente incluirán un vehículo farmacéuticamente eficaz, tal como solución salina, solución salina tamponada (por ejemplo, tamponada con fosfato), solución de Hank, solución de Ringer, dextrosa/solución salina, soluciones de glucosa y similares. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables cuando se requiera, tales como agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, agentes bactericidas, conservantes, estabilizantes y similares. En ciertas realizaciones se usan tampones adecuados para administración intravenosa para ayudar a la estabilidad de la emulsión. En ciertas realizaciones se usan glicoles para ayudar a la estabilidad de la emulsión.

En ciertas realizaciones, la administración de las emulsiones puede realizarse por vía parenteral, típicamente por inyección, tal como inyección intraarticular o intravascular (por ejemplo, infusión intravenosa) o inyección intramuscular. Si se desea y se puede poner en práctica para la emulsión particular a administrar, pueden usarse otras vías de administración, por ejemplo, oral (p.o.).

En las composiciones farmacéuticas de la solicitud también pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes aromatizantes y de perfume, conservantes y antioxidantes.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de las emulsiones objeto son formulaciones apirogénicas que carecen sustancialmente de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están limitadas dentro de microorganismos y se liberan cuando los microorganismos se rompen o se mueren. Las sustancias pirogénicas también incluyen sustancias termoestables (glicoproteínas) que inducen fiebre, procedentes de la membrana externa de bacterias y otros microorganismos. Estos dos tipos de sustancias pueden producir fiebre, hipotensión y shock si se administran a seres humanos. Debido a los posibles efectos perjudiciales, es ventajoso eliminar incluso pequeñas cantidades de endotoxinas de las soluciones farmacéuticas de fármaco administradas por vía intravenosa. La Administración de Alimentos y Medicamentos ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un período de una sola hora para aplicaciones de fármacos intravenosos (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)).

Las formulaciones de las emulsiones objeto de la invención incluyen las adecuadas para la administración oral, dietética, tópica, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea), oftalmológica (por ejemplo, tópica o intraocular), inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, gotas intranasales), rectal y/o intravaginal. Otros métodos adecuados de administración también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación controlada. Las endoprótesis, en particular, pueden recubrirse con un polímero de liberación controlada mezclado con un agente de la solicitud. Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación también pueden administrarse como parte de una terapia combinatoria con otros agentes (en la misma formulación o en una formulación separada).

La cantidad de la formulación que será terapéuticamente eficaz puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*. La dosificación de las composiciones a administrar puede determinarse por el experto en la materia sin experimentación indebida junto con estudios convencionales de dosis-respuesta. Las circunstancias relevantes a considerar al realizar esas determinaciones incluyen la afección o afecciones a tratar, la elección de la composición a administrar, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente. Por ejemplo, puede usarse el peso corporal real del paciente para calcular la dosis de las formulaciones en mililitros (ml) a administrar. No puede haber un ajuste hacia abajo al peso "ideal". En dicha situación, puede calcularse una dosis apropiada mediante la siguiente fórmula: dosis (ml) = [peso del paciente (kg) x nivel de dosis (mg/kg)/concentración de fármaco (mg/ml)].

Los agentes terapéuticos de la divulgación pueden administrarse en una diversidad de formas de dosificación unitarias y sus dosificaciones variarán con el tamaño, potencia y semivida *in vivo* del agente terapéutico particular que se administre.

Para aplicaciones *in situ*, pueden formularse emulsiones que tienen propiedades farmacocinéticas óptimas para permitir la captación por los fagocitos antes de la eliminación de la emulsión.

5 Las dosis de los agentes terapéuticos de la divulgación también variarán dependiendo de la forma de administración, el uso particular de la emulsión, la salud general, el estado, el tamaño y la edad del paciente, y el criterio del médico a cargo del caso.

10 Las formulaciones de la solicitud pueden distribuirse como artículos de fabricación que comprenden material de envasado y un agente farmacéutico que comprende la emulsión y un vehículo farmacéuticamente aceptable según sea apropiado para el modo de administración. Las formulaciones farmacéuticas y usos de la divulgación pueden combinarse con cualquier composición conocida para las aplicaciones de la solicitud.

6. Métodos informáticos

15 Los métodos para cuantificar células marcadas típicamente se llevarán a cabo con la ayuda de un ordenador, que puede funcionar con un software diseñado para el fin de dicha cuantificación. Dicho software puede ser un programa autónomo o puede estar incorporado en otro software, tal como un software de procesamiento de imágenes de IRM (véase la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007-0253910).

20 La divulgación se comprenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente solicitud, y no pretenden limitar la divulgación.

Ejemplos

25 A menos que se indique otra cosa, todas las siguientes nanoemulsiones presentadas se preparan con perfluoro-15-corona éter, un fluorocarburo bien conocido en la técnica usado para formular emulsiones como sustitutos de sangre, para la detección de oxígeno y el rastreo de células (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 4.838.274 y 5.785.950). En los siguientes ejemplos, se introdujeron nuevos enfoques para formular nanoemulsiones estables con
30 perfluoro-15-corona 5 éter. Otras nuevas formulaciones incorporan diversos coemulsionantes que hacen que las emulsiones sean "autoliberables" en diversos tipos celulares. Las nuevas formulaciones de emulsión descritas en el presente documento muestran notables mejoras con respecto a las emulsiones de la técnica anterior, particularmente con respecto a un menor tamaño de gotas de la nanoemulsión (de tan solo 110 nm), lo cual es ventajoso para aplicaciones *in vivo*. Las nanoemulsiones presentadas se preparan como monodispersas ($PDI < 0,1$)
35 y muestran una estabilidad excepcional en presencia de suero y a temperaturas corporales. Además, la novedad se basa en la introducción de sulfato de protamina u otros cotensioactivos para conseguir propiedades de "autoliberación" y el uso de Cremophor EL, para conseguir un tamaño de gotas excepcionalmente pequeño y una alta estabilidad *in vivo*.

40 Todas las nanoemulsiones presentadas se prepararon a una escala de 0,5-1 litro usando microfluidización. Las emulsiones se analizaron por dispersión de luz dinámica (DLS) para el tamaño de gotas y polidispersidad usando un Malvern Zetasizer Nano ZS. El aspecto de las emulsiones se evaluó visualmente. Las nanoemulsiones se ensayaron con respecto a la estabilidad en suero, el pH y la osmolalidad. Además, se ha demostrado la eficacia para experimentos *in vivo*.

45 Todos los experimentos con suero se realizaron en DMEM (medio esencial modificado por Dubelcco, Invitrogen Inc.) en presencia de FBS al 10 % (suero bovino fetal, Hyclone Inc.).

Abreviaturas

50 p/p relación peso/peso
TA temperatura ambiente
PDI índice de polidispersidad
WFI agua para inyección (estéril)
PSA análisis del tamaño de gotas
MF Microfluidizador

Material

Perfluoro-15-corona-5-éter: ExFluor, Inc. Round Rock, TX.
55 Sulfato de protamina: Sigma P3369 lote n.º 022K12201 CAS n.º 53597-25-4. Satisface el ensayo de la USP
Pluronic F68: BASF (Lutrol F68/ Poloxamer 188) calidad USP/NF
Agua para inyección: Braun (estéril/apirrogénica)
Colesterol: Sigma Cholesterol Ph Eur; 14606
DPPE: Dipalmitoil fosfatidiletanol de Avanti Polar Lipids: 16:0 PE 850705P
60 Lecitina (PC de Huevo): fosfatidil Colina de Huevo Lipoide

Cremophor ELP: BASF 10205104 calidad USP/NF
Propilenglicol: Fagron BV 176947 calidad Ph Eur

Perfluoro-15-corona 5 éter/F68 con y sin sulfato de protamina

Tabla 1. Nanoemulsiones 1 y 2 composición con volumen de emulsión final de 1 l en WFI como fase externa.

Formulación	perfluoro-15-corona-5-éter % p/p	Emulsionante 1 % p/p	Emulsionante 2 % p/p
1	15 %	0,6 % Pluronic F68	
2	15 %	0,6 % Pluronic F68	0,04 % Sulfato de Protamina

Procedimiento:

Primero se preparó una pre-emulsión altamente concentrada, se diluyó con agua estéril para alcanzar la concentración final necesaria y finalmente se procesó por MF para obtener una emulsión con un tamaño de gota (<200 nm) y polidispersidad (<0,15) aceptables. Los emulsionantes y aditivos se disolvieron en agua estéril justo antes del uso. Se preparó solución de Pluronic F68 en agua a 100 mg/ml y sulfato de protamina a 20 mg/ml. La pre-emulsión concentrada se preparó procesando todos los líquidos requeridos (aceite de perfluoro-15-corona 5 éter, solución de F68 y solución de Sulfato de Protamina) con cizalla rotativa (usando un eje ultra-turrax con un diámetro de 25 mm) a 13500 rpm durante 2,5 minutos. Esta primera mezcla después se diluyó hasta la concentración final necesaria y se volvió a procesar con cizalla rotativa durante 1 minuto. Las pre-emulsiones se procesaron inmediatamente por MF, usando un microfluidizador M-110S (Microfluidics Corp.). La presión del líquido durante el proceso de microfluidización fue >18500 psi (1275,53 bar), y el pequeño tamaño de gota se consiguió mediante 5 a 8 pases (ciclos) discretos. La nanoemulsión se esterilizó por filtración. El producto se filtró usando un disco de PRF de 47 mm (PTFE, 0,22 µm) en un soporte de filtro (PALL, Inc.). Se consiguió una filtración satisfactoria usando un bajo flujo de 2-8 ml/min.

Las emulsiones se inspeccionaron visualmente y se sometieron a mediciones del tamaño de gotas y de la polidispersidad por DLS. Todas las muestras se diluyeron con WFI para alcanzar una concentración final de un 1 % de perfluoro-15-corona-5-éter antes de las mediciones de DLS.

Resultados

Tabla 2. Resultados de PSA e inspección visual

Formulación	Diámetro (nm)	(PDI)	Pico Medio (nm)	Aspecto Visual
1	149	0,036	157	turbio, lechoso, homogéneo
2	150	0,036	158	turbio, lechoso, homogéneo

En las dos formulaciones, el tamaño de gotas fue <200 nm y la polidispersidad <0,2 durante 3 meses tras el almacenamiento a 5 °C y a temperatura ambiente.

Nanoemulsión de perfluoro-15-corona 5 éter con Cremophor-EL (Formulación 3)

Se diseñó una nueva formulación de perfluoro-15-corona-5 éter para conseguir una mayor estabilidad y un menor tamaño de gota con respecto a las nanoemulsiones basadas en lípidos conocidas actualmente.

Esta nueva formulación utiliza por primera vez Cremophor® EL (BASF) como emulsionante para un fluorocarburo. Cremophor EL es un solubilizante no iónico en el que el componente principal es ricinoleato de glicerol-poli-etilenglicol que, junto con ésteres de ácidos grasos de poli-etilenglicol, representa la parte hidrófoba; el componente hidrófilo más pequeño consiste en poli-etilenglicoles y glicerol etoxilado. El componente lipídico se incorpora en la cubierta liposomal de la gota de nanoemulsión, mientras que el PEG asegura la estabilización estérica. La gota de nanoemulsión resultante tiene un núcleo de perfluoro-15-corona-5-éter, un recubrimiento liposomal y una superficie estabilizada estéricamente a través de la parte de PEG del Cremophor EL. La estabilización estérica mejoró notablemente la vida útil y la estabilidad de la nanoemulsión *in vivo*. Para demostrar las mejoras conseguidas mediante la introducción de Cremophor EL en la formulación de emulsión, se preparó la

formulación de la técnica anterior (emulsión 4) siguiendo un procedimiento presentado previamente (documento WO2006096499) junto con la nueva formulación (emulsión 3). Las dos emulsiones se compararon y los resultados se presentan más adelante. Las dos emulsiones se prepararon en una escala de 250 ml.

5 **Tabla 3. Composiciones de emulsión con medio de WFI y liposomas que consistían en un 70 % en moles de lecitina, un 28 % en moles de colesterol y un 2 % en moles de DPPE.**

Formulación	perfluoro-15-corona-5-éter % p/p	Emulsionante 1 % p/v	Emulsionante 2 % p/v	Aditivo % p/v
3	35,6 %	3,0 % Cremophor ELP	2,0 % Liposomas	2,0 % Propilenglicol
4	35,6 %	2,0 % de aceite de Cártamo	2,0 % Liposomas	1,7 % Glicerina

Procedimiento:

En resumen, se prepararon liposomas por sonicación de los componentes liposomales. Se preparó una pre-emulsión concentrada añadiendo perfluoro-15-corona-5-éter/emulsionante 1 y aditivo; posteriormente, el lote se diluyó con agua para inyección hasta la concentración final y se procesó usando el MF hasta que se obtuvo el tamaño final de gotas de aceite.

Con más detalle, se disolvieron los componentes liposomales lecitina, colesterol y DPPE en cloroformo y se secaron por evaporación rotatoria en una película. Los lípidos después se dispersaron en WFI por sonicación. Las suspensiones resultantes se lavaron abundantemente con argón (gas), se cerraron y se almacenaron protegidas de la luz a 5 °C hasta el uso. Todos los componentes, incluyendo el Cremophor® EL (o aceite de cártamo), el perfluoro-15-corona-5-éter, el propilenglicol y los liposomas primero se combinaron con una pequeña cantidad de agua. Esta mezcla concentrada inicial tenía perfluoro-15-corona-5-éter a un 60 % p/p. La mezcla se procesó por cizalla rotativa (turrax) durante dos minutos a 12500 rpm y la pre-emulsión concentrada resultante se diluyó adicionalmente con WFI hasta el volumen final y se procesó de nuevo durante 1 minuto a 12500 rpm. La pre-emulsión no era estable y, por lo tanto, se procesó inmediatamente por microfluidización con 5 a 8 pases (ciclos) discretos en el MF con una presión de >18500 psi (1275,53 bar). El producto de emulsión final fue estable como se describe más adelante.

La formulación 5 se preparó usando el procedimiento descrito anteriormente para la formulación 3, reemplazando perfluoro-15-corona-5 éter en peso por PFPE lineal. Este reemplazo fue posible debido al peso específico y la viscosidad similares entre el PFPE lineal y el perfluoro-15-corona-5 éter. La cantidad de óxido de PFPE en la formulación 5 fue equivalente a la cantidad en peso de perfluoro-15-corona 5 éter en la formulación 3, con la ventaja de que se obtuvo un mayor número de espines de ¹⁹F equivalentes/gota de nanoemulsión. Las cantidades de co-mezcla de tensioactivo, Cremophor EL y aditivo fueron iguales a las descritas para la formulación 3. En resumen, primero se combinaron Cremophor® EL (o aceite de cártamo), PFPE lineal, propilenglicol y liposomas con una pequeña cantidad de agua. Esta mezcla concentrada inicial comprendía PFPE lineal al 60 % p/p. La mezcla se procesó por cizalla rotativa (turrax) durante dos minutos a 12500 rpm, y la pre-emulsión concentrada resultante se diluyó adicionalmente con WFI hasta el volumen final y se procesó de nuevo durante 1 minuto a 12500 rpm. La pre-emulsión fue estable y se procesó inmediatamente por microfluidización con 5 a 8 pases (ciclos) discretos en el MF con una presión de >18500 psi (1275,53 bar). La Figura 7 muestra las mediciones del tamaño de las gotas por DLS para la formulación 5 el día 1 y el día 342. Estos datos demostraron la estabilidad excepcional de esta formulación tras el almacenamiento a 4 °C.

Resultados:

Estabilidad de la vida útil de la emulsión de la formulación 3:

La emulsión 3 se siguió por DLS y se inspeccionó visualmente con respecto a signos de desestabilización durante un total de >6 meses. En la Figura 1 se muestra un resumen de los datos de estabilidad para la formulación 3. Por la inspección visual, la formulación 3 tuvo un aspecto turbio y lechoso; no se observaron gotas grandes, agregados, sedimentación o separación de fases durante el seguimiento. Es importante indicar que el tamaño de las gotas de la emulsión de la formulación 3 era más pequeño que el de todas las demás emulsiones ensayadas y, lo que es más importante, el tamaño de las gotas y el PDI se redujeron de forma espectacular en comparación con la formulación 4 (documento WO2006096499). En la Tabla 4 se muestran resultados comparativos. La introducción de Cremophor EL redujo de forma espectacular el tamaño de gotas de la formulación 3, en comparación con la formulación 4 preparada con aceite de cártamo en las mismas condiciones de fabricación.

Tabla 4. Tamaño comparativo de gotas y mediciones de PDI de Formulaciones 3 y 4

Formulación	Diámetro (nm)	(PDI)	Pico Medio (nm)
3	105	0,108	116
4	217	0,053	233

Tanto a 5 °C como a 25 °C, se detectó inicialmente un pequeño aumento en el tamaño de gotas (17 % a 5 °C después de 2 meses y hasta el 32 % a 25 °C). El pequeño aumento en el tamaño de las gotas indicó una posible maduración de Ostwald durante los 2 primeros meses de seguimiento. En el punto de tiempo de 3 meses, el tamaño se estabilizó a aproximadamente 150 nm y el PDI se mantuvo bajo (<0,15). El aumento de volumen de las gotas se detuvo y la nanoemulsión no cambió en su aspecto visual y se mantuvo estable durante el seguimiento posterior. La emulsión 3 se ensayó en presencia de suero a dos puntos de tiempo, tiempo 0 y 6 meses. En cada punto de tiempo, el tamaño de las gotas de la nanoemulsión y el PDI no mostraron un cambio significativo en presencia de suero después de 3 h de incubación a 37 °C (Tabla 6).

Tabla 5. Aspecto visual, pH y osmolalidad de la Formulación 3.

Formulación	pH	Osmolalidad (mOsmol/kg)	Aspecto Visual
3	4,7	311	La muestra fue turbia y lechosa, no se observaron gotas o sedimentación

Tabla 6. Estabilidad en suero de la Formulación 3.

Formulación	Punto de tiempo/Condiciones	Diámetro (nm)	PDI	Pico Medio (nm)
3	T = 0 semana	105	0,108	116
3 en suero	T = 1 hora/ 37 °C	105	0,187	129
3 en suero	T = 3 hora/ 37 °C	118	0,255	143

La formulación 4 con aceite de cártamo se preparó en paralelo con la formulación 3 usando métodos presentados previamente (documento WO2006096499). El tamaño de las gotas, el PDI y la estabilidad en suero de esta emulsión se compararon con la formulación 3, que utiliza Cremophor EL (anteriormente). El tamaño de gotas de la formulación 4 fue sustancialmente más grande que en comparación con las formulaciones 1, 2 o 3 (Tablas 4 y 7). El tamaño de las gotas aumentó aproximadamente un 25% después de solo una semana a 5 °C (Tabla 7). Después de un periodo de 2 semanas, se alcanzó el valor estacionario aparente para el tamaño de las gotas (Tabla 7). La polidispersidad aumentó considerablemente, lo cual no se observó en las otras formulaciones. La Tabla 8 muestra la estabilidad en suero de la formulación 4.

Tabla 7. Tamaño de gotas y mediciones de PDI de Formulación 4 en aceite de cártamo

Formulación	Punto de tiempo/Condiciones	Diámetro (nm)	PDI	Pico Medio (nm)
4	T = 0	217	0,053	233
	T = 1 semana/ a 5 °C	229	0,158	254
	T = 2 semana/ a 5 °C	232	0,147	271
	T = 1 semana/ a 25 °C	224	0,106	252

Formulación	Punto de tiempo/Condiciones	Diámetro (nm)	PDI	Pico Medio (nm)
	T = 2 semana/ a 25 °C	229	0,132	266

TABLA 8. Estabilidad en suero de la Formulación 4 que incorpora aceite de cártamo.

Formulación	Punto de tiempo/Condiciones	Diámetro (nm)	PDI	Pico Medio (nm)
4	T = 0 semana	217	0,053	233
4 en suero	T = 1 hora/ 37 °C	241	0,147	282
4 en suero	T = 3 hora/ 37 °C	244	0,139	281

5 **Estabilidad de vida útil de emulsión de la Formulación 5:**

La emulsión de la formulación 5 se siguió por DLS y se inspeccionó visualmente para detectar los signos de desestabilización durante un total de 11 meses. Como se ha descrito anteriormente, la Figura 7 muestra que el tamaño de partículas y el PDI permanecieron sin cambios después de 342 días (> 11 meses) tras el almacenamiento a 4-8 °C.

Incorporación de colorante fluorescente en la Formulación 3

Para demostrar adicionalmente la utilidad de la formulación 3, se incorporó un colorante fluorescente en la capa lipídica de la formulación 3 después del procesamiento. Esta adición creó un agente de “modalidad doble” que puede detectarse tanto por resonancia magnética de ¹⁹F como por diversos métodos de fluorescencia (por ejemplo, citometría de flujo, histología, análisis FAC, microscopía de fluorescencia y similares). Se usaron colorantes lipófilos que están disponibles ampliamente en el mercado (por ejemplo, dialquilcarbocianinas, Invitrogen, Inc.). Por ejemplo, se usó Dil (Molecular Probes), un colorante fluorescente que no es soluble en agua y no muestra prácticamente fluorescencia a menos que esté en un entorno hidrófobo lipídico. El Dil se incorporó en el recubrimiento liposomal de la formulación 3. Los estudios de fluorescencia mostraron una fluorescencia estable del colorante dentro de la parte liposomal de la formulación (Fig. 2). El colorante era claramente no fluorescente a menos que estuviera asociado con el núcleo lipídico de la emulsión. Debido a la baja solubilidad en agua, el colorante se mantuvo asociado con la nanoemulsión y mantuvo su fluorescencia tras dilución en agua o el medio de cultivo celular. La incorporación de colorante fluorescente no afectó al tamaño de gota o a la polidispersidad y no afectó a la estabilidad en suero de la formulación 3, como se muestra en la Figura 3. El colorante tampoco tuvo efectos negativos sobre la captación de la nanoemulsión en las células (datos no mostrados).

Formulaciones 3 y 5 con sulfato de protamina y polietilamina

Las nanoemulsiones 3 y 5 también pueden formularse con sulfato de protamina y polietilamina para mejorar la captación en células no fagocíticas. Estas poliaminas se incorporan en la pre-emulsión y se integran en la capa de tensioactivo de la emulsión después del procesamiento de MF, como se ha descrito anteriormente. La cantidad de poliamina se optimizará para conseguir un marcaje celular óptimo. (Véase el documento WO2009/009105).

Formulaciones 3 y 5 suplementadas con PFPE fluorescentes

Recientemente se han descrito amidas de PFPE mezcladas fluorescentes (FBPA) que contienen colorantes fluorescentes conjugados covalentemente (por ejemplo, BODIPYTR, FITC o Alexa647). Estos aceites de PFPE conjugados fluorescentes se comportan como una sola fase de fluorocarburo única durante el procesamiento de nanoemulsiones [si se desean más detalles, véase Janjic *et al.*, J Am Chem Soc. 5 mar de 2008; 130(9): 2832-41]. Pueden prepararse versiones fluorescentes de las formulaciones 3 y 5 con FBPA. En la formulación 3, puede reemplazarse un 10 % v/v del perfluoro-15-corona-5 éter por FBPA. Por consiguiente, en la formulación 5, se reemplaza un 10 % v/v de óxido de PFPE por FBPA. Los aceites se mezclan cuidadosamente entre sí para obtener una fase de fluorocarburo única y después se someten a procedimientos de preparación de nanoemulsiones como se describe para la formulación 3 y la formulación 5. La ventaja de la fase de fluorocarburo que se marca con colorante fluorescente en lugar de la co-mezcla de tensioactivo es múltiple. En primer lugar, el colorante fluorescente

en estas nuevas formulaciones se mantiene dentro del núcleo de fluorocarburo de la gota de nanoemulsión a lo largo de todo el procesamiento, durante el marcaje celular y supuestamente *in vivo*. En segundo lugar, la señal fluorescente es directamente proporcional a la señal de RMN de ^{19}F del tejido o las células marcadas [Janjic *et al.*, J Am Chem Soc. 2008 Mar 5; 130(9): 2832-41], por lo tanto, no hay marcaje diferencial entre las células (o tejidos) para las dos modalidades de formación de imágenes o detección (es decir, resonancia magnética y fluorescencia).

Evaluación biológica de la formulación 3.

La formulación 3 mostró una excelente estabilidad y un tamaño de gotas muy pequeño (<150 nm) con baja polidispersidad (<0,15), como se muestra en la Figura 1. La nanoemulsión es estable tanto *in vitro*, en condiciones de cultivo celular, como *in vivo*, tras la inyección a roedores. En el presente documento se presenta una evaluación más detallada de la formulación 3, incluyendo la captación celular, el perfil de toxicidad y la evaluación de las células marcadas con respecto al fenotipo y cambios de actividad.

Se expusieron células RAW (ATCC, Manassass, VA), cultivadas de acuerdo con las instrucciones del vendedor, a diferentes concentraciones de formulación 3 durante 3 y 24 h, y la citotoxicidad se estimó por recuento directo de células. Se observó una toxicidad mínima a la máxima dosis aplicada y después de 24 horas de exposición (Figura 4A). La captación de la formulación 3 en las células RAW se midió por RMN de ^{19}F en sedimentos celulares como se ha descrito anteriormente y mostró una clara dependencia de la dosis (Figura 4B). La Figura 5 muestra un espectro de RMN de ^{19}F representativo de las células RAW marcadas con la formulación 3. Se obtuvo una captación satisfactoria en las células RAW fagocíticas después de 18 h de co-incubación y sin reactivos de transfección. Para promover la captación en células no fagocíticas, se incorporaron sulfato de protamina y polietilamina en la formulación 3 como se describe en la formulación 2 (anterior).

El marcaje de células de la formulación 3 no mostró impacto sobre la capacidad de producción de citocinas de las células RAW (Figura 6). Las células se activaron por LPS durante 24 h antes de exponerse a la formulación 3 durante 18 h, se lavaron y después se cultivaron durante 24 h. Se usó un ensayo ELISA para medir la producción de citocinas, incluyendo los niveles de IL-6 y TNF-alfa. Estos ensayos mostraron que las células marcadas con formulación 3 no tenían ningún impacto sobre su actividad *in vitro*.

Se midió el tiempo de eliminación en sangre *in vivo* para las formulaciones 3 y 5 en roedores (Figure 8). En una cohorte de ratones C57BL/6 (hembra, 6 semanas de edad) se inyectó una sola embolada de 0,5 ml de una formulación dada a través de la vena de la cola. Después de la inyección, no se observaron efectos adversos en estos animales. Después se extrajeron pequeñas alícuotas de sangre de cada animal en un conjunto fijado de puntos de tiempo. Se usó un tamaño de muestra de N = 5 ratones para cada formulación. El contenido de ^{19}F de cada muestra de sangre se ensayó usando RMN de ^{19}F ; un volumen conocido de cada una de las muestras de sangre se añadió a una solución de referencia de flúor calibrada (TFA), como se ha descrito anteriormente, puesta en un capilar, y se calculó la cantidad de ^{19}F por volumen de sangre a lo largo del tiempo (Fig. 8). En general, las formulaciones 3 y 5 tuvieron una semivida en sangre similarmente larga (>14 horas, Fig. 8).

En general, varias de las formulaciones descritas anteriormente (por ejemplo, formulaciones 3 y 5) se crearon para acelerar la tarea rutinaria de cuantificar la inflamación en especímenes de tejido intactos. En el caso de los experimentos de marcaje *in situ*, la inflamación puede ensayarse de dos maneras - usando RMN de alta resolución convencional o usando IRM. En ambos métodos, se detecta la abundancia de núcleos de ^{19}F en el tejido, contenidos dentro de células inflamatorias fagocíticas (por ejemplo, monocitos/macrófagos/neutrófilos). La mayor parte de la instrumentación de RMN estándar puede detectar rutinariamente ^{19}F . La RMN proporciona un enfoque sensible y económico para cuantificar el grado de infiltración de leucocitos en las muestras de tejido. Este enfoque evita la necesidad de la engorrosa tinción patológica y la posterior cuantificación celular mediante microscopía. No se requiere una preparación especial del tejido, excepto una etapa de fijación opcional. Además, el uso de RMN elimina la posibilidad de desviaciones y errores en el muestreo histológico, dando como resultado conjuntos de datos más pequeños y de mayor calidad. El análisis de RMN de los tejidos escindidos no es destructivo y, por lo tanto, los mismos tejidos se pueden someter a análisis histológicos o bioquímicos convencionales después de la RMN.

Como ejemplo típico de aplicación de la eficacia *in vivo* de estas emulsiones, la formulación 3 se usó para detectar la inflamación en un modelo de granuloma inducido por esponja usando IRM *in vivo*. Se humedeció un disco de esponja de PVS en adyuvante completo de Freund (CFA) y se implantó por vía subcutánea dorsalmente en un ratón C57BL/6. Se administró una sola inyección intravenosa de la formulación 3 (0,5 ml) el día 4 después de la cirugía. Se obtuvieron imágenes del ratón anestesiado el día 5 a 7T. La figura 9 muestra una imagen de fusión $^1\text{H}/^{19}\text{F}$, con el ^{19}F en pseudo-color. Los datos muestran una concentración intensa de macrófagos marcados con la formulación 3 que rodean a la esponja (asterisco). También se observa una pequeña cantidad de ^{19}F en el hígado, una ruta de eliminación importante de la formulación (Fig. 9). 'R' es un capilar de referencia de ^{19}F diluido a lo largo del torso del animal. Los animales de control con la esponja humedecida en solución salina presentaron una señal de ^{19}F negativa después de la administración de la formulación 3. Estos datos de ejemplo muestran la alta especificidad por la inflamación de la formulación 3.

Como ejemplo adicional de la utilidad de las formulaciones descritas anteriormente, se usó la formulación 3 para medir el perfil de inflamación en la médula espinal (SC) de un modelo de roedor de esclerosis múltiple,

encefalomielitis alérgica experimental (EAE). El modelo de EAE se generó en una rata DA usando una sola inoculación subcutánea en la base de la cola que consistía en homogeneizado isogénico de médula espinal mezclado con adyuvante completo de Freund (CFA). En ratas EAE en estadio clínico 2 se inyectó por vía intravenosa formulación 3 (0,5 ml) y, 48 horas después, se ensayaron segmentos fijos intactos de la SC con respecto a la inflamación usando espectroscopia de RMN de ^{19}F convencional a 470 MHz (Figure 10). En la figura 10, el índice de inflamación representa la densidad de inflamación de cada vertebra de la médula espinal, calculada como número de núcleos de ^{19}F por peso de tejido. También se muestran animales de control que reciben CFA, pero no homogeneizado de SC, que muestran una captación mínima de fórmula 3. Los datos mostrados son los resultados medios para $n = 3$ animales. En este ejemplo, la preparación total y el tiempo de análisis por SC fue de aproximadamente 6 horas, representando aproximadamente un orden de magnitud en ahorro de tiempo en comparación con análisis histológicos convencionales.

Hay muchos otros ejemplos experimentales *in vivo* recientes de la utilidad de la formulación 3 y 5. Por ejemplo, Klug *et al.* (Abstract #3172, *Proc. Int. Soc. Mag. Reson. Med.* 17, 2009) demostraron que la formulación 5 puede usarse para visualizar la inflamación aguda y crónica en modelos de ratón. Estos investigadores usaron ratones C57BL/6 preparados con inyecciones localizadas en la oreja de TNF- α , y ratones apoE $^{-/-}$, un modelo de placas ateroscleróticas. Después de una sola inyección intravenosa de formulación 5, pudo detectarse ^{19}F por IRM en sitios de inyección de TNF- α en los ratones C57BL/6, y en los ratones apoE $^{-/-}$, pudo detectarse ^{19}F en la región del arco braquiocefálico, que es un sitio común de placas en estos animales.

En otros estudios, Hitchens *et al.* (Abstract #932, *Proc. Int. Soc. Mag. Reson. Med.* 17, 2009) usa la formulación 3 para visualizar el rechazo del trasplante de órganos sólidos. Se trasplantó el corazón/pulmón o riñón de una rata DA en una cepa de rata BN. En ambos casos, el trasplante de DA a BN sirve como modelo de aloinjerto experimental que experimenta un rechazo agudo. Varios días después del trasplante, se administró una sola inyección de formulación 3 en estos animales por vía intravenosa y, después, los animales se sometieron a IRM de $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ 24 horas después. Los datos de ^{19}F *in vivo* mostraron claramente la infiltración de células inflamatorias en los órganos de rechazo, pero no en los órganos de control (sin rechazo). Los estudios histológicos de validación confirmaron que la señal de ^{19}F se origina en macrófagos infiltrantes.

Otros investigadores (Basse-Lusebrink *et al.*, Abstract #807, *Proc. Int. Soc. Mag. Reson. Med.* 17, 2009) usaron tanto la formulación 3 como la formulación 5 en un modelo de ratón de infarto cortical. Los animales infartados recibieron inyecciones IP de cualquier formulación y se observó una señal de IRM de ^{19}F localizada y pronunciada a partir de una supuesta infiltración de macrófagos en la lesión cortical isquémica. Los autores mostraron adicionalmente que el pequeño desplazamiento químico (~ 1 ppm) entre el perfluoro-15-corona-5 éter y el PFPE lineal usados en la formulación 3 y 5, respectivamente, podía resolverse espectroscópicamente *in vivo* para revelar emulsiones inyectadas en diferentes puntos de tiempo y, por lo tanto, diferentes ondas de células inflamatorias en la lesión. Usando formación de imágenes por desplazamiento químico (CSI) localizado espacialmente convencionales se pudo detectar y resolver simultáneamente la distribución cerebral *in vivo* de las dos formulaciones que se inyectaron en puntos de tiempo diferentes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende perfluoro-15-corona-5 éter u óxido de PFPE, un emulsionante, una co-mezcla de tensioactivo y un aditivo, en la que el emulsionante comprende ricinoleato de glicerol polietilenglicol.
2. La composición acuosa de la reivindicación 1, en la que la co-mezcla de tensioactivo comprende un 70 % en moles de lecitina, un 28 % en moles de colesterol y un 2 % en moles de DPPE.
3. La composición acuosa de la reivindicación 1 o 2, en la que el aditivo es propilenglicol.
4. La composición acuosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende perfluoro-15-corona-5 éter en un 35,6 % p/v, un emulsionante en un 3,0 % p/v, donde el emulsionante comprende ricinoleato de glicerol polietilenglicol, una co-mezcla de tensioactivo en un 2,0 % p/v, donde la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, y un aditivo en un 2,0 % p/v, donde el aditivo es propilenglicol.
5. La composición acuosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende óxido de PFPE en un 35,6 % p/v, un emulsionante en un 3,0 % p/v, donde el emulsionante comprende ricinoleato de glicerol polietilenglicol, una co-mezcla de tensioactivo en un 2,0 % p/v, en la que la co-mezcla de tensioactivo comprende lecitina, colesterol y DPPE, y un aditivo en un 2,0 % p/v, donde el aditivo es propilenglicol.
6. Una emulsión que comprende una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Un método para preparar una emulsión de la reivindicación 6 que comprende métodos de alta energía.
8. Un método para marcar una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula *ex vivo* con una emulsión de la reivindicación 6 en condiciones tales que el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se asocie con la célula, en el que la célula no es una célula obtenida a partir de un embrión humano.
9. Un método para detectar una célula en un sujeto, comprendiendo el método:
 - a) administrar al sujeto una célula que está marcada con una emulsión de la reivindicación 6; y
 - b) examinar al menos una parte del sujeto por una técnica de resonancia magnética nuclear, detectándose de esta manera la célula marcada en el sujeto,en el que la célula no es una célula obtenida a partir de un embrión humano.
10. Un método para medir la presión parcial de oxígeno en un tejido, comprendiendo el método poner en contacto el tejido *in vivo* con una emulsión de la reivindicación 6 en condiciones tales que el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se asocie con el tejido.
11. La emulsión de la reivindicación 6 para uso en un método para detectar la permeabilidad vascular elevada en un tejido, en la que el tejido se va a poner en contacto *in vivo* con la emulsión en condiciones tales que el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se asocie con el tejido.
12. La emulsión de la reivindicación 6 para uso en un método para detectar inflamación en un tejido, en la que el tejido se va poner en contacto *in vivo* con la emulsión en condiciones tales que el reactivo de formación de imágenes de fluorocarburo se asocie con el tejido.
13. Una formulación celular marcada para administrarse a un sujeto, comprendiendo la formulación:
 - a) una célula; y
 - b) una emulsión de la reivindicación 6 que está asociada con la célula,en la que la célula no es una célula obtenida a partir de un embrión humano.

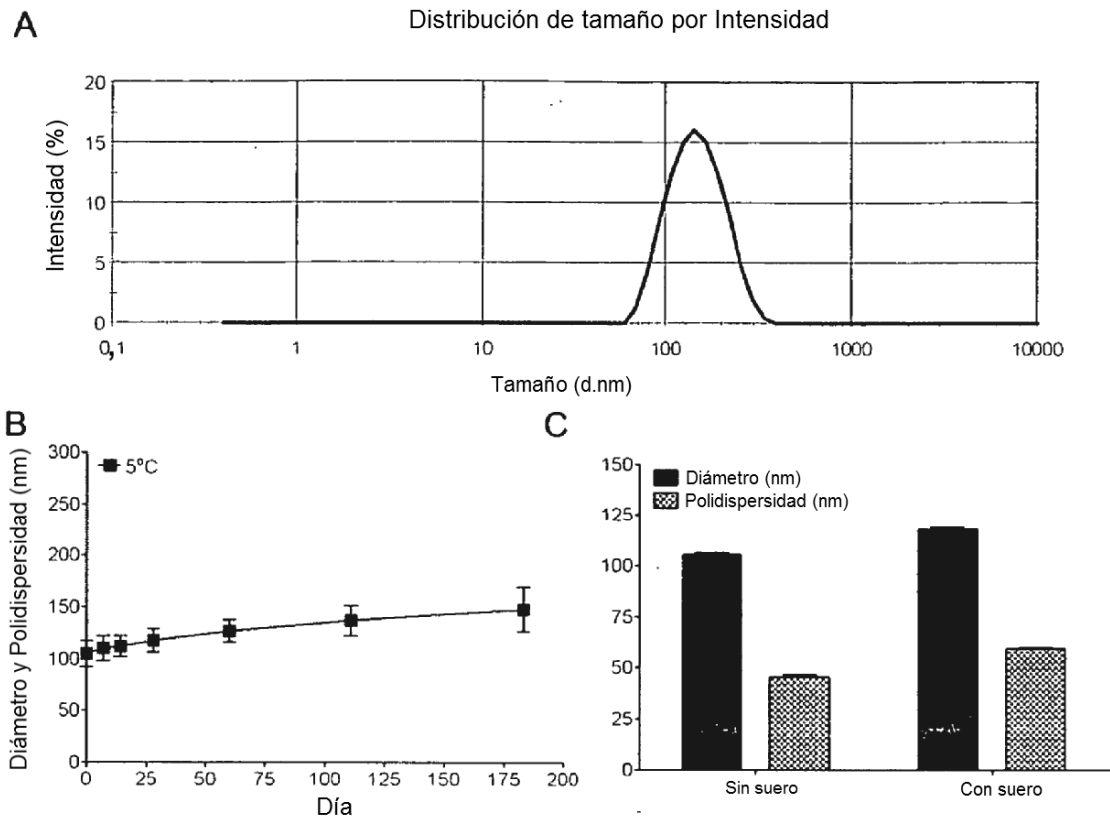


Figura 1.

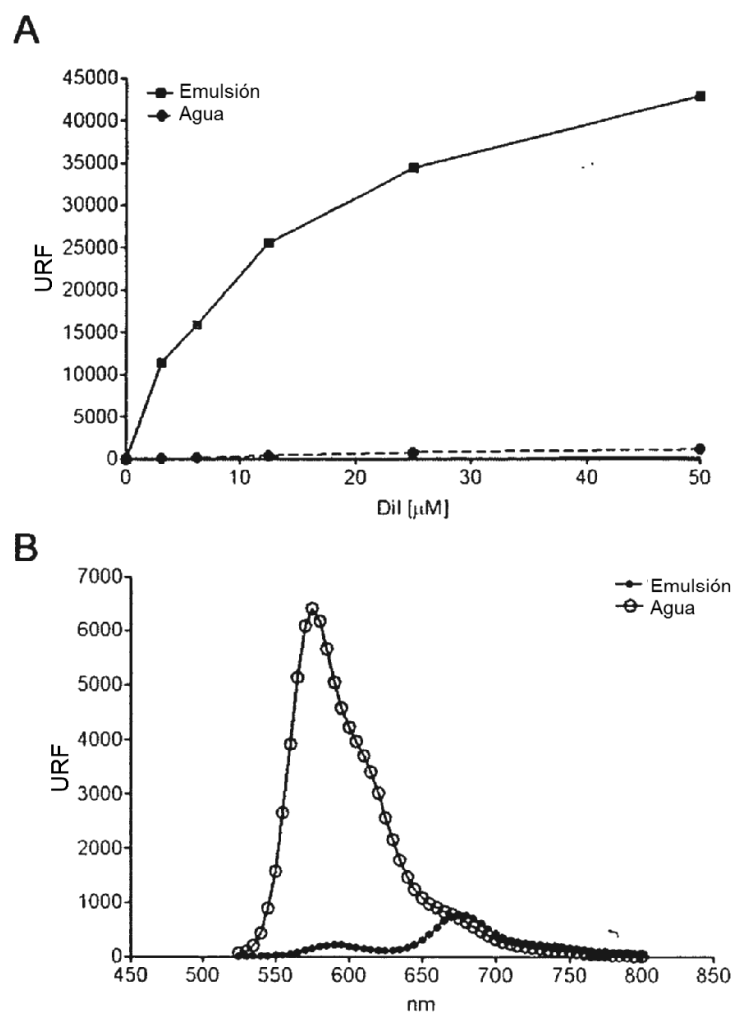


Figura 2.

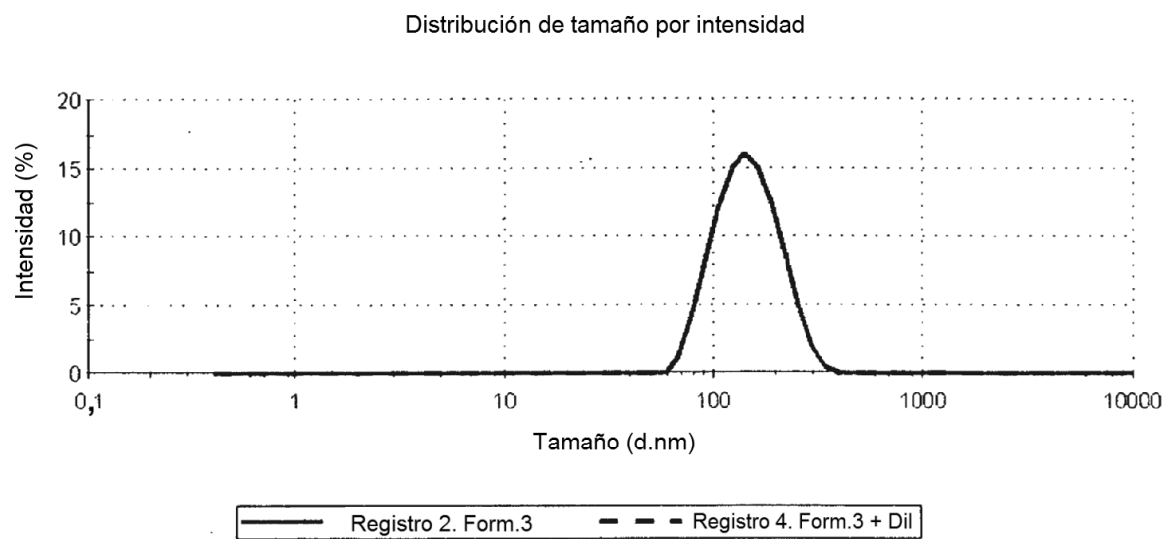


Figura 3.

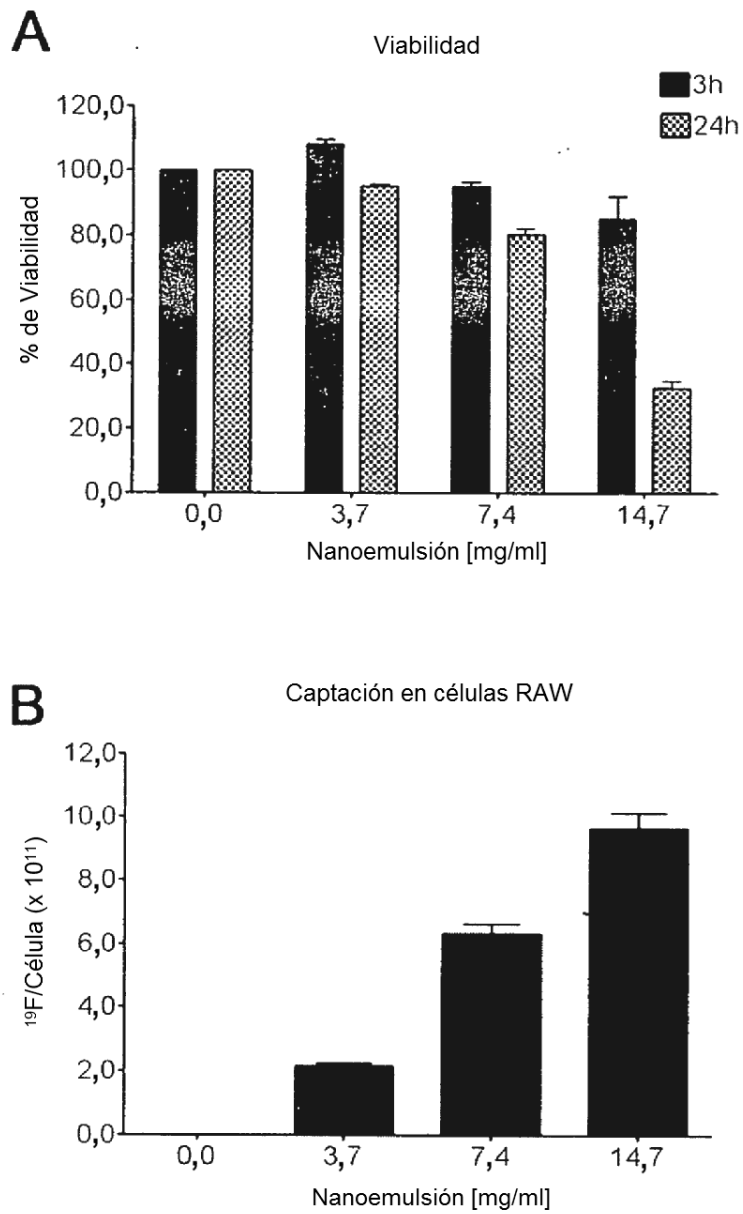


Figura 4.

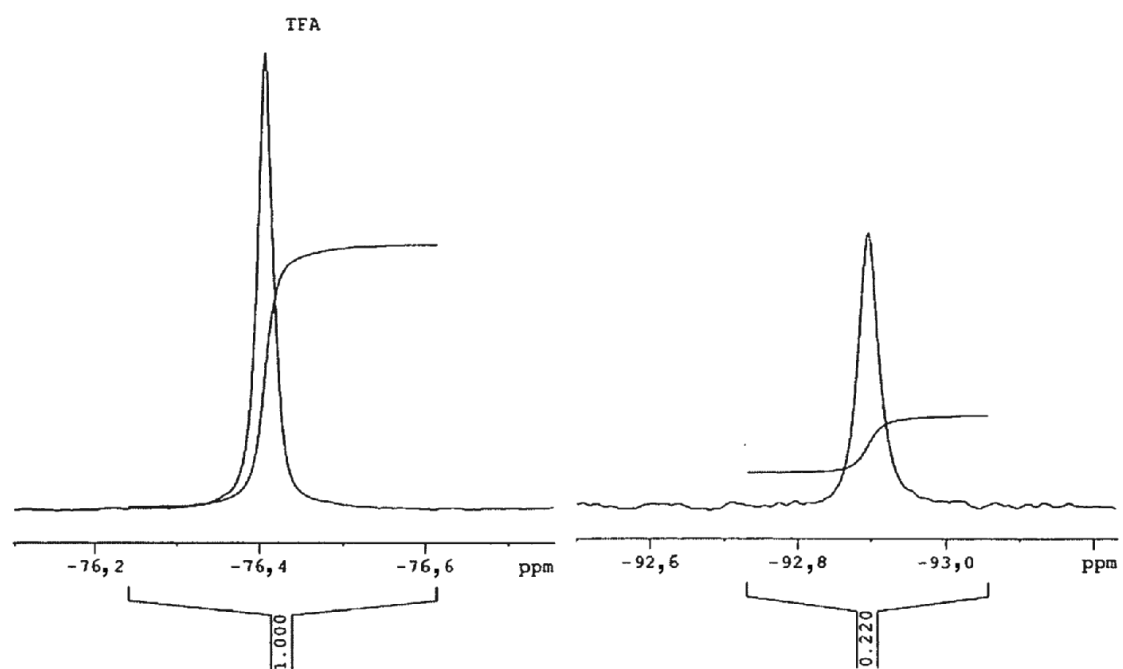


Figura 5.

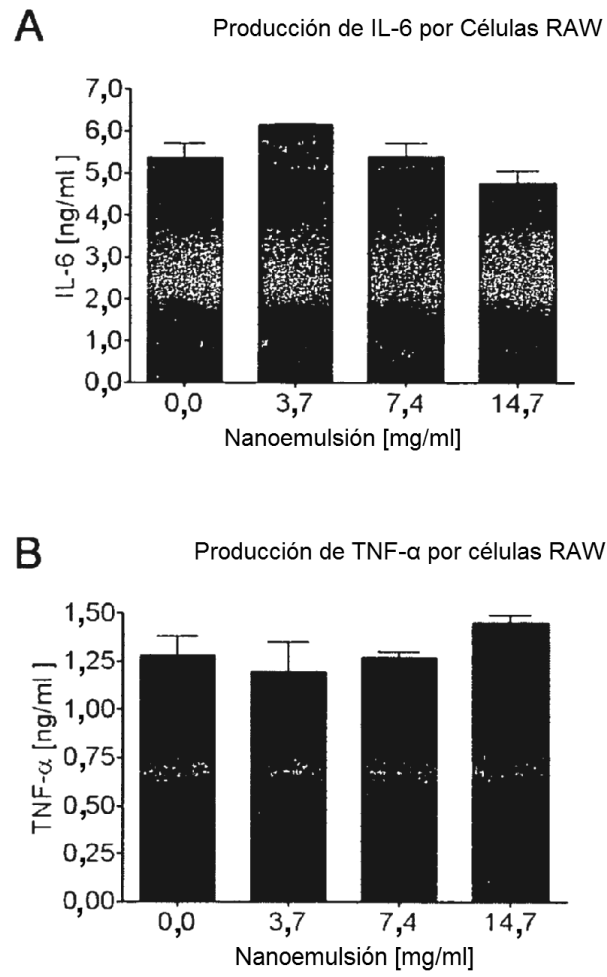


Figura 6.

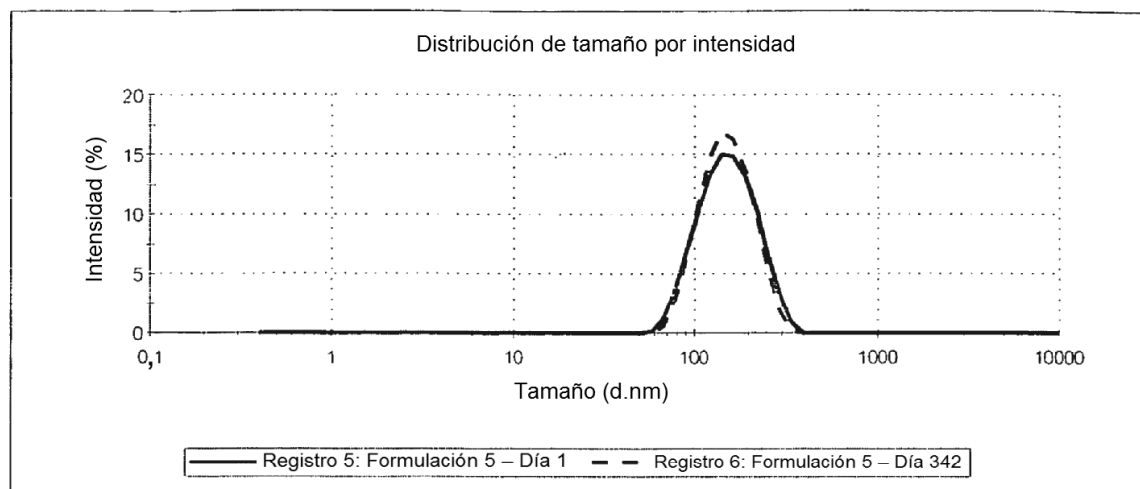


Figura 7.

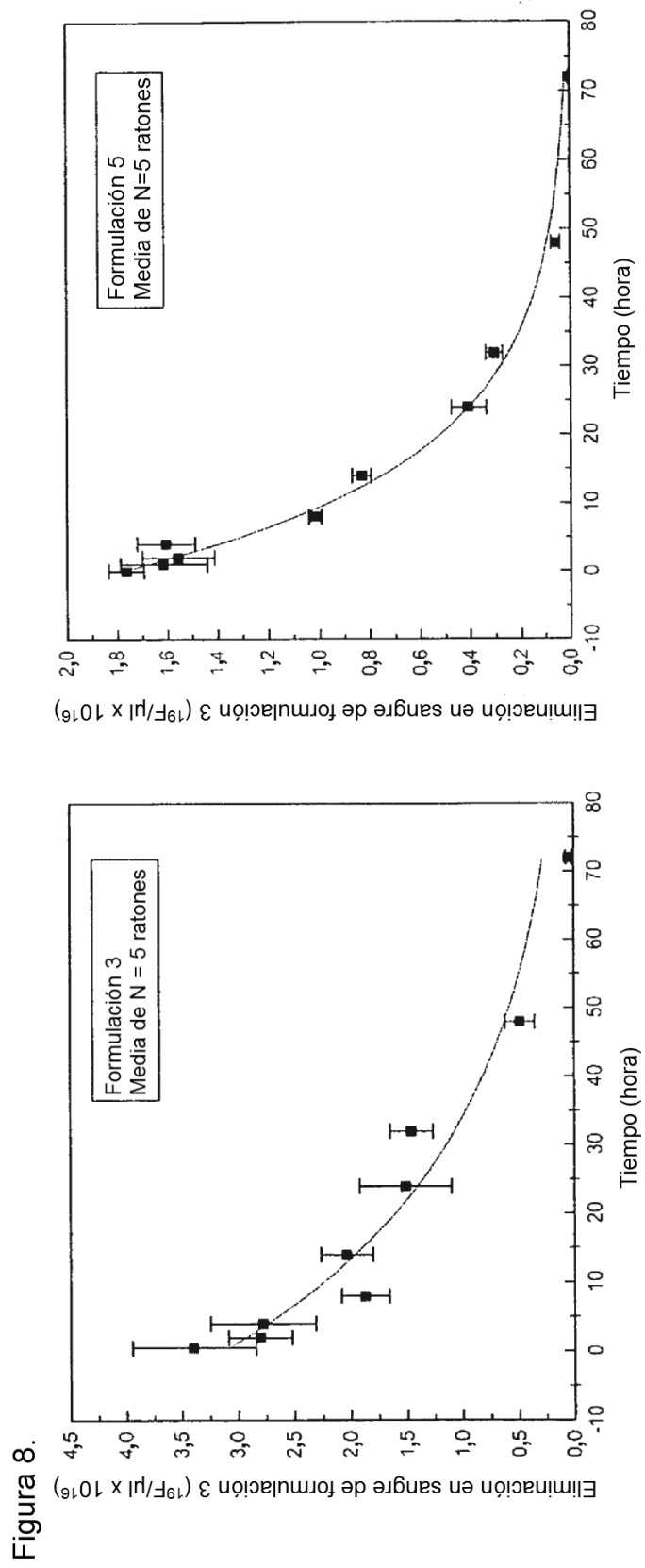


Figura 9.

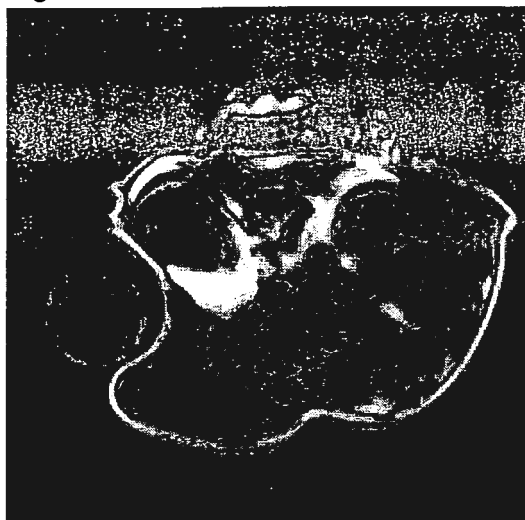


Figura 10.

