

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 277**

51 Int. Cl.:

A61K 49/22

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2011 PCT/EP2011/063720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12020030**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2011 E 11743811 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2603242**

54 Título: **Microvesículas dirigidas llenas de gas**

30 Prioridad:

09.08.2010 EP 10172318

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

21.06.2018

73 Titular/es:

**BRACCO SUISSE SA (100.0%)
Centro Galleria, Via Cantonale 2
6928 Manno, CH**

72 Inventor/es:

**BETTINGER, THIERRY;
BUSSAT, PHILIPPE;
LAMY, BERNARD;
CHERKAoui, SAMIR y
GUILBERT-BRIGGER, IRENE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 673 277 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

Microvesículas dirigidas llenas de gas.

Campo técnico

- 5 La invención se refiere, en términos generales, a microvesículas dirigidas llenas de gas según las reivindicaciones y a suspensiones acuosas que contienen tales microvesículas, para usar, en particular, en métodos de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

El vertiginoso desarrollo de los agentes de contraste en los últimos años ha generado una serie de formulaciones diferentes, que resultan de utilidad en los estudios por imágenes resaltadas con contraste de los órganos y tejidos del cuerpo humano o animal.

- 10 Más recientemente, se le ha prestado atención a lo que se denomina “estudios por imágenes moleculares”, en los que se emplean componentes dirigidos específicos y adecuados en la formulación de los agentes de contraste, lo cual permite la toma selectiva de las imágenes resaltadas con contraste de los órganos o tejidos. Asimismo, también se ha descrito el uso terapéutico de las formulaciones de agentes de contraste, de un modo opcional, en combinación con los estudios por imágenes moleculares.

- 15 Una clase de agentes de contraste particularmente útil para los estudios por imágenes con ultrasonido incluye las suspensiones de burbujas nanométricas y/o micrométricas de gas, dispersas en un medio acuoso. Resultan de particular interés aquellas formulaciones en las que las burbujas de gas están estabilizadas, por ejemplo usando emulsionantes, aceites, espesantes o azúcares, o atrapando o encapsulando el gas o un precursor del mismo en una variedad de sistemas. Estas burbujas de gas estabilizadas son conocidas en la técnica por diversos términos, dependiendo típicamente del material estabilizante empleado para su preparación; estos términos incluyen, por ejemplo, “microesferas”, “microburbujas”, “microcápsulas” o “microglobos”. La frase “microvesículas llenas de gas” o para abreviar “microvesículas”, según se utiliza en la presente memoria, incluye cualquiera de los términos antes citados.

- 25 Las formulaciones de microvesículas llenas de gas pueden modificarse convenientemente, ya sea para mejorar el efecto del diagnóstico (por ejemplo, mediante estudios por imágenes moleculares) y/o con fines terapéuticos, tales como el suministro de un fármaco y/o la trombólisis. Por ejemplo, las microvesículas pueden asociarse (por ejemplo, por inclusión en su envuelta límite) con agentes terapéuticos y/o con componentes específicos, que son capaces de unirse a un objetivo determinado dentro del cuerpo del paciente (lo que se conoce como “ligandos direccionadores”). Los ejemplos de ligandos direccionadores incluyen, por ejemplo, péptidos, proteínas, anticuerpos, aptámeros o carbohidratos capaces de unirse a receptores específicos, expresados por los órganos o tejidos durante los procesos patogénicos, tales como, por ejemplo, angiogénesis, inflamación o formación de trombos.

- 30 Las selectinas (en particular, la P-, L- y E-selectina) son moléculas de adhesión celular expresadas, entre otras cosas, por el endotelio vascular durante los procesos de inflamación. Los ligandos de la selectina y, en particular, el ligando 1 de la glicoproteína de la P-selectina (PSGL-1, *P-selectin glycoprotein ligand-1*: número de entrada del GenBank Q14242.1), se expresan constitutivamente en todos los leucocitos (neutrófilos, monocitos y en la mayoría de los linfocitos) y en las células mieloides. En tal sentido, desempeñan una función crítica en la ligazón de estas células a las plaquetas activadas o a los endotelios que expresan la P-selectina y, aunque con menor actividad, a la E y L-selectina. Los ejemplos de ligandos de P-selectina se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. con el número 5.840.679.

- 40 La publicación de solicitud de patente internacional con el número WO 2008/131217 describe composiciones de microburbujas que comprenden ligandos direccionadores dirigidos a la P-selectina. En particular, el ligando direccionador es una proteína de fusión que comprende un ligando de P-selectina y un dominio de dimerización. En las realizaciones prácticas, la solicitud describe el uso del ligando de P-selectina recombinante compuesto por la región amino terminal de PSGL-1, en una glicofoma de unión a la selectina fusionada a la porción del Fc de la IgG₁ humana (rPSGL-Ig), a conjugar mediante una unión de biotina-estreptavidina a las microburbujas que contienen biotina. Si bien dicha solicitud no describe ninguna secuencia exacta del ligando de P-Selectina, se refiere a ejemplos de ligandos de P-selectina y fragmentos de los mismos, descritos por la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. con el número 2003/0166521.

- 45 La patente de los EE. UU. con el número 2003/0166521 describe una proteína de fusión de PSGL-1 (dimPSGL-1), también denominada PSGL-Ig recombinante (o rPSGL-Ig), que se produce truncando los 47 aminoácidos del término N del PSGL-1 maduro y uniendo estos 47 aminoácidos del término N del PSGL-1 a una porción del Fc de la inmunoglobulina G-1 (IgG₁) humana. J. J. Rychak y colaboradores, “Selectin ligands promote ultrasound contrast agent adhesion under shear flow”, *Molecular Pharmaceutics*, 3(5) 2006, pp. 516-524, describen microburbujas asociadas con los ligandos de la P-selectina a través de la unión biotina-estreptavidina.

El solicitante ha observado ahora que las microvesículas que solo llevan un fragmento de dicha proteína rPSGL-1 pueden tener ciertas ventajas, en comparación con las microvesículas que llevan la proteína completa, por ejemplo, a nivel de su eficacia de unión y/o de la estabilidad de una suspensión acuosa que contiene las microvesículas.

Compendio de la invención

- 5 Un aspecto de la invención se refiere a una suspensión acuosa de microvesículas llenas de gas, asociadas con un polipéptido que consiste en una secuencia de 200 residuos de aminoácidos como máximo y que comprende al menos los aminoácidos 5-16, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1, según las reivindicaciones.

Dicho polipéptido está asociado con un componente de la microvesícula mediante una unión covalente.

- 10 Con preferencia, dicho polipéptido comprende al menos los aminoácidos 1-19, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1, con mayor preferencia, al menos los aminoácidos 5-41, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1 e, incluso con mayor preferencia, al menos los aminoácidos 1-47, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1.

Según una realización preferida, dicho polipéptido comprende 100 residuos de aminoácidos como máximo; con mayor preferencia, 75 residuos de aminoácidos como máximo.

Según una realización preferida, dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la fórmula (I):

- 15 $(X^A)_n - Y - (X^B)_m$ (I)

en donde:

$(X^A)_n$ representa una secuencia de n aminoácidos X^A , que comprende al menos los aminoácidos 5-16, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1, donde:

n es un número entero variable entre 12 y 199; y

- 20 X^A representa cualquier aminoácido, con excepción de lisina;

$(X^B)_m$ representa una secuencia de m aminoácidos X^B , donde;

m es un número entero variable entre 0 y 10, con la condición de que la suma de m+n sea como máximo de 199; y

X^B representa cualquier aminoácido con excepción de lisina y cisteína; e

- 25 Y representa un aminoácido que comprende un resto reactivo para asociar el polipéptido con un componente de la microvesícula.

Con preferencia, el resto reactivo del residuo Y es $-NH_2$ o $-SH$; con mayor preferencia Y es lisina o cisteína, incluso con mayor preferencia, lisina.

Según otra realización preferida, dicho polipéptido está representado por una secuencia de la fórmula (II):

$$(X^1)_p - [(C-(X^2)_a)_q] - [(C-(X^3)_b)_r] - Y - (X^4)_s \quad (II)$$

- 30 en donde:

C representa cisteína;

Y representa lisina o cisteína, con preferencia, lisina;

- 35 $(X^1)_p$ representa una secuencia de p aminoácidos X^1 , que comprende al menos los aminoácidos 5-16, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1, $(X^2)_a$ representa una secuencia de a aminoácidos X^2 , $(X^3)_b$ representa una secuencia de b aminoácidos X^3 , $(X^4)_s$ representa una secuencia de s aminoácidos X^4 , donde:

X^1 , X^2 , X^3 , X^4 representan independientemente cualquier aminoácido, con excepción de lisina y cisteína;

p es un número entero variable entre 12 y 199, con preferencia, de 12 a 99, con mayor preferencia, de 12 a 74;

a y b son independientemente un número entero variable entre 0 y 50, con preferencia, entre 0 y 20 y, con mayor preferencia, entre 0 y 10;

- 40 q y r son independientemente 0 o 1; al menos uno de ellos es 1; y

s es un número entero variable entre 0 y 10;

con la condición de que la suma de $p+(a \cdot q)+(b \cdot r)+s$ sea de 199 como máximo, con preferencia, de 99 como máximo e incluso con mayor preferencia, de 74.

Con preferencia, los polipéptidos que se han ilustrado anteriormente comprenden al menos un resto de O-glicano y/o al menos un residuo de sulfato unido a un aminoácido de la secuencia.

- 5 El polipéptido ilustrado con anterioridad está en forma dimérica, con preferencia, en forma homodimérica.

Según una realización particularmente preferida, dicho polipéptido consiste en una secuencia como se establece en la ID. DE SEC. NO. 3. Los dos residuos de cisteína de la secuencia pueden unirse a los respectivos residuos de cisteína de una secuencia correspondiente, para proveer el polipéptido en forma dimérica.

- 10 La invención se refiere, asimismo, a precursores de dichas microvesículas llenas de gas, en forma de un polvo seco o residuo liofilizado. El citado precursor es particularmente reconstituible en presencia de un gas, al ponerlo en contacto con un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable, para formar una suspensión acuosa de dichas microvesículas llenas de gas cuando se agita la mezcla.

Otro aspecto de la invención se refiere a un *kit* farmacéutico, que comprende un precursor de dichas microvesículas llenas de gas y un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable.

- 15 Descripción detallada de la invención

- La frase "microvesículas llenas de gas" incluye cualquier estructura que comprenda burbujas de gas de un tamaño micrométrico o nanométrico, rodeadas por una envuelta o capa (incluidas las capas formadoras de películas) de un material estabilizador. La frase incluye lo que se conoce en la técnica como liposomas llenos de gas, microburbujas, microesferas, microglobos o microcápsulas. Las microvesículas normalmente se encuentran suspendidas en un
- 20 vehículo acuoso, en particular, un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable. El material estabilizante puede ser cualquier material típicamente conocido en la técnica, que incluya, por ejemplo, tensioactivos, lípidos, esfingolípidos, oligolípidos, fosfolípidos, proteínas, polipéptidos, carbohidratos y materiales poliméricos naturales o sintéticos.

- El término "microburbujas" incluye burbujas de gas suspendidas en un vehículo acuoso, que se unen en la interfaz gas/líquido mediante una envuelta (película) muy delgada, que implica un material estabilizador anfifílico, dispuesto en la interfaz gas a líquido (a veces denominado en la técnica envuelta "evanescente"). Las suspensiones de microburbujas pueden prepararse poniendo en contacto un precursor adecuado de ellas, tales como los materiales anfifílicos en polvo (por ejemplo, liposomas liofilizados preformados o dispersiones o soluciones de fosfolípidos liofilizados o secadas por aspersión) con aire u otro gas y luego con un vehículo acuoso, mientras se agita para
- 25 generar una suspensión de microburbujas que luego se puede administrar, con preferencia, poco después de su preparación. Los ejemplos de suspensiones acuosas de microburbujas de gas, de precursores y de la preparación de los mismos se describen, por ejemplo, en el documento de patente de los EE. UU. con el número 5.271.928, en el documento de patente de los EE. UU. con el número 5.445.813, en el documento de patente de los EE. UU. con el número 5.413.774, en los documentos de patente de los EE. UU. con el número 5.556.610 y con el número 5.597.549, en el documento de patente de los EE. UU. con el número 5.827.504 y en el documento de patente con el número WO 04/069284.
- 30
- 35

Los términos "microglobos" o "microcápsulas" incluyen suspensiones en las que las burbujas de gas están rodeadas por una envuelta de material sólido de un lípido o de polímeros naturales o sintéticos. Los ejemplos de microglobos y de su preparación se describen, por ejemplo, en el documento de patente de los EE. UU. con el número US 5.711.933 y en el documento de patente de los EE. UU. con el número 6.333.021.

- 40 El término polipéptido, según se utiliza en la presente memoria, incluye secuencias de aminoácidos, que pueden ser aminoácidos sintéticos o, con preferencia, naturales.

- La expresión "ligando direccionador" incluye cualquier compuesto, resto o residuo que tenga o que sea capaz de promover una actividad direccionadora hacia los tejidos y/o receptores *in vivo*. Los objetivos con los cuales un ligando direccionador puede asociarse incluyen los tejidos tales como, por ejemplo, el tejido del miocardio (incluso las células de miocardio y los cardiomiocitos), los tejidos membranosos (incluso el endotelio y el epitelio), las láminas, el tejido conectivo (incluso el tejido intersticial) o los tumores; los coágulos sanguíneos y los receptores, tales como, por ejemplo, los receptores de la superficie celular para las hormonas de los péptidos, los neurotransmisores, los antígenos, los fragmentos del complemento y las inmunoglobulinas. La expresión incluye, en particular, a los polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que exhiben afinidad de unión
- 45 ("secuencias activas") para las selectinas, particularmente, para la P-selectina; dichas secuencias activas incluyen, por ejemplo, los aminoácidos 5-16, 1-19, 5-41 y 1-47, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1.
- 50

La expresión "microvesícula dirigida llena de gas" incluye cualquier microvesícula llena de gas que comprenda al menos un ligando direccionador en su formulación.

La frase “intermedio de una microvesícula dirigida llena de gas” incluye toda microvesícula llena de gas que se pueda convertir en una microvesícula dirigida llena de gas. Tal intermedio puede incluir, por ejemplo, microvesículas llenas de gas (o sus precursores), incluso un resto reactivo adecuado (por ejemplo, maleimida), que puede hacerse reaccionar con un reactivo complementario correspondiente (por ejemplo, tiol) enlazado a un ligando direccionador.

- 5 La expresión “región Fc” indica el fragmento cristizable de una inmunoglobulina (Ig) compuesta por mitades carboxi-terminales de ambas cadenas pesadas unidas entre sí por enlaces de disulfuro. Los fragmentos Fc son diferentes para cada clase (es decir, IgG, IgM, IgA, etc.) y tipo (IgG₁, IgG₂, etc.) de inmunoglobulina.

- La expresión “dominio Fc de longitud completa” indica un dominio compuesto por dos cadenas pesadas que comprenden dos o tres dominios constantes, dependiendo de la clase de anticuerpo. Al unirse a proteínas específicas, el dominio Fc garantiza que cada anticuerpo genere una respuesta inmunitaria apropiada para un antígeno dado. Este dominio Fc también se une a varios receptores celulares, tales como receptores Fc y otras moléculas inmunes, tales como las proteínas del complemento. Al hacer esto, media los diferentes efectos fisiológicos, incluidas la opsonización, la lisis celular y la desgranulación de los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos. Las secuencias del dominio Fc de longitud completa comprenden ya sea secuencias de aminoácidos no modificadas (originales) o las correspondientes secuencias de aminoácidos en las que uno o más aminoácidos no esenciales han mutado. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos 49 a 272 de la ID. DE. SEC. No. 4 corresponde al dominio Fc de longitud completa de la inmunoglobulina IgG₁, con las dos excepciones de los aminoácidos 59 y 62 (donde los residuos Leu y Gly de la secuencia Fc original han sido reemplazados por residuos Ala).
- 10
- 15

- La expresión “agente terapéutico” incluye en su significado cualquier compuesto, resto o residuo que se pueda usar en cualquier aplicación terapéutica, como por ejemplo, en métodos destinados al tratamiento de una enfermedad en un paciente, así como también, cualquier sustancia que sea capaz de ejercer o que sea responsable de ejercer un efecto biológico *in vitro* y/o *in vivo*. Los agentes terapéuticos incluyen así cualquier compuesto o material capaz de ser usado en el tratamiento (incluso en la prevención, el alivio, el alivio del dolor o la cura) de cualquier estado patológico en un paciente (lo cual incluye una dolencia, tribulación, enfermedad, lesión o daño). Los ejemplos de agentes terapéuticos son fármacos, productos farmacéuticos, agentes bioactivos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, proteínas, péptidos naturales o sintéticos, incluso los oligopéptidos y polipéptidos, vitaminas, esteroides y material genético, incluso los nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos y plásmidos.
- 20
- 25

- La expresión “vehículo acuoso fisiológicamente aceptable” incluye vehículos líquidos que por lo general se emplean para inyecciones, tales como, por ejemplo, agua, normalmente estéril, agua apirógena (para evitar la contaminación en el producto liofilizado con el intermedio tanto como sea posible), soluciones acuosas, tales como solución salina (que ventajosamente puede estar equilibrada de modo que el producto final inyectable no sea hipotónico) o soluciones acuosas de una o más sustancias de ajuste, tales como sales o azúcares, alcoholes de azúcar, glicoles u otros materiales de poliol no iónicos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, glicerol, polietilenglicoles o propilenglicoles).
- 30
- 35

Microvesículas llenas de gas

Según una realización de la presente invención, las microvesículas llenas de gas asociadas con un ligando direccionador como se definió antes son microburbujas.

- Los componentes adecuados para formar una envuelta de microburbujas estabilizadora comprenden, por ejemplo, fosfolípidos; lisofosfolípidos; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico o ácido oleico; lípidos portadores de polímeros, tales como quitina, ácido hialurónico, polivinilpirrolidona o polietilenglicol (PEG), también denominados “lípidos pegilados”; lípidos portadores de mono- di-, oligo- o poli-sacáridos sulfonados; colesterol, sulfato de colesterol o hemisuccinato de colesterol; hemisuccinato de tocoferol; lípidos con ácidos grasos enlazados a éter o éster; lípidos polimerizados; diacetil-fosfato; dicetil-fosfato; ceramidas; ésteres de ácido graso de polioxietileno (tales como estearatos de ácido graso de polioxietileno), alcoholes grasos de polioxietileno, éteres de alcohol graso de polioxietileno, ésteres de ácido graso de sorbitán polioxietilado, polietilenglicol-ricinoleato de glicerol, esteroides de poroto de soja etoxilados, aceite de ricino etoxilado o copolímeros de bloque de óxido de etileno (EO, *ethylene oxide*) y óxido de propileno (PO, *propylene oxide*); ésteres de ácido alifático de esteroles, incluso, butirato de colesterol, isobutirato de colesterol, palmitato de colesterol, estearato de colesterol, acetato de lanosterol, palmitato de ergosterol o n-butirato de fitosterol; esteroles-ésteres de ácidos de azúcar, incluidos los glucurónidos de colesterol, glucurónidos de lanosterol, 7-deshidrocolesterol-glucurónido, glucurónido de ergosterol, gluconato de colesterol, gluconato de lanosterol o gluconato de ergosterol; ésteres y alcoholes de ácidos de azúcar, incluso glucurónido de laurilo, glucurónido de estearoilo, glucurónido de miristoilo, gluconato de laurilo, gluconato de miristoilo o gluconato de estearoilo; ésteres de azúcares, con ácidos alifáticos, incluidos el laurato de sacarosa, el laurato de fructosa, el palmitato de sacarosa, el estearato de sacarosa, el ácido glucurónico, el ácido glucónico o el ácido poliurónico; saponinas, incluso sarsapogenina, esmilagenina, hederagenina, ácido oleanólico o digitoxigenoína; glicerol o ésteres de glicerol, incluso tripalmitato de glicerol, diestearato de glicerol, triestearato de glicerol, dimiristato de glicerol, trimiristato de glicerol, dilaurato de glicerol, trilaurato de glicerol, dipalmitato de
- 40
- 45
- 50
- 55

glicerol; alcoholes de cadena larga, incluidos el alcohol n-decílico, alcohol laurílico, alcohol mirístico, alcohol cetílico o alcohol de n-octadecilo; 6-(5-colesten-3 β -iloxi)-1-tio- β -D-galactopiranosido; digalactosildiglicérico; 6-(5-colesten-3 β -iloxi)hexil-6-amino-6-desoxi-1-tio- β -D-galactopiranosido; 6-(5-colesten-3 β -iloxi)hexil-6-amino-6-desoxil-1-tio- β -D-manopiranosido; ácido 12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanoico; ácido N-[12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanoil]-2-aminopalmitico; N-succinildioleilfosfatidiletanolamina; 1,2-dioleil-*sn*-glicerol; 1,2-dipalmitoil-*sn*-3-succinilglicerol; 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol; 1-hexadecil-2-palmitoilglicerofosfoetanolamina o palmitoilhomocisteína; alquilaminas o sales de alquilamonio, que comprenden al menos una cadena de alquilo (C₁₀-C₂₀), con preferencia (C₁₄-C₁₈), tales como, por ejemplo, N-estearilamina, N,N'-diestearilamina, N-hexadecilamina, N,N'-dihexadecilamina, cloruro de N-estearilamonio, cloruro de N,N'-diestearilamonio, cloruro de N-hexadecilamonio, cloruro de N,N'-dihexadecilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB, *dimethyldioctadecylammonium bromide*), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, *hexadecyltrimethylammonium bromide*); sales de amonio terciario o cuaternario, que comprenden una, o con preferencia dos, cadenas de acilo (C₁₀-C₂₀), con preferencia (C₁₄-C₁₈), unidas al átomo N mediante puentes de alquileo (C₃-C₆), tales como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP, *1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane*), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP), 1,2-oleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (DSDAP, *1,2-distearoyl-3-dimethylammonium-propane*) y mezclas o combinaciones de los mismos.

Dependiendo de la combinación de componentes y del proceso de fabricación de las microburbujas, los compuestos ejemplares antes citados pueden emplearse como el compuesto principal, para formar la envuelta de microburbuja o como simples aditivos, estando presentes así en cantidades menores solamente.

Al menos uno de los compuestos que forman la envuelta de las microburbujas es un compuesto anfílico (es decir, una molécula orgánica que comprende tanto un resto hidrofílico como uno lipofílico), con preferencia un fosfolípido, de un modo opcional, en mezcla con cualquiera de los materiales antes enumerados. Según la presente descripción, el término fosfolípido abarca cualquier compuesto de fosfolípido anfílico, cuyas moléculas son capaces de formar una película estabilizadora del material (por lo general, en forma de una capa mono-molecular) en la interfaz del límite gas-agua en la suspensión final de microburbujas. Por consiguiente, estos materiales también se conocen en la técnica como "fosfolípidos formadores de películas".

Los compuestos de fosfolípidos anfílicos, por lo general, contienen al menos un grupo fosfato y al menos un grupo de hidrocarburos lipofílico de cadena larga, con preferencia, dos grupos.

Los ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen ésteres de glicerol con un residuo de ácidos grasos, o con preferencia dos residuos de ácidos grasos (iguales o diferentes) y con ácido fosfórico, donde el residuo de ácido fosfórico a su vez está unido a un grupo hidrofílico, tales como, por ejemplo, colina (fosfatidilcolinas – PC [*phosphatidylcholines*]), serina (fosfatidilserinas – PS [*phosphatidylserines*]), glicerol (fosfatidilglicerol – PG [*phosphatidylglycerols*]), etanolamina (fosfatidiletanolaminas – PE [*phosphatidylethanolamines*]), inositol (fosfatidilinositol – PI [*phosphatidylinositol*]). A los ésteres de fosfolípidos con solo un residuo de ácido graso normalmente se los denomina en la técnica como las "liso" formas del fosfolípido o "lisofosfolípidos". Los residuos de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos, por lo general, son ácidos alifáticos de cadena larga, que normalmente contienen de 12 a 24 átomos de carbono, con preferencia, de 14 a 22; la cadena alifática puede contener una o más insaturaciones o, con preferencia, está saturada por completo. Los ejemplos de ácidos grasos adecuados incluidos en los fosfolípidos son, por ejemplo, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. Con preferencia, se emplean ácidos grasos saturados, tales como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido araquídico.

Otros ejemplos de fosfolípidos son los ácidos fosfatídicos, es decir, los diésteres de ácido glicerol-fosfórico con ácidos grasos; esfingolípidos, tales como las esfingomielinas, es decir aquellos análogos de fosfatidilcolina en los que el residuo de diéster de glicerol con ácidos grasos se reemplaza por una cadena de ceramida; cardiolipinas, es decir los ésteres de 1,3-difosfatidilglicerol con un ácido graso; glicolípidos, tales como los gangliósidos GM1 (o GM2) o cerebrosidos; glucolípidos; sulfátidos y glicosfingolípidos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término fosfolípidos incluye tanto los productos naturales como los semisintéticos o los preparados sintéticamente, que se pueden emplear solos o en mezcla.

Los ejemplos de fosfolípidos naturales son las lecitinas naturales (derivados de fosfatidilcolina (PC)), tales como, típicamente, las lecitinas del poroto de soja o de la yema del huevo.

Los ejemplos de fosfolípidos semisintéticos son los derivados parcial o totalmente hidrogenados de las lecitinas naturales. Los fosfolípidos preferidos son los di-ésteres de ácido graso de fosfatidilcolina, etilfosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol o de esfingomielina.

Los ejemplos de fosfolípidos preferidos son, por ejemplo [todos ellos por sus siglas en inglés]: dilauril-fosfatidilcolina (DLPC), dimiristil-fosfatidilcolina (DMPC), dipalmitil-fosfatidilcolina (DPPC), diaraquidil-fosfatidilcolina (DAPC), diestearil-fosfatidilcolina (DSPC), dioleil-fosfatidilcolina (DOPC), 1,2 Diestearoil-*sn*-glicero-3-Etilfosfocolina (Etil-

DSPC), dipentadecanoil-fosfatidilcolina (DPDPC), 1-miristoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoil-fosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-stearoil-fosfatidilcolina (SPSC), 1-estearoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (SPPC), 1-palmitoil-2-oleilfosfatidilcolina (POPC), 1-oleil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (OPPC), dilauroil-fosfatidilglicerol (DLPG) y sus sales de metales alcalinos, diaraquidoilfosfatidil-glicerol (DAPG) y sus sales de metales alcalinos, dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y sus sales de metales alcalinos, diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y sus sales de metales alcalinos, dioleil-fosfatidilglicerol (DOPG) y sus sales de metales alcalinos, ácido fosfatídico de dimiristoil (DMPA) y sus sales de metales alcalinos, ácido fosfatídico de dipalmitoil (DPPA) y sus sales de metales alcalinos, ácido fosfatídico de diestearoil (DSPA), ácido diaraquidoilfosfatídico (DAPA) y sus sales de metales alcalinos, dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoil- fosfatidil-etanolamina (DSPE), dioleilfosfatidil-etanolamina (DOPE), diararaquidoilfosfatidiletanolamina (DAPE), dilinoleilfosfatidiletanolamina (DLPE), dimiristoil-fosfatidilserina (DMPS), diararaquidoil-fosfatidilserina (DAPS), dipalmitoil-fosfatidilserina (DPPS), diestearoilfosfatidilserina (DSPS), dioleilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoil- esfingomielina (DPSP) y diestearoilesfingomielina (DSSP), dilauroil-fosfatidilinositol (DLPI), diararaquidoilfosfatidilinositol (DAPI), dimiristoilfosfatidilinositol (DMPI), dipalmitoilfosfatidilinositol (DPPI), diestearoilfosfatidilinositol (DSPI), dioleil-fosfatidilinositol (DOPI).

Los fosfolípidos adecuados incluyen los fosfolípidos modificados enlazando un polímero hidrofílico, tal como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG), a ellos. Los fosfolípidos modificados con polímeros preferidos incluyen "fosfolípidos pegilados", es decir fosfolípidos unidos a un polímero de PEG. Los ejemplos de fosfolípidos pegilados son las fosfatidiletanolaminas pegiladas ("PE-PEGs", para resumir) es decir fosfatidiletanolaminas en las que el resto de etanolamina hidrofílica está enlazado a una molécula PEG de peso molecular variable (por ejemplo, de 300 a 20000 daltons, con preferencia de 500 a 5000 daltons), tales como DPPE-PEG (o DSPE-PEG, DMPE-PEG, DAPE-PEG o DOPE-PEG) [todos ellos por sus siglas en inglés]. Por ejemplo, DPPE-PEG2000 se refiere a DPPE que tiene unido a sí un polímero PEG que tiene una media de peso molecular promedio de aproximadamente 2000.

Los fosfolípidos particularmente preferidos son DAPC, DSPC, DSPG, DPPA, DSPA, DMPS, DPPS, DSPS y etil-DSPC. Los que resultan más predilectos de todos son DSPG o DSPC.

También es posible usar mezclas de fosfolípidos, tales como, por ejemplo, mezclas de DSPE, DPPE, DPPC, DSPC y/o DAPC con DSPS, DPPS, DSPA, DPPA, DSPG, DPPG, Etil-DSPC y/o Etil-DPPC.

En realizaciones preferidas, el fosfolípido es el principal componente de la envuelta estabilizadora de las microburbujas, que alcanza un porcentaje de al menos 50 % (p/p) de la cantidad total de componentes que forman la envuelta de las microburbujas llenas de gas. En algunas de las realizaciones preferidas, sustancialmente la totalidad de la envuelta (es decir, al menos 80 % y hasta 100 % en peso) puede estar formada por fosfolípidos.

Los fosfolípidos pueden usarse, convenientemente en una mezcla con cualquiera de los compuestos antes citados. Así, por ejemplo, es posible añadir opcionalmente sustancias tales como colesterol, ergosterol, fitoesterol, sitoesterol, lanoesterol, tocoferol, galato de propilo o palmitato de ascorbilo, ácidos grasos tales como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico y sus derivados o hidroxitolueno butilado y/u otros compuestos que no sean fosfolípidos a uno o más de los fosfolípidos que anteceden, en proporciones que varían del cero al 50 % en peso, con preferencia, hasta el 25 %. Particularmente preferidos son los compuestos anfífilos, tales como los ácidos carboxílicos C₁₀-C₂₀, con preferencia, el ácido palmítico.

Según una realización preferida, la envuelta de microburbujas según la invención incluye un compuesto que porta una carga neta general (positiva o negativa). Tal compuesto puede ser un material anfílico cargado, con preferencia, un lípido o un fosfolípido.

Los ejemplos de fosfolípidos que portan una carga general negativa son derivados —en particular derivados de diéster de ácido graso— de fosfatidilserina, tales como DMPS, DPPS, DSPS; de ácido fosfatídico, tales como DMPA, DPPA, DSPA; de fosfatidilglicerol, tales como DMPG, DPPG y DSPG o de fosfatidilinositol, tales como DMPI, DPPI o DPPI. También los fosfolípidos modificados, en particular fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, tales como DPPE-PEG o DSPE-PEG, pueden usarse como moléculas cargadas negativamente. También puede usarse ventajosamente la lisoforma de los fosfolípidos antes citados, tales como derivados de lisofosfatidilserina (por ejemplo, liso-DMPS, -DPPS o -DSPS), derivados de ácido lisofosfatídico (por ejemplo liso-DMPA, -DPPA o -DSPA) y derivados de lisofosfatidilglicerol (por ejemplo, liso-DMPG, -DPPG o -DSPG), como compuestos cargados negativamente. Otros ejemplos de compuestos cargados negativamente son las sales del ácido biliar, tales como las sales de ácido cólico, las sales de desoxicólico o las sales de ácido glicocólico; y las sales de ácido graso (C₁₂-C₂₄), con preferencia (C₁₄-C₂₂), tales como, por ejemplo, sales de ácido palmítico, sales de ácido esteárico, sales de 1,2-dipalmitoil-*sn*-3-succinilglicerol o sales de 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol.

Con preferencia, el compuesto cargado negativamente se selecciona entre DPPA, DPPS, DSPG, DPPG, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG5000 o mezclas de ellos.

El componente con carga negativa típicamente está asociado con un contraión correspondiente de carga positiva,

que puede ser mono- (por ejemplo, un metal alcalino o amonio), di- (por ejemplo, un metal alcalinotérreo) o tri-valente (por ejemplo, aluminio). Con preferencia, el contraión se selecciona entre cationes de metales alcalinos, tales como Na^+ o K^+ , con mayor preferencia Na^+ .

Los ejemplos de fosfolípidos que llevan una carga general positiva son derivados de etilfosfatidilcolina, en particular di-ésteres de etilfosfatidilcolina con ácidos grasos, tales como 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocolina (Etil-DSPC o DSEPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocolina (Etil-DPPC o DPEPC). El contraión negativo es, con preferencia, un ion haluro, en particular, un ion cloruro o bromuro. Los ejemplos de compuestos cargados positivamente que se pueden incorporar en la envuelta de microburbujas son sales de mono-, di-, tri- o tetra-alquilamonio, con un contraión de haluro (por ejemplo, cloruro o bromuro) que comprende al menos una cadena de alquilo ($\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$), con preferencia, ($\text{C}_{14}\text{-C}_{18}$), tales como, por ejemplo cloruro de mono- o di-estearilamonio, cloruro de mono o di-hexadecilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) [todos ellos por sus siglas en inglés]. Otros ejemplos de compuestos cargados positivamente que se pueden incorporar en la envuelta de microburbujas son las sales de amonio terciario o cuaternario, con un contraión haluro (por ejemplo, cloruro o bromuro) que comprende una o con preferencia dos cadenas de acilo ($\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$), con preferencia, ($\text{C}_{14}\text{-C}_{18}$), unidas al átomo de N mediante un puente de alquileo ($\text{C}_3\text{-C}_6$), tales como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP), 1,2-oleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) o 1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (DSDAP).

Con preferencia, se emplean DSEPC, DPEPC y/o DSTAP como compuestos cargados positivamente en la envuelta de las microburbujas.

El componente cargado positivamente normalmente se asocia con un correspondiente contraión negativo, que puede ser mono- (por ejemplo, haluro), di- (por ejemplo, sulfato) o tri-valente (por ejemplo, fosfato). Con preferencia, el contraión se selecciona entre los iones haluro, tales como F^- (flúor), Cl^- (cloro) o Br^- (bromo).

Pueden emplearse satisfactoriamente las mezclas de compuestos neutros y cargados, en particular, de fosfolípidos y/o lípidos, para formar la envuelta de las microburbujas. La cantidad de lípido o fosfolípido cargado puede variar desde aproximadamente 95 mol % hasta alrededor de 0,1 mol %, con respecto a la cantidad total de lípido y fosfolípido, con preferencia, de 80 % en mol a 0,5 % en mol.

Las mezclas de fosfolípidos neutros y lípidos o fosfolípidos cargados son, por ejemplo, DPPG/DSPC, DSTAP/DAPC, DPPS/DSPC, DPPS/DAPC, DPPE/DPPG, DSPA/DAPC, DSPA/DSPC y DSPG/DSPC.

Cualquiera de los componentes ilustrados con anterioridad que son útiles para formar la envuelta estabilizadora de las microvesícula llena de gas, en particular, los fosfolípidos, con preferencia fosfolípidos pegilados, pueden modificarse insertando allí un resto reactivo adecuado, para permitir la unión de compuestos adecuados, tales como un ligando direccionador que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en la ID. DE SEC. NO. 1. Por ejemplo, un fosfolípido pegilado (por ejemplo, DSPE-PEG2000) puede comprender un resto reactivo terminal (por ejemplo maleimida, para resumir, "mal", formando así un componente DSPE-PEG-mal) capaz de reaccionar (covalentemente) con un correspondiente resto reactivo en un compuesto que comprende la secuencia anterior. Los ejemplos de restos reactivos adecuados adicionales se ilustran en lo que sigue de la presente memoria.

Según una realización alternativa, el componente del ligando direccionador puede asociarse con unas microcápsulas llenas de gas. Los ejemplos preferidos de microcápsulas son los que tienen una envuelta estabilizadora que comprende un polímero, con preferencia, un polímero biodegradable o un lípido biodegradable insoluble en agua (tales como tripalmitina), de un modo opcional en mezcla con un polímero biodegradable. Los ejemplos de microcápsulas adecuadas y de su preparación se describen, por ejemplo, en los documentos de patente de los EE. UU. con los números 5.711.933 y 6.333.021. También es posible emplear las microcápsulas que tienen una envuelta proteinácea, es decir, fabricada con proteínas naturales (albúmina, hemoglobina), tales como las que se describen en el documento de patente de los EE. UU. con el número US-A-4.276.885 o en el documento de patente europea con el número EP-A-0 324 938. El ligando direccionador puede incorporarse en las microcápsulas, por ejemplo, uniéndolo a un componente formador de envueltas de las microcápsulas, según los métodos de preparación antes ilustrados o incorporándolo en la mezcla de componentes que forman la envuelta de las microcápsulas un componente anfífilico, como se ha ilustrado previamente, covalentemente unido al ligando direccionador.

Puede haber otros excipientes o aditivos presentes, ya sea en la formulación seca de las microvesículas o añadidos junto con el vehículo acuoso usado para su reconstitución, sin que participe necesariamente (que solo participe parcialmente) en la formación de la envuelta estabilizadora de las microvesículas. Estos incluyen reguladores de pH, (tales como histidina), reguladores de osmolalidad, potenciadores de viscosidad, emulsionantes, agentes para conferir volumen, etc. y se pueden usar en las cantidades convencionales. Por ejemplo, se pueden usar los compuestos como polioxipropilenglicol y polioxietilenglicol, así como los copolímeros de los mismos. Los ejemplos de mejoradores de la viscosidad o estabilizadores son compuestos seleccionados de poli- y oligo-sacáridos lineales y entrecruzados, azúcares y polímeros hidrofílicos, tales como polietilenglicol.

Dado que la preparación de microvesículas llenas de gas puede implicar un paso de liofilización o secado por

pulverización, puede ser ventajoso incluir en la formulación un aditivo de liofilización, tales como un agente con efecto crioprotector y/o lioprotector y/o un agente para conferir volumen, por ejemplo, un aminoácido, tales como glicina; un carbohidrato, por ejemplo un azúcar, tales como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa, glucosa, lactosa o un ciclodextrina o un polisacárido, tales como dextrano; o un polioxialquilenglicol, tales como polietilenglicol.

5 Típicamente, la cantidad de aditivo de liofilización puede variar entre aproximadamente 10 y alrededor de 1000 veces (p/p) la cantidad de los componentes formadores de microvesículas.

Es posible emplear cualquier gas biocompatible, precursor de gas o mezcla de ellos para llenar las microvesículas mencionadas con anterioridad (en adelante, también identificado como "gas formador de la microvesícula").

10 El gas puede comprender, por ejemplo, aire; nitrógeno; oxígeno; dióxido de carbono; hidrógeno; óxido nítrico; un gas noble o inerte, tales como helio, argón, xenón o criptón; un gas radioactivo, tales como Xe^{133} o Kr^{81} ; un gas noble hiperpolarizado, tales como helio hiperpolarizado, xenón hiperpolarizado o neón hiperpolarizado; un hidrocarburo de bajo peso molecular (por ejemplo, que contenga hasta 7 átomos de carbono), por ejemplo, un alcano, tales como metano, etano, propano, butano, isobutano, pentano o isopentano, un cicloalcano, tales como ciclobutano o ciclopentano, un alqueno, tales como propeno, buteno o isobuteno, o un alquino, tales como acetileno;

15 un éter; una cetona; un éster; gases halogenados, con preferencia, gases fluorados, tales como hidrocarburos de bajo peso molecular halogenados, fluorados o perfluorados (por ejemplo, que contengan hasta 7 átomos de carbono); o una mezcla de cualquiera de los que anteceden. Cuando se usa un hidrocarburo halogenado, con preferencia a al menos algunos, con mayor preferencia, todos los átomos halogenados en dicho compuesto son átomos fluorados.

20 Se prefieren los gases fluorados, en particular los gases perfluorados, en especial, en el campo de los estudios por imágenes con ultrasonido. Los gases fluorados incluyen materiales que contienen al menos un átomo de flúor, tales como, por ejemplo hidrocarburos fluorados (compuestos orgánicos que contienen uno o más átomos de carbono y flúor); hexafluoruro de azufre; cetonas fluoradas, con preferencia, perfluoradas, tales como perfluoroacetona y éteres fluorados, con preferencia, perfluorados, tales como perfluorodietil-éter. Los compuestos preferidos son gases

25 perfluorados, tales como SF_6 o perfluorocarbonos (hidrocarburos perfluorados), es decir hidrocarburos en los que todos los átomos de hidrógeno se reemplazan con átomos de flúor, que según se sabe, forman suspensiones de microburbujas particularmente estables, como se describe, por ejemplo, en el documento de patente europea con el número EP 0554 213. El término perfluorocarbono incluye los perfluorocarbonos saturados, insaturados y cíclicos. Los ejemplos de perfluorocarbonos biocompatibles y fisiológicamente aceptable son los siguientes: perfluoroalcanos,

30 tales como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropanos, perfluorobutanos (por ejemplo, perfluoro-n-butano, de un modo opcional, en mezcla con otros isómeros, tales como perfluoro-isobutano), perfluoropentanos, perfluorohexanos o perfluoroheptanos; perfluoroalquenos, tales como perfluoropropeno, perfluorobutenos (por ejemplo, perfluorobut-2-eno) o perfluorobutadieno; perfluoroalquinos (por ejemplo perfluorobut-2-ino); y perfluorocicloalcanos (por ejemplo, perfluorociclobutano, perfluorometilciclobutano, perfluorodimetilciclobutanos,

35 perfluorotrimetilciclobutanos, perfluorociclopentano, perfluorometilciclopentano, perfluorodimetilciclopentanos, perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano y perfluorocicloheptano). Los perfluorocarbonos saturados preferidos incluyen, por ejemplo, CF_4 , C_2F_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} , C_5F_{12} y C_6F_{14} .

También puede ser ventajoso usar una mezcla de cualquiera de los gases anteriores en cualquier proporción. Por ejemplo, la mezcla puede comprender un gas convencional, tales como nitrógeno, aire o dióxido de carbono y un

40 gas que forme una suspensión estable de microburbujas, tales como hexafluoruro de azufre o un perfluorocarbono, como se indicó con anterioridad. Los ejemplos de mezclas de gases adecuados pueden encontrarse, por ejemplo, en el documento de patente con el número WO 94/09829.

Se prefieren particularmente las siguientes combinaciones: una mezcla de gases (A) y (B) en la que el gas (B) sea gas fluorado, seleccionado entre los que se han ilustrado con anterioridad, incluidas las mezclas de los mismos, y

45 (A) se selecciona entre aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono o mezclas de los mismos. La cantidad de gas (B) puede representar entre aproximadamente 0,5 % y alrededor de 95 % v/v de la mezcla total, con preferencia, entre aproximadamente 5 % y 80 %.

Los gases particularmente preferidos son SF_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} o mezclas de los mismos, opcionalmente en mezcla con aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono o mezclas de los mismos.

50 En ciertas circunstancias, puede ser conveniente incluirle un precursor a una sustancia gaseosa (es decir, un material que sea capaz de convertirse en un gas *in vivo*). Con preferencia, el precursor gaseoso y el gas derivado de él son fisiológicamente aceptables. El precursor gaseoso puede activarse por el pH, por la luz, por la temperatura, etc. Por ejemplo, ciertos perfluorocarbonos pueden usarse como precursores gaseosos activados por temperatura. Estos perfluorocarbonos, tales como, perfluoropentano o perfluorohexano, tienen una temperatura de transición de

55 líquido/gas superior a la temperatura ambiente (o la temperatura a la cual se producen y/o se almacenan los agentes) aunque inferior a la temperatura corporal; así, se someten a una transición de fase de líquido/gas y se convierten en un gas dentro del cuerpo humano.

Para usar en la RMN, las microvesículas con preferencia contienen un gas noble hiperpolarizado tales como neón hiperpolarizado, helio hiperpolarizado, xenón hiperpolarizado o mezclas de los mismos, de un modo opcional, en mezcla con aire, dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno, helio, xenón o cualquiera de los hidrocarburos halogenados según se han definido con anterioridad.

- 5 Para usar en centellogramas, la microvesícula con preferencia contendrá gases radioactivos, tales como Xe^{133} o Kr^{81} o mezclas de los mismos, de un modo opcional, en mezcla con aire, dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno, helio, criptón o cualquiera de los hidrocarburos halogenados según se describieron anteriormente.

Ligando direccionador

- 10 El polipéptido asociado con una microvesícula según la presente invención se encuentra en forma dimérica y comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1, que exhibe afinidad de unión para las selectinas, particularmente, para la P-selectina. Dicho polipéptido comprende al menos los aminoácidos 5-16 de la ID. DE SEC. NO. 1, correspondientes a los aminoácidos 46-57 del "ligando 1 de la glicoproteína de la P-selectina" (PSGL-1, N.º de entrada del GenBank Q14242.1). Según una realización preferida, el ligando direccionador comprende al menos los aminoácidos 1-19, con mayor preferencia, al menos los aminoácidos 5-41 e incluso con mayor preferencia, al menos los aminoácidos 1-47, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1 (estas letras corresponden a los aminoácidos 42-88 del "ligando 1 de la glicoproteína de la P-selectina").

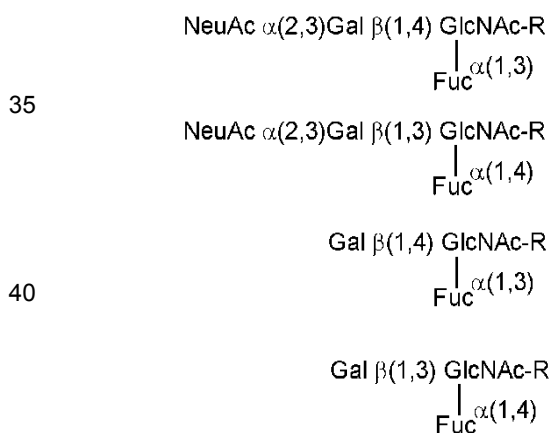
El "ligando 1 de la glicoproteína de la P-selectina" y los polipéptidos que comprenden las secuencias activas ilustradas anteriormente, que incluyen la ID. DE SEC. NO. 1, con preferencia comprenden un residuo de glicano unido por lo menos a un aminoácido de dichas secuencias.

- 20 La frase "residuo de glicano" comprende residuos de glicano unidos al O (unidos al átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo de los residuos de aminoácidos tales como serina, treonina, tirosina, hidroxitirosina o hidroxiprolina) y los residuos de glicano unidos a N (unidos al átomo de nitrógeno de los grupos amino terciarios de aminoácidos, tales como asparagina).

- 25 Los glicanos unidos al O por lo general comprenden residuos de azúcar, tales como N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa, glucosa, manosa (Man), hexosa, xilosa, ácido siálico o mezclas de los mismos. Los glicanos unidos al O con preferencia consisten en una estructura de sialilo Lewis x (sLe^x , ácido siálico-galactopiranosil-fucosa-N-acetilglucosamina).

- 30 Los glicanos unidos a N, por lo general, comprenden un centro pentasacárido (Man₃GlcNAc₂). Las cadenas de tipo complejas pueden presentar estructuras mono-, bi-, tri- (2,4 y 2,6 ramificadas), tetra- y penta-antenarias. Asimismo, pueden comprender varios sacáridos tales como, galactosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y combinaciones de los mismos.

El polipéptido asociado con una microvesícula de la presente invención, con preferencia, contiene uno o más de los siguientes glicanos (o mezclas de los mismos) unidos a un aminoácido de la secuencia:



en donde:

- 45 R es una unión o bien, representa cualquier otro glicano como se definió anteriormente; NeuAc es ácido neuramínico; Gal es galactosa; GlcNAc es N-acetilglucosamina y Fuc es fucosa.

Los residuos de aminoácidos de la ID. DE SEC. NO. 1 que de un modo opcional pueden llevar un residuo de glicano según se ha definido con anterioridad comprenden: (a) los aminoácidos en las posiciones 16, 25, 26, 28, 29, 32, 36, 39, 40 o 41, con preferencia que lleven residuos de glicano unidos al O; y/o (b) un aminoácido en la posición 24 con

preferencia, que lleve residuos de glicano unidos a N.

Ventajosamente, la ID. DE SEC. NO. 1 puede comprender un sialil-Lewis-x (sLe^x) unido a treonina en la posición 16 (véase, por ejemplo, R.D Cumming, "Structure and function of selectin ligand PSGL-1", *Braz. J. Biol. Res.*, 32(5) 1999, pp. 520-528).

- 5 Por otro lado, al menos un residuo de tirosina en la posición 5, 7 y/o 10 de la ID. DE SEC. NO. 1 de un modo opcional, puede estar sulfatado (TyrSO₃). Con mayor preferencia, al menos dos e incluso con mayor preferencia, los tres residuos de tirosina pueden contener un grupo sulfato.

10 El polipéptido es una secuencia de aminoácidos de 12 a 200, con mayor preferencia, de 12 a 100, residuos de aminoácidos de longitud y puede comprender un resto reactivo capaz de reaccionar con un resto reactivo correspondiente de un componente de la microvesícula. Se prefiere en particular una secuencia de aminoácidos de 12 a 75 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia, de 12 a 50 residuos.

15 Según una realización preferida, el polipéptido comprende un aminoácido que lleva un resto reactivo. Dicho aminoácido se selecciona, con preferencia, del grupo que consiste en lo siguiente: cisteína y/o un aminoácido básico, con preferencia, lisina. Con preferencia, dicho resto reactivo está en la posición C terminal del polipéptido; con preferencia, es lisina. En una realización preferida, la presencia de un solo resto reactivo (lisina, en particular) en el término C de la secuencia polipeptídica permite una funcionalización controlada de dicho grupo y la posterior condición de reacción eficaz con un correspondiente grupo reactivo en un componente de la microvesícula. Por otra parte, la presencia de varios grupos reactivos de lisina en una cadena peptídica (como es el caso de la porción Fc de la ID. DE SEC. NO. 4) puede hacer que la funcionalización de dichos grupos sea mucho más aleatoria, con el resultado de tener un control mucho menor sobre cuál entre los diversos grupos reactivos se unirá el péptido al componente de las microvesículas.

Los polipéptidos preferidos son los representados por la fórmula (I) y, con mayor preferencia, la fórmula (II), según se ha ilustrado previamente.

25 En una realización preferida, el polipéptido comprende los aminoácidos de la ID. DE SEC. NO. 1 enlazados a la secuencia de aminoácidos ID. DE SEC. NO. 2 o a un fragmento con terminal N de la misma, donde dicho fragmento corresponde a los aminoácidos 1-20, 1-15, 1-10, 1-5 o 1-4 de la ID. DE SEC. NO. 2.

Cuando el fragmento con terminal N es un solo residuo de aminoácido, dicho aminoácido es, con preferencia, una prolina (Pro).

30 Una realización particularmente preferida está representada por el polipéptido de fusión que tiene la ID. DE SEC. NO. 3 y que consiste en la ID. DE SEC. NO. 1 unida covalentemente a la ID. DE SEC. NO. 2.

35 El polipéptido de fusión se puede obtener por proteólisis enzimática de rPSGL-Ig, por ejemplo, incubando la proteína en presencia de una endoproteinasa adecuada. En una realización preferida, se usa una endoproteasa que escinde uniones de peptidilo en el lado del término C de los residuos de Lisina (por ejemplo, endoproteinasa Lys-C). La incubación de la proteína con endoproteinasa Lys-C permite, en particular, la eliminación de una porción sustancial del dominio Fc de la proteína rPSGL-Ig madura, proveyendo una secuencia dimerica que contiene un solo residuo de Lisina (término C) (aminoácido en la posición 71 en la ID. DE SEC. NO. 3 y en la ID. DE SEC. NO. 4) para cada secuencia del dímero, lo cual puede emplearse ventajosamente para el posterior procedimiento de unión del polipéptido a un componente adecuado de la microvesícula.

40 Alternativamente, el polipéptido puede obtenerse mediante la producción de la proteína recombinante de un ADN hecho a medida. En pocas palabras, se prepara un plásmido insertando la secuencia de ADNc del polipéptido deseado en un vector del plásmido. El vector del plásmido luego se asocia con un sistema de expresión adecuado, para producir el polipéptido recombinante (por ejemplo, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 3). Los ejemplos de sistemas de expresión adecuados incluyen las células de mamíferos, tales como las células de CHO (*Chinese Hamster Ovary*, ovario de hámster chino), las células de HEK293 (*Human Embryonic Kidney* 293, riñón embrionario humano 293), las células Sp2/0 (línea celular del mieloma de ratón), las células MEL (células de eritroleucemia de ratón) o las células COS (células de riñón del mono vehículo de material genético SV40); células de insectos, tales como las líneas celulares Sf9; células que contienen virus, tales como las células BEVS (*Baculovirus Expression Vector System*, sistema del vector de expresión del Baculovirus) o los sistemas de expresión basados en plantas, tales como hojas de tabaco, maíz, célula de arroz o papas transgénicas. Óptimamente, las células de CHO que expresan de manera estable la núcleo-2 β1,6N-acetilglucosaminiltransferasa (C2GlcNAcT-I) y la α-1,3-fucosiltransferasa-VII (fucT-VII) se transfectan con el ADNc que se codifica para el polipéptido. Se seleccionan las células que expresan permanentemente el polipéptido recombinante. Luego, estas células se transfieren a un biorreactor para permitir la producción a gran escala del polipéptido. El polipéptido recombinante se obtiene en forma dimerica, en particular, en forma homodimerica. En general, la dimerización del péptido es un proceso natural que tiene lugar en las células que expresan el polipéptido recombinante, típicamente durante la modificación postraduccion (PTM, *Posttranslational Modification*) del polipéptido.

La técnica de preparación recombinante anterior puede utilizarse para preparar un polipéptido según la invención, el cual comprende cualquier aminoácido de una secuencia activa que exhiba afinidad de unión para las selectinas, particularmente, la p-selectina, como se ha explicado antes (incluso el polipéptido tal como se establece en la ID. DE SEC. NO. 3), en forma dimérica. En una realización particularmente preferida, el método se puede usar para

5 preparar un polipéptido que contenga un solo aminoácido de lisina (con preferencia, en la posición terminal, particularmente la posición del término C) y que comprenda cualquiera de las secuencias activas antes ilustradas.

Para proveer la forma dimérica preferida que ha de asociarse con la microvesícula, el polipéptido, con preferencia, comprende en su secuencia uno o más residuos de cisteína que están unidos a uno o más residuos respectivos de cisteína en una secuencia polipeptídica correspondiente, para formar al menos un puente de disulfuro (con

10 preferencia, al menos dos puentes de disulfuro) entre las dos secuencias.

En una realización de la invención, el polipéptido puede estar unido al componente de la microvesícula llena de gas mediante un enlazador. Los enlazadores adecuados, con preferencia, son residuos hidrofílicos, que por lo general contienen unidades repetidas de oxietileno en la cadena principal.

Según una realización, el enlazador es un resto de la fórmula (III):

15 $-X-(CH_2)_f-[O-(CH_2)_g]_h-[O-(CH_2)_j]_k-Y-$ (III)

en donde:

f, g, h y j representan independientemente un número entero variable entre 1 y 4, k representa un número entero variable entre 0 y 4, y X e Y respectivamente representan los respectivos resto reactivos para unir en puente el enlazador con el polipéptido, en un extremo, y con el componente de la microvesícula, en el otro extremo.

20 El enlazador comprende restos reactivos adecuados en sus respectivos extremos, para unirse covalentemente a un correspondiente resto reactivo complementario en el componente de la microvesícula, de un lado, y a un correspondiente resto reactivo complementario en el polipéptido, por ejemplo, en el residuo Y del polipéptido de la fórmula (I), del otro lado.

25 Los ejemplos de dichos restos reactivos incluyen grupos amino ($-NH_2$, que forman el residuo de unión $-NH-$), grupos carboxilo ($-COOH$, que forman el residuo de unión $-CO-$) o grupos tiol ($-SH$, que forman el residuo de unión $-S-$). Con preferencia dicho resto de unión es un grupo amino o un grupo carboxilo.

Los ejemplos preferidos de enlazadores de la fórmula III son los siguientes:

- CO - $CH_2-[O-(CH_2)_2]_2$ - NH - (Adoa)

- CO - $CH_2-[O-(CH_2)_2]_2$ - CO - (Tuda)

30 - NH - $CH_2-(CH_2-O-CH_2)_3$ - CH_2 - NH - (Ttda)

- CO - $CH_2-[O-(CH_2)_2]_2$ - CO - NH - $CH_2-(CH_2-O-CH_2)_3$ - CH_2 - NH - (Ddhh)

Con preferencia, dicho enlazador está formado por dos restos, iguales o diferentes, definidos por la fórmula anterior.

Los ejemplos de enlazadores combinados son los siguientes:

-Adoa-Adoa- o -Ddhh- (que están comprendidos por los enlazadores Ttda- y Tuda-).

35 Los polisacáridos, que contienen las partes de unión reactivas adecuadas, son otros ejemplos de enlazadores adecuados.

La secuencia que comprende la ID. DE SEC. NO. 1, o sus fragmentos activos, y el enlazador deseado se pueden preparar según los métodos convencionales de síntesis de péptidos.

40 El polipéptido según se ha ilustrado con anterioridad se une covalentemente a un respectivo componente de la microvesícula llena de gas.

Por ejemplo, si el polipéptido incluye un grupo amino reactivo (por ejemplo, un grupo amino primario de lisina), puede hacerse reaccionar con el componente de la microvesícula que contiene un correspondiente resto reactivo adecuada, tales como un grupo isocianato (para formar una unión de tiourea), un éster reactivo (para formar una unión de amida), o un grupo aldehído (para formar una unión imina, que puede reducirse a una unión alquilamina).

45 Alternativamente, cuando el ligando direccionador incluye un grupo tiol reactivo, los restos reactivos complementarios adecuados en el componente de la microvesícula pueden incluir derivados de haloacetilo, maleimidas (para formar una unión tioéter) o una mezcla de disulfuros, que comprenda un sulfuro en forma de un

grupo 2-piridiltio (PDT) (que ante la reacción con un derivado de tior del ligando direccional produce la formación de una unión disulfuro estable).

Alternativamente, según una realización de la invención, un ligando direccional que contiene un parte amino reactiva (por ejemplo, un grupo amino secundario, en particular, el grupo terminal -NH₂) puede hacerse reaccionar primero con un compuesto que contenga azufre, para introducir una parte de tior reactiva en el ligando direccional, que luego se hace reaccionar con una correspondiente parte complementaria en el componente de la microvesícula, según se ha ilustrado con anterioridad. Los ejemplos de compuestos adecuados que contienen azufre y que son útiles para introducir un resto de tior reactivo en un ligando direccional que contiene un resto reactivo de amino incluyen, por ejemplo: tioimidato (tales como el reactivo de Traut) N -succinimidil-S - acetiltoacetato (SATA), N-succinimidil-S-acetilpropionato (SATP) o N - succinimidil 3-(2-piridiltio)propionato (SPDP). Puede hallarse una descripción detallada de los agentes que contienen S y las respectivas reacciones de tioización, por ejemplo, en el libro de Greg T. Hermanson: "Bioconjugate Techniques", Elsevier ed., 2ª ed. (abril de 2008), capítulo 1, sección 4-1. Por ejemplo, se puede preparar un fosfolípido derivado de maleimida (por ejemplo, fosfatidiletanolamina - PE - o PE pegilado) y hacerlo reaccionar con un ligando direccional (por ejemplo, la ID. DE SEC. NO. 3), en donde un grupo amino secundario (por ejemplo, el -NH₂ de la lisina terminal) se ha hecho reaccionar previamente con un compuesto que contiene azufre (tales como los que se han ilustrado previamente), para introducir un resto reactivo de tior; el compuesto obtenido luego se puede usar en la preparación de microvesículas dirigidas llenas de gas.

Según otra alternativa, cuando el ligando direccional incluye un grupo carboxílico reactivo, los restos reactivos adecuados del componente de la microvesícula pueden ser aminas e hidrazidas (para formar las funciones de amida o N-acilo, N'-alquilhidrazida).

Según una realización preferida, un ligando direccional que contiene un resto reactivo de amino (por ejemplo, en un residuo de lisina), primero se puede hacer reaccionar con un compuesto que contiene maleimida, para introducir un resto reactivo de maleimida en el ligando direccional, que luego se hace reaccionar con una correspondiente parte complementaria en el componente de la microvesícula. Los agentes que contienen maleimida de utilidad para introducir un resto reactivo de maleimida en un ligando direccional que contiene un resto reactivo de amino y la respectiva reacción de adición del grupo maleimida son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos de compuestos adecuados que contienen maleimida incluyen, por ejemplo: AMAS (éster de N-(α-maleimidoacetoxi)succinimida), BMPS (éster de N-(β-maleimidopropoxil)succinimida), EMCS (éster de N-(ε-maleimidocaproiloxi)succinimida), GMBS (éster de N-(γ-maleimidobutiriloxi)succinimida), LC-SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato)), MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato), SMPB (succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato), reactivo de SM(PEG)_n (éster de succinimidil-(N-maleimidopropionamido)-etilenglicol)), SMPH (succinimidil-6-((β-maleimidopropionamido) hexanoato)), sulfo-EMCS (éster de N-(ε-maleimidocaproiloxi) sulfosuccinimida), sulfo-GMBS (éster de N-(γ-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida), sulfo-KMUS (éster de N-(κ-maleimidoundecanoiloxi)-sulfosuccinimida), sulfo-MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfo-succinimida), sulfo-SMCC (sulfosuccinimidilo 4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxilato), sulfo-SMPB (sulfosuccinimidilo 4-(p-maleimidofenil(butirato))). Según una realización particularmente preferida, uno puede reaccionar con un fosfolípido que contenga tior (por ejemplo fosfatidiletanolamina - PE - tiolada o PE pegilada) con un ligando direccional (por ejemplo, de la ID. DE SEC. NO. 3), donde un grupo amino secundario (por ejemplo, el NH₂ de la lisina terminal) se ha hecho reaccionar previamente con un compuesto que contenga maleimida (por ejemplo, uno de los previamente ilustrados), para introducir allí un resto reactivo de maleimida; el compuesto obtenido luego se puede usar en la preparación de las microvesículas. El fosfolípido que contiene tior se puede obtener, por ejemplo, haciendo reaccionar un grupo 2-piridiltio (PDT) unido a un fosfolípido con un agente reductor (tales como el TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina) a fin de generar un resto reactivo de tior en el fosfolípido. Los ejemplos de fosfolípidos que contienen tior incluyen 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicerol-3-fosfoetanol de sodio, (de Avanti Polar Lipids, IUPAC: (R)-2,3-bis(palmitoiloxi)propil(2-mercaptoetil)fosfonato de sodio) o los que pueden obtenerse por reducción química de los respectivos precursores de piridiltio, tales como: (R)-2,3-bis(palmitoiloxi)propil (2-(3-mercaptopropanamido)etil) fosfato de sodio (del 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridiltio)propionato de sodio], Avanti Polar Lipids), (R)-2,3-bis(oleoiloxi)propil (2-(3-mercaptopropanamido)etil) fosfato de sodio (del 1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridiltio)propionato de sodio], Avanti polar Lipids) o (R)-2,3-bis(estearoiloxi)propil (2-(((2-(3-mercaptopropanamido) polietilenglicol 2000)carbonil)amino)etil) fosfato de amonio (del 1,2-diestearoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[PDP(polietilenglicol)-2000], Avanti Polar Lipids).

Microvesículas dirigidas llenas de gas

Las microvesículas dirigidas de una composición según la invención pueden producirse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica, según se ha ilustrado en los documentos de patente antes citados.

Por ejemplo, el método de fabricación de las microburbujas puede implicar la preparación de un material en polvo secado, que comprende un material anfílico según se ha indicado con anterioridad, con preferencia por liofilización (liofilización) de una suspensión/emulsión acuosa y/u orgánica, que comprenda dicho material. El citado material en polvo secado, identificado en la presente memoria y en las reivindicaciones como "precursor" de las microvesículas

llenas de gas, después se pone en contacto con una solución fisiológicamente aceptable, en presencia del gas deseado, a los efectos de formar la suspensión deseada de microvesículas llenas de gas cuando se agita la mezcla.

Según el método de preparación que se describe en el documento de patente con el número WO 91/15244, los compuestos anfífilos formadores de películas primero se pueden convertir en una forma lamelar mediante cualquier método empleado para la formación de liposomas. Con este propósito, una solución acuosa que comprenda los lípidos formadores de películas y, de un modo opcional, otros aditivos (por ejemplo, mejoradores de la viscosidad, tensioactivos no formadores de películas, electrólitos etc.) pueden someterse a una homogenización mecánica a alta velocidad o a la sonicación en frecuencias acústicas o ultrasónicas, y luego liofilizarse, para formar un polvo de libre fluidez, que luego se almacena en presencia de un gas. Es posible llevar a cabo pasos de lavado opcionales, como los que se describen, por ejemplo, en el documento de patente de los EE. UU. con el número 5.597.549, antes de la liofilización.

Según una realización alternativa (que se describe, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. 5.597.549) un compuesto formador de películas y un estabilizador hidrofílico (por ejemplo polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, ácido glicólico, ácido málico o maltol) pueden disolverse en un disolvente orgánico (por ejemplo butanol terciario, 2-metil-2-butanol o $C_2Cl_4F_2$) y la solución se puede liofilizar para formar un polvo seco.

Con preferencia, según se describe por ejemplo en la solicitud internacional de patente con el número WO2004/069284, un fosfolípido (seleccionado entre los citados anteriormente y que incluyen al menos uno de los fosfolípidos cargados identificados anteriormente) y un agente lipoprotector (como los enumerados anteriormente, en particular carbohidratos, alcoholes de azúcar, poliglicoles, polioxialquilenglicoles y mezclas de los mismos) pueden dispersarse en una emulsión de agua con un disolvente orgánico inmiscible con agua (por ejemplo, alcanos ramificados o lineales, alquenos, cicloalcanos, hidrocarburos aromáticos, éteres alquílicos, cetonas, hidrocarburos halogenados, hidrocarburos perfluorados o mezclas de los mismos), bajo agitación. La emulsión puede obtenerse sometiendo el medio acuoso y el disolvente en presencia de al menos un fosfolípido a cualquier técnica de generación de emulsión apropiada conocida en este campo. Preferiblemente, el fosfolípido se dispersa en el medio acuoso antes de que este último se mezcle con el disolvente orgánico. De un modo alternativo, el fosfolípido se puede dispersar en el disolvente orgánico o se puede añadir por separado a la mezcla acuosa-orgánica, antes o durante el transcurso de la etapa de emulsificación. La microemulsión así obtenida, que contiene microgotitas de disolvente rodeadas y estabilizadas por el material de fosfolípidos (y opcionalmente, por otros compuestos anfífilos y/o aditivos formadores de película), se liofiliza a continuación según técnicas convencionales para obtener un material liofilizado, que se almacena (por ejemplo, en un vial, en presencia de un gas adecuado) y que puede reconstituirse con un vehículo acuoso para obtener finalmente una suspensión de microburbujas llenas de gas, donde las dimensiones y la distribución de tamaño de las microburbujas son sustancialmente comparables con las dimensiones y la distribución de tamaño de la suspensión de microgotitas.

Un proceso adicional para preparar microburbujas llenas de gas comprende generar una dispersión de microburbujas de gas sometiendo un medio acuoso que comprende un fosfolípido (y opcionalmente otros compuestos anfífilos y/o aditivos formadores de película) a una energía de alta agitación controlada (por ejemplo, mediante una mezclador de estator con rotor o mediante sonicación) en presencia de un gas deseado y usando la mezcla obtenida como tal o sometiendo la dispersión obtenida a liofilización, para obtener un producto reconstituible seco. Un ejemplo de este proceso se brinda, por ejemplo, en el documento de patente WO97/29782.

Las técnicas de secado por pulverización (como se describe, por ejemplo, en el documento de patente de los EE. UU. 5.605.673) también se pueden usar para obtener un polvo seco, reconstituible tras el contacto con un vehículo acuoso fisiológico para obtener microburbujas llenas de gas.

El precursor en forma seca o liofilizada obtenido con cualquiera de las técnicas anteriores generalmente está en forma de un polvo o una torta, y puede almacenarse (por ejemplo, en un vial), en contacto con el gas deseado. El precursor es fácilmente reconstituible, en presencia del gas deseado, en un vehículo líquido acuoso fisiológicamente aceptable adecuado, que por lo general es inyectable, para formar las microburbujas llenas de gas, con agitación suave de la suspensión. Los vehículos líquidos fisiológicamente aceptables adecuados son agua estéril, soluciones acuosas tales como solución salina (que ventajosamente puede equilibrarse para que el producto final inyectable no sea hipotónico), o soluciones de una o más sustancias reguladoras de la tonicidad, tales como sales o azúcares, alcoholes de azúcar, glicoles u otros materiales de poliol no iónicos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, glicerol, polietilenglicoles o propilenglicoles).

De acuerdo con una realización de la invención, un constructo de direccionamiento (es decir, que comprende el ligando direccionador unido a un componente de la microvesícula) puede mezclarse como tal con los otros componentes de la formulación, para ser incorporado en la envuelta estabilizadora, tras la reconstitución de la material liofilizado obtenido según cualquiera de los métodos de preparación anteriores.

De manera alternativa, la formulación inicial de microburbujas puede contener un componente funcionalizado intermedio adecuado (por ejemplo, una fosfatidiletanolamina que contenga maleimida), para producir un material

lío-filizado que contenga dicho intermedio; el ligando direccionador, que contiene un resto reactivo complementaria adecuada (por ejemplo, tiol), se une después, haciendo reaccionar los respectivos restos reactivos, al compuesto funcionalizado intermedio ya incorporado en la envuelta de las microburbujas reconstituidas.

En el caso del proceso descrito en el documento de patente con el número WO2004/069284, el constructo de direccionamiento que comprende el ligando direccionador unido al componente de la microvesícula también se puede mezclar con los componentes de la mezcla inicial, sometiéndose a los pasos de emulsión y liofilización. De manera alternativa, una suspensión micelar que contenga el constructo de direccionamiento puede prepararse por separado y posteriormente añadirse a la emulsión ya formada (que contiene los otros componentes formadores de película), con preferencia, bajo calentamiento. Como se ha indicado antes, en lugar del constructo formado, se puede usar de manera alternativa un intermedio funcionalizado, que luego puede hacerse reaccionar en cualquier etapa del proceso (por ejemplo, en la fase de emulsión o tras la reconstitución del compuesto liofilizado) con un ligando direccionador que contenga un resto reactivo complementaria. De acuerdo con una realización, se añade un componente funcionalizado formador de la envuelta (o constructo intermedio formador de la envuelta/espaciador) como una suspensión micelar a la emulsión formada, bajo agitación. El ligando direccionador (que contiene un resto reactivo complementaria) se añade luego a la emulsión obtenida.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia peptídica tal como se establece en la ID. DE SEC. NO. 3, en forma dimérica, se hace reaccionar primero con un agente tiolizador (seleccionado, por ejemplo, entre los ilustrados previamente) para introducir un grupo tiol reactivo en el grupo amino primario del residuo de lisina C-terminal. El agente de tiolización se emplea preferiblemente en un exceso molar con respecto al residuo de lisina, con preferencia, con un exceso molar de aproximadamente 5 a 200 veces, con mayor preferencia, de 20 a 100 veces y aún con mayor preferencia, de 50 veces aproximadamente. Luego se agrega el péptido tiolizado a una suspensión de un componente que contenga maleimida de microvesículas llenas de gas (por ejemplo, un fosfolípido pegilado modificado con maleimida, tal como DSPE-PEG-maleimida). Luego, la mezcla se incuba y el constructo obtenido (que comprende la ID. DE SEC. NO. 3 y el componente de la microvesícula) se puede usar para los pasos de preparación posteriores de las microvesículas llenas de gas, como se ha ilustrado con anterioridad.

La cantidad de ligando direccionador unido a la superficie de una microvesícula se selecciona de modo tal de proporcionar, con preferencia, una microvesícula multivalente, es decir, una microvesícula que comprenda una pluralidad de ligandos direccionadores en su superficie. En general, la microvesícula comprende al menos 200 moléculas direccionadoras por μm^2 de superficie de las microvesículas, con preferencia, al menos 500 moléculas/ μm^2 , con mayor preferencia, al menos 1000 moléculas/ μm^2 , y aún con mayor preferencia, al menos 2000 moléculas/ μm^2 . Por otro lado, dado que no se requiere necesariamente una concentración demasiado alta del ligando direccionador en la superficie de la microvesícula, la microvesícula generalmente comprende menos de 15.000 moléculas objetivo por μm^2 de superficie de la microvesícula, con preferencia, menos de 12.000 moléculas/ μm^2 , con mayor preferencia, menos de 10.000 moléculas/ μm^2 , e incluso más preferiblemente todavía, menos de 8000 moléculas/ μm^2 .

La cantidad de ligando direccionador unido a la superficie de una microvesícula puede determinarse de acuerdo con técnicas comunes conocidas en este campo. Por ejemplo, la superficie total de la envuelta de las microvesículas en una suspensión de microvesículas se puede determinar en primer lugar, por ejemplo, utilizando la medición del contador Coulter. Entonces, se puede determinar la cantidad total de moléculas del ligando direccionador en la suspensión de microvesículas midiendo, por ejemplo, la cantidad total de un marcador químico del ligando direccionador (por ejemplo, ácido siálico o un aminoácido específico), por ejemplo, mediante espectrometría de masas por cromatografía líquida (LC-MS, por sus siglas en inglés). La densidad del ligando direccionador en la superficie de las microvesículas puede calcularse fácilmente.

Uso de microvesículas dirigidas

Las microvesículas dirigidas llenas de gas de la invención se pueden usar en cualquier análisis *in vitro* o *in vivo* que requiera la detección de receptores capaces de unirse al ligando direccionador identificado anteriormente, tales como tejidos o células que expresan un receptor de selectina, con preferencia, receptores de E-selectina y/o P-selectina, con mayor preferencia, receptores de p-selectina. En particular, las microvesículas de la invención son útiles en métodos de diagnóstico para detectar posibles estados patológicos del endotelio vascular, en particular en relación con procesos inflamatorios (por ejemplo, síndrome coronario agudo, angiogénesis, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, etc.) y, más en general, de cualquier órgano o tejido que exprese la P-selectina y/o la E-selectina. Además, las microvesículas de acuerdo con la invención se pueden emplear como una herramienta de diagnóstico eficaz durante el tratamiento (terapéutico) de un paciente que padece una enfermedad o patología inflamatoria, donde "durante" incluye cualquier momento previo al comienzo del tratamiento, en el transcurso de dicho tratamiento y/o al final de dicho tratamiento. Por ejemplo, las microvesículas de la invención se pueden emplear ventajosamente en la monitorización y/o el seguimiento de un tratamiento antiinflamatorio (por ejemplo, de cualquiera de las enfermedades o patologías citadas anteriormente), por ejemplo, para determinar o evaluar los efectos de la administración de un medicamento antiinflamatorio o inhibidor inflamatorio sobre la enfermedad o patología. En una realización preferida, durante un tratamiento, una región de interés del paciente se somete a

estudios por imágenes con ultrasonido, tras la administración de las microvesículas de la invención, por ejemplo a intervalos de tiempo regulares, en un intervalo de tiempo predeterminado después de cada administración del fármaco o intervención terapéutica y/o después de un número seleccionado de administraciones de medicamentos o tratamientos farmacológicos; con preferencia, luego se realiza una captación final de imágenes de la región de interés al terminar o concluir el tratamiento.

Las microvesículas llenas de gas de la invención pueden usarse adicionalmente en métodos de estudios por imágenes asociados a una terapia, donde dichos estudios por imágenes asociados a una terapia incluyen cualquier método para el tratamiento de una enfermedad en un paciente, que comprenda el uso de un agente de contraste para estudios por imágenes (por ejemplo, para el suministro de un compuesto terapéutico a un receptor o tejido seleccionado), y que sea capaz de ejercer o sea responsable de ejercer un efecto biológico *in vitro* y/o *in vivo*. Los estudios por imágenes asociados a una terapia pueden relacionarse ventajosamente con la destrucción localizada controlada de las microvesículas llenas de gas, por ejemplo, por medio de ondas de ultrasonido a alta presión acústica (por lo general, superior a la que generalmente se emplea en métodos no destructivos para el diagnóstico por imágenes). Esta destrucción controlada se puede usar, por ejemplo, para el tratamiento de coágulos sanguíneos (una técnica también conocida como sonotrombólisis), opcionalmente en combinación con la liberación de un compuesto terapéutico adecuado, asociado con el agente de contraste. De manera alternativa, dichos estudios por imágenes asociados a una terapia pueden incluir la administración de un agente terapéutico en las células, como resultado de una permeabilización transitoria de la membrana a nivel celular, inducida por la explosión localizada o la activación de las microvesículas. Esta técnica se puede usar, por ejemplo, para un suministro eficaz de material genético en las células; de manera alternativa, un fármaco puede administrarse localmente, de un modo opcional, en combinación con material genético, permitiendo de este modo una terapia farmacéutica/genética combinada del paciente (por ejemplo, en el caso del tratamiento de un tumor). El agente terapéutico puede asociarse con la microvesícula llena de gas de acuerdo con métodos convencionales o puede administrarse como un compuesto separado de la composición.

Típicamente, se administra una cantidad eficaz del agente de contraste (por ejemplo, mediante una inyección) a un paciente que lo necesita, y la parte del cuerpo o tejido del paciente que se va a estudiar mediante imágenes o a tratar ("región de interés") se somete al método deseado de captación de imágenes. Con preferencia, el agente de contraste se administra por vía intravenosa. El término paciente incluye a cualquier sujeto (humano o animal) sometido a la administración del agente de contraste, ya sea con fines de diagnóstico o terapéuticos o con fines experimentales (incluido, por ejemplo, el uso de un agente de contraste en animales de laboratorio, por ejemplo, para seguir un tratamiento terapéutico experimental).

De acuerdo con una realización preferida, se le administra a un paciente una cantidad eficaz de microvesículas dirigidas, por lo general, mediante la inyección de una suspensión de las mismas. Las imágenes de la región de interés se verán resaltadas por la presencia de las microvesículas unidas al receptor en la región de interés.

Se pueden emplear diversas técnicas de estudios por imágenes en las aplicaciones con ultrasonido, por ejemplo incluso la captación de imágenes de modo B fundamental y no lineal (por ejemplo, armónica), la captación de imágenes de inversión de fase o de pulso y la captación de imágenes Doppler fundamental y no lineal; si se desea, se pueden usar técnicas de captación de imágenes tridimensionales o cuatridimensionales. Además, también se contemplan técnicas de diagnóstico que implican la destrucción de las microvesículas llenas de gas (por ejemplo, mediante ondas de ultrasonidos a alta presión acústica) que son métodos de detección altamente sensibles.

Las microvesículas de acuerdo con la invención pueden administrarse, por lo general, en una concentración de entre aproximadamente 0,01 y alrededor de 5,0 μl de gas (atrapado dentro de las microvesículas) por kg de paciente, dependiendo, por ejemplo, de su respectiva composición, del tejido o del órgano cuyas imágenes han de captarse y/o de la técnica elegida para la obtención de las imágenes. Por supuesto, este rango de concentración general puede variar dependiendo de aplicaciones de los estudios por imágenes específicos, por ejemplo, cuando las señales se pueden observar a dosis muy bajas, como en el Doppler con color o en la inversión de pulso de potencia. Otras posibles aplicaciones de diagnóstico por imágenes incluyen el centellograma, las imágenes ópticas, las imágenes fotoacústicas, las imágenes por resonancia magnética y las imágenes por rayos X, incluidas las imágenes de contraste de fase de rayos X.

Los siguientes ejemplos ayudarán a ilustrar la invención de un modo más detallado.

Ejemplos

Los siguientes materiales y abreviaturas se han usado en los ejemplos expuestos a continuación.

DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina (Genzyme)
Ácido palmítico	Ácido palmítico, ácido hexadecanoico (Fluka)

DSPE-PEG2000	Diesteroilfosfatidiletanolamina modificada con PEG2000, sal sódica (Genzyme)
DSPE-PEG2000-mal	Diesteroilfosfatidiletanolamina modificada con PEG2000-maleimida (Avanti Polar Lipids)
DSPE-PEG2000-PDP	1,2 Diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato (polietilenglicol)-2000], sal de amonio (Avanti Polar Lipids)
PDP	Piridilditiopropionilo
Reactivo de Traut	Clorhidrato de 2-iminotiolano (Pierce)
SATA	N-Succinimidil-S-acetiltioacetato (Pierce)
Sulfo-SMCC	(4-[N-maleimidometil]ciclohexan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo) (Pierce)
Hidroxilamina.HCl	Clorhidrato de hidroxilamina (Fluka)
EDTA.4Na	Ácido etilendiamin-tetraacético, sal tetrasódica (Fluka)
PEG4000	Poliglicol 4000S de Clariant
Ciclooctano	Fluka
TCEP	Clorhidrato de tris(2-carboxietil)-fosfina (Pierce)
rPSGL-Ig	ID. DE SEC. NO. 4 glicosilada, obtenida según el documento de patente de los EE. UU. 2003/0166521, Ejemplo 1
Lys-C	Lys-C de la endoproteasa (Pierce, n.º 90051)
Fr-1	Fragmento purificado de rPSGL-Ig (ID. DE SEC. NO. 3)

Ejemplo 1

Digestión enzimática de rPSGL-Ig para la preparación de Fr-1

- 5 2 mg de rPSGL-Ig en 200 µL de tampón de digestión (Tris.HCl, 25 mM - EDTA, 1 mM - pH 8,5) se colocaron en un tubo microcentrífugo, a lo que se añadió una solución de Lys-C (40 µg disueltos en 50 µl de agua destilada). El vial que contenía el polvo se enjuagó con 50 µl de agua destilada y se añadió al tubo microcentrífugo. Luego, la mezcla se incubó durante 18 horas a 37 °C, en el calentador de bloque seco.

Ejemplo 2

Separación de Fr-1 por cromatografía por intercambio de aniones

- 10 Se llenó una columna de separación cromatográfica (Econo-column, de Bio-Rad, Vt = 3,6 ml, altura: 9,4 cm) con gel ANX Sepharose (GE Healthcare) y se equilibró en un tampón que contenía acetato de sodio 0,05 M - NaCl 0,05 M (pH 4,0). La columna se ejecutó con 3-4 volúmenes del tampón de partida, para permitir la estabilización del gel. La velocidad de flujo era de aproximadamente 0,23 ml/min.
- 15 Se diluyeron 290 µl de la suspensión que contenía la proteína digerida obtenida en el ejemplo 1 con 440 µl de tampón de acetato 0,05 M - NaCl 0,05 M - pH 4,0. Esta mezcla se aplicó a la columna, y la columna se eluyó con tampones de acetato 0,05 M/NaCl pH = 4,0 en concentraciones en aumento de NaCl, que variaban de 0,05 a 1 M.
- 20 Se recogieron fracciones de 2 ml durante la elución. El contenido de proteína en cada fracción se evaluó por medición de la OD (*Optical Density*, densidad óptica), a 280 nm (OD280), y se determinó la presencia de residuos de azúcar por titulación con resorcinol. Se recuperó el Fr-1 en fracciones, eluyendo a una concentración de 1 M de NaCl. Las fracciones que contenían el Fr-1 se recogieron y usaron para posteriores preparaciones. Se evaluó la pureza del Fr-1-que contenía las fracciones mediante análisis SDS-PAGE y LC-UV. La media del peso molecular del Fr-1 (alrededor de 32 kDaltons) se determinó por MALD-ToF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-fly*, desorción/ionización de láser asistida por matriz - tiempo de vuelo).

Ejemplo 3

- 25 Tiolización de rPSGL-Ig (comparativo)

Una alícuota de solución madre de rPSGL-Ig (789 µl – 15,1 mg de rPSGL-Ig – 188,75 nmol) se diluyó con 200 µl de PBE (tampón de fosfato 25 mM, solución salina 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

5 Se preparó una solución del reactivo de Traut (2,76 mg/ml - 20 mM) en PBE y se añadieron 75 µl de esta solución a la solución de rPSGL-Ig. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, bajo agitación. Esta solución se centrifugó en una columna de centrifugado (columna de centrifugado Zeba, 5 ml, Pierce, n.º 89891) equilibrada en tampón de fosfato 20 mM pH 6. El volumen final de la solución fue de aproximadamente 1,2 ml (concentración de rPSGL-Ig tiolizado: aprox. 111 nmol/ml).

El contenido de rPSGL-Ig en la solución final se determinó por espectrometría UV, a 280 nm.

10 La rPSGL-Ig tiolizada se utilizó inmediatamente después de la purificación para limitar la oxidación posible de los grupos tiol.

Ejemplo 4

Preparación de microvesículas con el ligando de rPSGL-Ig (comparativo)

15 Se disolvió DSPE-PEG-maleimida (6,6 mg – 2,24 µmol) en tampón de fosfato 20 mM, pH 6 (0,5 ml) a 45 °C, con agitación (remolinos) para obtener una solución transparente. 0,5 ml de la solución resultante se añadieron entonces a 59,5 ml de una solución de PEG4000 al 10 %.

Se disolvieron 60 mg de una mezcla de DSPC/ácido palmítico (80/20 en mol) en ciclooctano (4,8 ml), a 70 °C.

20 Las soluciones acuosas y orgánicas preparadas con anterioridad se mezclaron usando un homogenizador a alta velocidad (Megatron MT3000) durante 5 minutos (11.500 rpm), para obtener una emulsión. La emulsión resultante se calentó bajo agitación, a 60 °C durante 1 hora, luego se enfrió a temperatura ambiente (aproximadamente a 22 °C). La emulsión se dividió en fracciones de 10 ml en tubos de polipropileno (Falcon, de 15 ml).

25 La rPSGL-Ig tiolizada preparada según el ejemplo 3 (15 nmol) se añadió a 10 ml de la emulsión y la mezcla resultante se agitó a 22 °C, durante 2 horas y 30 minutos. La emulsión obtenida por último se diluyó dos veces con 10 ml de solución de PEG4000 al 10 % y se distribuyó en muestras en unos viales DIN4R (300 µl por vial). Los viales se congelaron a -50 °C durante 2 horas (liofilizador Christ Epsilon), luego se liofilizaron a -25 °C y 0,2 mbar durante 12 horas. El producto liofilizado se expuso luego a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v) y los viales se cerraron herméticamente.

El producto se dispersó en un volumen de solución salina (1 ml, NaCl 150 mM) por agitación manual suave, antes del uso.

Ejemplo 5

30 Tiolización del Fr-1

35 El Fr-1 seco (17,1 nmol) del ejemplo 2 se disolvió en 160 µl de PBE (tampón de fosfato 25 mM, solución salina 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se preparó una solución de SATA 10 mg/ml en DMSO anhidro, y 4 µl (10 equivalentes de SATA) de esta solución se añadieron en la solución de Fr-1. La solución obtenida se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se diluyó luego con PBE (150 µl). Esta solución se centrifugó a través de una columna de centrifugado (columna de centrifugado Zeba de 2 ml, Pierce, n.º 89890) equilibrada en PBE (usando 50 µl de PBE como apilador). El volumen final de la solución fue de alrededor de 360 µl.

40 Se preparó una solución de clorhidrato de hidroxilamina (0,696 g) y sal tetrasódica de EDTA (0,19 g) en PBE (15 ml). El pH de esta solución se ajustó a 7,3 con NaOH 10 N y se completó el volumen hasta alcanzar los 20 ml. Una alícuota de esta solución de desacetilación (40 µl) se añadió a la solución de Fr-1 (360 µl). La solución obtenida se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Esta solución se centrifugó mediante una columna de centrifugado (Columna de centrifugado Zeba, de 2 ml, Pierce, n.º 89890) equilibrada en tampón de fosfato 20 mM, pH 6 (usando 50 µl de PBE como apilador). El volumen final de la solución fue de alrededor de 450 µl (concentración de Fr-1 tiolizado: aprox. 33 nmol/ml).

45 El Fr-1 tiolizado se utilizó inmediatamente después de la purificación, para limitar la posible oxidación de los grupos tiol.

Ejemplo 6

Preparación de microvesículas con Fr-1

Se disolvió DSPE-PEG-maleimida (6,6 mg – 2,24 µmol) en tampón de fosfato 20 mM, pH 6 (0,5 ml) a 45 °C, con agitación (remolino), para obtener una solución transparente. Se añadieron entonces 0,5 ml de la solución resultante

a 59,5 ml de solución de PEG4000 al 10 %.

Se disolvieron 60 mg de una mezcla de DSPC/ácido palmítico (80/20 en mol) en ciclooctano (4,8 ml), a 70 °C.

5 Las soluciones acuosas y orgánicas preparadas con anterioridad se mezclaron usando un homogenizador a alta velocidad (Megatron MT3000) durante 5 minutos (11.500 rpm), para obtener una emulsión. La emulsión resultante se calentó bajo agitación a 60 °C, durante 1 hora, luego se enfrió a temperatura ambiente (alrededor de 22 °C). La emulsión se dividió en fracciones de 10 ml, en tubos de PP (Falcon, de 15 ml).

10 El Fr-1 (preparado de acuerdo con el ejemplo 5, 13 nmol) se añadió a 10 ml de la emulsión, y la mezcla resultante se agitó suavemente a 22 °C, durante 2 horas y 30 min. La emulsión obtenida finalmente se diluyó dos veces con solución de PEG4000 al 10 % y se distribuyó en muestras en unos viales DIN4R (300 µl por vial). Los viales se congelaron a -50 °C durante 2 horas (liofilizador Christ Epsilon), luego se liofilizaron a -25 °C y 0,2 mbar durante 12 horas. El producto liofilizado se expuso después a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v) y los viales se cerraron herméticamente.

El producto se dispersó en un volumen de solución salina (1 ml, NaCl150 mM) mediante agitación manual suave antes del uso.

15 Ejemplo 7

Reducción de Fr-1 con TCEP: Fr-1 monomérico (comparativo)

El Fr-1 seco (fragmentado y purificado a partir de 3 mg de rPSGL-Ig de acuerdo con el ejemplo 1 y el ejemplo 2) se disolvió en 250 µl de tampón (Tris/HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 6,8).

20 Se preparó una solución de TCEP (2,86 mg/ml - 10 mM) en el mismo tampón, y 28 µl de esta solución se añadieron a la solución del fragmento. La mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 1 hora bajo agitación. Tras la dilución con 100 µl de tampón, esta solución se centrifugó mediante una columna de centrifugado (columna de centrifugado Zeba, de 2 ml, Pierce) equilibrada en tampón de fosfato 20 mM, pH 6. El volumen final de la solución fue de alrededor de 0,4 ml.

25 Se obtuvo un Fr-1 monomérico reducido y este compuesto se usó inmediatamente después de la purificación (para limitar la posible reoxidación de los grupos tiol).

Ejemplo 8

Preparación de microvesículas con Fr-1 monomérico (después de la reducción de TCEP) (comparativo)

Se prepararon las microvesículas de acuerdo con el ejemplo 6, con la diferencia que la solución de Fr-1 se reemplazó por una solución de Fr-1 monomérica (100 nmol) preparada según el ejemplo 7.

30 Ejemplo 9

Preparación de Fr1-SMCC

35 El Fr-1 (76,5 nmol) del ejemplo 2 se disolvió en 500 µl de tampón (tampón de fosfato 200 mM, solución salina 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Se preparó una solución de Sulfo-SMCC, 55 mg/ml, en DMSO anhidro y 62 µl (100 equivalentes de Sulfo-SMCC) de esta solución se añadieron a la solución de Fr-1. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Esta solución se centrifugó mediante una columna de centrifugado (columna de centrifugado Zeba, de 5 ml, Pierce, n.º 89890) equilibrada en tampón de fosfato 20 mM, pH 6. El volumen final de la solución fue de alrededor de 660 µl.

Ejemplo 10

Preparación de DSPE-PEG-SH

40 Se disolvió DSPE-PEG2000-PDP (4,4 mg - 1473 nmol) en 400 µl de tampón de fosfato (100 mM, pH 6) a 40 °C, con agitación (remolino) para obtener una solución transparente. Se añadió una solución 25 mM de TCEP en el tampón (125 µl). La solución obtenida se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación.

Una muestra de la solución se diluyó en el tampón y se verificó para determinar la ausencia de 2-piridintiona.

45 La solución se centrifugó mediante una columna de centrifugado (columna de centrifugado Zeba de 5 ml, Pierce, n.º 89890) equilibrada en tampón de fosfato 20 mM, pH 6. El volumen final de la solución fue de alrededor de 620 µl.

Ejemplo 11

Preparación del conjugado de DSPE-PEG-SH/Fr-1-SMCC

Se añadieron 630 µl de la solución de Fr1-SMCC (70 nmol) obtenida en el ejemplo 9 en 470 µl de solución de DSPE-PEG-SH (1050 nmol) obtenido en el ejemplo 10. La solución se incubó durante tres horas a temperatura ambiente con agitación (rueda rotativa).

- 5 La solución se purificó luego por cromatografía por intercambio de aniones con un gel ANX Sepharose (GE Healthcare).

La solución que contenía el conjugado de Fr-1 purificado (2.6 ml) se centrifugó mediante una columna de centrifugado (columna de centrifugado Zeba, de 10 ml, Pierce, n.º 89893) equilibrada en tampón de fosfato 20 mM, pH 6 y se usó para preparaciones posteriores.

10 Ejemplo 12

Preparación de microvesículas con el conjugado de DSPE-PEG-SH/Fr-1-SMCC

Se disolvieron 10 mg de una mezcla de DSPC y ácido palmítico (80/20 en mol) en ciclooctano (0,8 ml), a 70 °C.

Por separado, la solución del conjugado de DSPE-PEG-SH/Fr-1-SMCC preparado según el ejemplo 11 (0,75 ml – 20 nmol) se añadió a 9,25 ml de solución de PEG4000 al 10 %.

- 15 Las soluciones orgánicas y acuosas preparadas con anterioridad se mezclaron usando un homogenizador a alta velocidad (Politron PT3000) durante 1 minuto (8000 rpm), para obtener una emulsión. La emulsión resultante se calentó bajo agitación a 60 °C, durante 1 hora, luego se enfrió a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C).

- 20 La emulsión obtenida se diluyó dos veces con solución de PEG4000 al 10 % y se distribuyó en muestras en unos viales DIN4R (300 µl por vial). Los viales se congelaron a -50 °C durante 2 horas (liofilizador Christ Epsilon), luego se liofilizaron a -25 °C y 0,2 mbar durante 12 horas. El producto liofilizado se expuso luego a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v) y los viales se cerraron herméticamente.

El producto se dispersó en un volumen de solución salina (1 ml, NaCl150 mM) mediante agitación manual suave.

Ejemplo 13

Preparación de microvesículas con el conjugado de DSPE-PEG-SH/Fr-1-SMCC

- 25 Se dispersaron 10 mg de una mezcla de DSPC y ácido palmítico (80/20 en mol) en agua destilada (10 ml), a 70 °C durante 15 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente; la solución del conjugado de DSPE-PEG-SH/Fr-1-SMCC preparada según el ejemplo 11 (20 nmol) se añadió luego a la dispersión bajo agitación.

- 30 Se mezcló ciclooctano (0,8 ml) con la dispersión obtenida usando un homogenizador a alta velocidad (Politron PT3000) durante 1 minuto (8000 rpm). La emulsión resultante se calentó bajo agitación a 60 °C durante 1 hora, luego se enfrió a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C).

La emulsión se diluyó dos veces con solución de PEG4000 al 20 % y se distribuyó en muestras en unos viales DIN4R (300 µl por vial). Los viales se congelaron a -50 °C durante 2 horas (liofilizador Christ Epsilon), luego se liofilizaron a -25 °C y 0,2 mbar durante 12 horas. El producto liofilizado se expuso luego a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v) y los viales se cerraron herméticamente.

- 35 El producto se dispersó en un volumen de solución salina (1 ml, NaCl150 mM) mediante agitación manual suave.

Ejemplo 14

Preparación de microvesículas con el ligando rPSGL-Ig (comparativo)

- 40 Se disolvió DSPE-PEG-mal (0,44 mg – 0,15 µmol) en tampón de fosfato 20 mM, pH 6 (0,1 ml) a 45 °C, con agitación (remolinos) para obtener una solución transparente. El rPSGL-Ig tiolizado preparado de acuerdo con el ejemplo 3 (16 nmol - 144 µl – 0,8 nmol/ml de emulsión) se añadió a la solución, y la mezcla resultante se agitó a 22 °C durante 2 horas y 30 minutos. Se añadieron entonces 0,25 ml de la solución a 19,75 ml de solución de PEG4000 al 10 %.

Se disolvieron 20 mg de una mezcla de DSPC/ácido palmítico (80/20 en mol) en ciclooctano (1,6 ml), a 70 °C.

- 45 Las soluciones acuosas y orgánicas preparadas con anterioridad se mezclaron usando un homogenizador a alta velocidad (Politron PT3000), durante 1 minuto (11.000 rpm), para obtener una emulsión. La emulsión resultante se calentó bajo agitación a 60 °C durante 1 hora, luego se enfrió a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C).

La emulsión obtenida se diluyó finalmente dos veces con solución de PEG4000 al 10 % y se distribuyó en muestras

en unos viales DIN4R (300 µl por vial). Los viales se congelaron a -50 °C durante 2 horas (liofilizador Christ Epsilon), luego se liofilizaron a -25 °C y 0,2 mbar durante 12 horas. El producto liofilizado se expuso luego a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v) y los viales se cerraron herméticamente.

Ejemplo 15

5 Preparación de microvesículas con Fr-1

Las microvesículas se prepararon según el ejemplo 14, excepto que la rPSGL-Ig tiolizada se reemplazó por el Fr-1 tiolizado (25 nmol, preparado de acuerdo con el ejemplo 5).

Ejemplo 16

Caracterización físico-química después de la dispersión de las microvesículas que contienen el ligando

- 10 El producto liofilizado obtenido en el ejemplo comparativo 14 se dispersó con suave agitación, en un volumen de solución salina (1 ml, NaCl 150 mM), para obtener una suspensión isotónica de microvesículas lista para la inyección intravenosa. La suspensión de microvesículas se sometió a análisis de tamaño inmediatamente después de la preparación de la suspensión (tiempo = 0 minutos) y 30 minutos después de la preparación (tiempo = 30 minutos). Se midieron la distribución de tamaños y la concentración de microvesículas con un Multisizer™ 3 Coulter Counter®
- 15 equipado con un tubo con una abertura de 30 µm (dilución: 50 µl de la suspensión de microvesículas en 100 ml de una solución de NaCl al 0,9 % - volumen analítico: 100 µl). La preparación se caracterizó para determinar la media del diámetro en número y se obtuvieron tanto la mediana del diámetro en un volumen de microvesículas (Dn y Dv50 en µm), así como también, su concentración en número.

- 20 De un modo similar, el producto liofilizado obtenido en el ejemplo 15 también se dispersó en un volumen igual de solución salina y el tamaño y la distribución de las microvesículas en la suspensión se determinaron como se indicó con anterioridad (tiempo = 0 o 30 min).

Los resultados se ofrecen en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: caracterización físico-química de las suspensiones de microvesículas

Ejemplo	Tiempo [min]	Diámetro Dv50 [µm]	Diámetro Dn [µm]	Conc. de microvesículas [x10 ⁸ /ml]
14 (comp.)	0	3,0	1,5	11,5
14 (comp.)	30	2,5	1,3	18,3
15	0	2,7	1,3	16,8
15	30	2,6	1,3	15,8

- 25 Tal como puede inferirse por los resultados anteriores, las microvesículas con el ligando rPSGL-Ig exhibían agregación después de la dispersión en solución salina, desagregándose gradualmente con el tiempo, lo cual no es conveniente para una forma inyectable. Por el contrario, el tamaño, la distribución y la cantidad de vesículas para el Fr-1 que contenía las microvesículas fueron sustancialmente constantes, cuando se compararon en el T = 0 minutos y en el T = 30 minutos después de la dispersión.

30 Ejemplo 17

Análisis por imágenes de las suspensiones de microvesículas después de la reconstitución en NaCl al 0,9%.

- 35 Las suspensiones de microvesículas obtenidas según el ejemplo 14 y el ejemplo 15 se diluyeron en una proporción de 1/10 en NaCl al 0,9 % y unas alícuotas de 10 µl se introdujeron en un contador celular con cámara Neubauer (Blaubrand®, Brand GmbH), bajo un microscopio óptico (Leica Cambridge Ltd, equipado una lente del objetivo de 20x), para la adquisición de las imágenes de las microvesículas. Se permitió que las microvesículas se elevaran hasta el portaobjetos de la parte superior del Neubauer (2 a 3 minutos) y después de enfocar, se tomaron las imágenes con la cámara digital. Las imágenes se analizaron entonces con un procesador matemático, para determinar la cantidad de microvesículas no ligadas, basándose en la presunción de que una forma circular pura en la imagen correspondía a una sola microvesícula no agregada, mientras que las agregaciones de las microvesículas producían formas no circulares no detectadas. Para detectar "formas circulares puras" en las imágenes en escalas de grises, se implementó la transformación de Hough circular en Matlab (The Mathworks Inc., Natick, MA). El
- 40

programa brinda las posiciones centradas y los radios de las formas circulares detectadas. Se observaron los siguientes resultados (tabla 2).

Tabla 2: análisis de imágenes por detección de objetos por transformación de Hough

Preparación	Cantidad de microvesículas no agregadas		
	Vial n.º 1	Vial n.º 2	Vial n.º 3
Ejemplo 14	157	131	172
Ejemplo 15	332	354	352

- 5 Como puede inferirse por los resultados de la tabla 2, las microvesículas que contenían el fragmento de Fr-1 son mucho menos proclives a la agregación que las microvesículas que contenían la proteína rPSGL-Ig completa.

Ejemplo 18

Actividad de unión *in vitro* de las microvesículas dirigidas

- 10 Para probar la unión eficaz, las microvesículas dirigidas preparadas según el ejemplo comparativo 4 se inyectaron en una estructura con una cámara de flujo, que comprendía un recubrimiento de P-Selectina de Fc de ratón (quimera de CD62P-Fc, de R&D Systems (Mineápolis, MN, EE. UU.). Las microvesículas (en un número equivalente de $80 \times 10^6/400 \mu\text{l}$ de TBS++) se inyectaron a través de la cámara de flujo (FCS2, Bioptech, EE. UU.) a modo de bolo y se evaluó su adhesión sobre la capa de recubrimiento de P-selectina de ratón, durante un período de 10 minutos, a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min (velocidad de corte de 714 s^{-1}), en presencia de plasma humano al 50 % en PBS (v:v, Biomeda recogido en citrato, ref. ES1020P, Stehelin & Cie AG). Se llevó a cabo un análisis cualitativo de acumulación de microvesículas contando la cantidad de microvesículas que se adherían en el área observada a intervalos de 2 minutos, sobre una infusión total de 10 minutos, usando el programa de procesamiento de imágenes Analysis FIVE (SIS, Alemania). Después de 10 minutos, se tomaron cinco fotografías al azar y se midió la cantidad de microvesículas unidas y expresadas como el número de burbujas unidas (NBB, *number of bound bubbles*) a los 10 minutos. Cada área observada era de $183 \times 137 \mu\text{m}$, según se midió con la ayuda de un micrómetro por etapas. La medición se realizó entre la parte central y la salida de la cámara.

De un modo similar, se inyectaron unas suspensiones de microvesículas dirigidas preparadas según el ejemplo 6 (ligando direccionador de Fr-1) y según el ejemplo 8 (FR-1 monomérico) en una cámara de flujo, como se ha descrito con anterioridad, y su actividad de unión se determinó de acuerdo con el procedimiento anterior.

- 25 La tabla 3 muestra los resultados de las tres pruebas.

Tabla 3: número de microvesículas unidas a los 10 minutos (NBM, *number of bound microvesicles*, 10 min)

Preparación	NBM 10 min
Ejemplo 4	75 ± 8
Ejemplo 6	98 ± 7
Ejemplo 8	88 ± 9

- 30 Como puede inferirse por los resultados anteriores, la actividad de unión de las microvesículas que contenían Fr-1 es mayor con respecto a las preparaciones correspondientes de microvesículas que contenían el Fr-1 monomérico o la proteína rPSGL-Ig completa.

Ejemplo 19

Desempeño *in vivo* de las microvesículas con el Fr-1 dimérico y monomérico

Unas microvesículas preparadas según los ejemplos 6 y 8, se compararon en un modelo inflamatorio de rata. La inflamación se indujo en la pata trasera, mediante una inyección intramuscular de lipopolisacárido (LPS, 026:B6

Sigma L-8274, 2,1mg/kg). Se evaluó la unión eficaz de las microvesículas dirigidas mediante imágenes por ultrasonido 24 horas después de la inducción del proceso inflamatorio. Las imágenes por ultrasonido se captaron usando un ecógrafo Siemens Sequoia 512 (Siemens Medical Systems, Issaquah, WA), equipado con un transductor lineal 15L8 (frecuencia de transmisión, 7 MHz; rango dinámico, 83dB; profundidad, 20 mm; compensación de ganancia de tiempo (TGC, *Time-Gain compensation*): lineal). 10 minutos después de inyecciones de dosis únicas de las microvesículas obtenidas del ejemplo 6 y del ejemplo 8, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de las microvesículas usando un *software* de cuantificación desarrollado internamente (Bracco Suisse SA, Ginebra, Suiza), diseñado para cuantificar la amplitud de ecopotencia por contraste dentro de las áreas de interés (AOI, *areas of interest*). El realce con contraste en la AOI de los cuadros almacenados se expresó como valores de ecopotencia relativos (rms^2), que son proporcionales a la cantidad de microvesículas en la AOI de interés. Los resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: ecopotencia en el músculo inflamado de la rata

Preparación	Ecopotencia, 10 minutos (rms^2)
Ejemplo 6	43 ± 18
Ejemplo 8	18 ± 10

Como puede inferirse de la tabla anterior, las microvesículas del ejemplo 6 (con el Fr-1 dimérico) dan como resultado una mayor unión *in-vivo* con respecto a las microvesículas del ejemplo 8 (con el Fr-1 monomérico).

Ejemplo 20

Monitorización de los efectos de la terapia antiinflamatoria con microvesículas de Fr-1

Las microvesículas preparadas según el ejemplo 6 se administraron en un modelo inflamatorio de rata. La inflamación se indujo en la pata trasera, por una inyección intramuscular de lipopolisacárido (LPS, 026:B6 Sigma L-8274, 2,1 mg/kg). La monitorización de la eficacia del tratamiento antiinflamatorio se llevó a cabo pretratando a los animales veinticuatro horas antes de la administración del LPS, con una inyección subcutánea de etanercept (0,45 mg/kg, Wyeth) o de solución salina. La actividad de unión *in vivo* de las microvesículas de Fr-1 se determinó según el protocolo de captación de imágenes que se describe en el ejemplo 19. La inhibición conocida de la inflamación lograda mediante la administración de etanercept para evitar la actividad del TNF α activity (Campbell, S.J., Jiang, Y., Davis, A.E., Farrands, R., Holbrook, J., Leppert, D., y Anthony, D.C. (2007), *Immunomodulatory effects of etanercept in a model of brain injury act through attenuation of the acute-phase response*. J. Neurochem. 103, 2245-2255) se visualizó usando las microvesículas de Fr-1. Los animales pretratados con etanercept, mostraron una reducción en la acumulación de las microvesículas de Fr-1, en comparación con los animales de control que recibían la solución salina. Este estudio demuestra la capacidad de las microvesículas de Fr-1 de monitorizar la expresión de los receptores de selectina en un sitio de inflamación durante un tratamiento antiinflamatorio con un inhibidor de la inflamación.

REIVINDICACIONES

1. Una suspensión acuosa que comprende una microvesícula llena de gas, donde la microvesícula comprende un constructo direccionador que comprende:

(a) un compuesto anfifílico y

5 (b) un polipéptido que consiste como máximo, en 200 residuos de aminoácidos y que comprende al menos los aminoácidos 5-16, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1;

donde dicho polipéptido se encuentra en forma dimérica y está covalentemente asociado con el citado compuesto anfifílico.

10 2. La suspensión acuosa según la reivindicación 1, en la que el polipéptido comprende un residuo de cisteína y/o lisina.

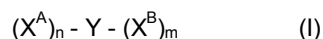
3. La suspensión acuosa según las reivindicaciones 2, en la que dicho polipéptido está covalentemente asociado con el mencionado compuesto anfifílico a través de dicho residuo de lisina.

4. Una suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho polipéptido comprende al menos los aminoácidos 1-19, 5-41 o 1-47, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1.

15 5. Una suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 4, en la que dicho polipéptido comprende 100 residuos de aminoácidos como máximo, con preferencia, 75 residuos de aminoácidos como máximo.

6. Una suspensión acuosa según la reivindicación 5, en la que dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en la ID. DE SEC. NO. 3.

20 7. Una suspensión acuosa según la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la fórmula (I):



en donde:

25 $(X^A)_n$ representa una secuencia de n aminoácidos X^A , que comprende al menos los aminoácidos 5-16, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1, en donde:

n es un número entero variable entre 12 y 199 y

X^A es cualquier aminoácido con exclusión de lisina;

$(X^B)_m$ representa una secuencia de m aminoácidos X^B , en donde:

m es un número entero variable entre 0 y 10, con la condición de que la suma de m+n sea de 199 como máximo y

30 X^B es cualquier aminoácido, con exclusión de lisina y cisteína y

Y es cisteína o lisina.

8. Una suspensión acuosa según la reivindicación 7, en la que $(X^A)_n$ comprende al menos los aminoácidos 1-19, 5-41 o 1-47, como se establece en la ID. DE SEC. NO. 1.

9. Una suspensión acuosa según la reivindicación 7, en la que Y es Lisina.

35 10. Una suspensión acuosa según la reivindicación 7, en la que n es un número entero variable entre 12 y 99 y m+n es 99 como máximo.

11. Una suspensión acuosa según la reivindicación 7, en la que n es un número entero variable entre 12 y 74 y m+n es 74 como máximo.

12. Una suspensión acuosa según la reivindicación 7, en la que m es 0.

40 13. Una suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en la que X^A comprende dos residuos de cisteína.

14. Una suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 13, en la que dicho polipéptido es una secuencia de aminoácidos glicosilada, que comprende una parte de O glicano unida a un residuo amino de la

secuencia.

15. Una suspensión acuosa según la reivindicación 14, en la que dicha parte de O-glicano comprende una estructura sialilo Lewis x.
- 5 16. Una suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, que comprende uno o más de otros residuos de glicano unidos a los aminoácidos en las posiciones 16, 24, 25, 26, 28, 29, 32, 36, 39, 40 y/o 41 de la ID. DE SEC. NO. 1.
17. Una suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 14, 15 o 16, en la que dicha secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende, asimismo, un grupo sulfato unido a un residuo de aminoácido de tirosina.
- 10 18. Una suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho compuesto anfifílico del mencionado constructo direccionador es un fosfolípido.
19. Una suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el gas contenido en la microvesícula es un gas fluorado, de un modo opcional, en mezcla con el aire o el nitrógeno.
- 15 20. Un precursor de un microvesícula llena de gas, según se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho precursor se encuentra en forma de un polvo seco y comprende un material formador de microvesículas y dicho constructo direccionador, en combinación con un aditivo de liofilización, donde dicho precursor puede reconstituirse para formar una suspensión acuosa que comprende la citada microvesícula llena de gas al entrar en contacto y agitarse con un vehículo acuoso, en presencia de un gas.
21. Un *kit* farmacéutico que comprende un precursor según la reivindicación 20 en contacto con un gas biocompatible, y un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable.