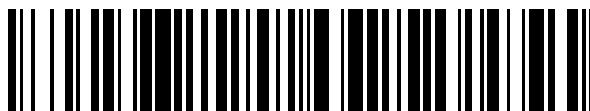


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 924**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/22** (2006.01)

**A61B 8/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2015 PCT/EP2015/080199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097130**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015 E 15816144 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3233136**

54 Título: **Formulación de microvesículas dirigidas rellenas de gas**

30 Prioridad:

**18.12.2014 EP 14199057**

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

**10.10.2019**

73 Titular/es:

**BRACCO SUISSE SA (100.0%)**

**Via Ponteggia 23**

**6814 Cadempino, CH**

72 Inventor/es:

**BUSSAT, PHILIPPE y**

**LASSUS, ANNE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 726 924 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**

Formulación de microvesículas dirigidas rellenas de gas

5 Campo técnico

La invención se refiere a una suspensión de microvesículas dirigidas rellenas de gas, a una formulación para la preparación de las mismas y a su uso como agente de diagnóstico tal como se define en las reivindicaciones.

10 Antecedentes de la invención

El rápido desarrollo de agentes de contraste en los últimos años ha generado una serie de diferentes composiciones y formulaciones que son útiles en la obtención de imágenes realizadas por contraste de órganos y tejidos del cuerpo humano o animal, así como en tratamientos terapéuticos de los mismos.

15 Una clase de agentes de contraste particularmente útiles para la obtención de imágenes con contraste por ultrasonidos incluye suspensiones de burbujas de gas de tamaño nanométrico y/o micrométrico dispersadas en un medio acuoso. El gas se encuentra normalmente atrapado o encapsulado en una capa de película estabilizadora que comprende, por ejemplo, emulsionantes, aceites, espesantes o azúcares. Estas burbujas de gas estabilizadas (dispersadas en una solución fisiológica adecuada) se denominan generalmente en la técnica utilizando diversas terminologías, normalmente en función del material estabilizante empleado para su preparación; estos términos incluyen, por ejemplo, "microesferas", "microburbujas", "microcápsulas" o "microglobos", denominándose en general en el presente documento "microvesículas rellenas de gas" (o "microvesículas").

25 Son de particular interés suspensiones acuosas de microvesículas rellenas de gas en las que las burbujas de gas están delimitadas en la interfaz gas/líquido por una envoltura muy fina (película) que implica un material anfílico estabilizante (normalmente un fosfolípido) dispuesto en la interfaz gas a líquido. Ejemplos de una suspensión acuosa de microvesículas rellenas de gas y su preparación se divulgan, por ejemplo, en los documentos US 5.271.928, US 5.445.813, US 5.413.774, US 5.556.610, 5.597.549, US 5.827.504, WO 97/29783 y WO2004/069284.

30 Más recientemente, se ha prestado atención a la denominada "obtención de imágenes moleculares", en las que se utilizan componentes adecuados específicos de la diana en la formulación de los agentes de contraste, para permitir la obtención selectiva de imágenes de órganos o tejidos realizadas por contraste. Los ejemplos de ligandos de direccionamiento incluyen, por ejemplo, péptidos, proteínas, anticuerpos, aptámeros o carbohidratos capaces de unirse a receptores específicos expresados por órganos o tejidos durante procesos patógenos tales como, por ejemplo, angiogénesis, inflamación o formación de trombos.

35 Por ejemplo, las solicitudes internacionales de patente WO 03/74005, WO 03/084574 y WO 2007/067979 describen péptidos adecuados que se dirigen selectivamente a receptores en placas vulnerables y a receptores específicos de tumores, tales como la región del dominio quinasa (KDR) y el complejo VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)/KDR. Tal como se describe en estas solicitudes de patente, dichos péptidos se utilizan para formular microvesículas rellenas de gas específicas de la diana adecuadas para unirse a KDR o al complejo VEGF/KDR.

45 Las microvesículas rellenas de gas se preparan normalmente suspendiendo una formulación sólida (por ejemplo, en forma de un residuo en polvo, preparada por ejemplo mediante liofilización) en una solución acuosa fisiológicamente aceptable, en presencia de un gas fisiológicamente aceptable. A continuación, la suspensión obtenida de microvesículas rellenas de gas puede administrarse, normalmente mediante inyección (intravenosa).

50 Según lo observado por el solicitante, la suspensión de la formulación sólida en la solución acuosa (también denominada en la técnica "reconstitución del residuo seco") puede representar una etapa crítica del proceso de preparación de las microvesículas y muchos parámetros de la etapa de suspensión (incluidos, por ejemplo, el tipo de agente isotónico y su pH) pueden afectar a las características de las microvesículas en las suspensiones finales.

55 El solicitante ha descubierto ahora que la histidina es particularmente útil como agente de ajuste del pH para preparar suspensiones de microvesículas rellenas de gas que contienen péptidos en una solución acuosa que contiene carbohidratos fisiológicamente aceptables.

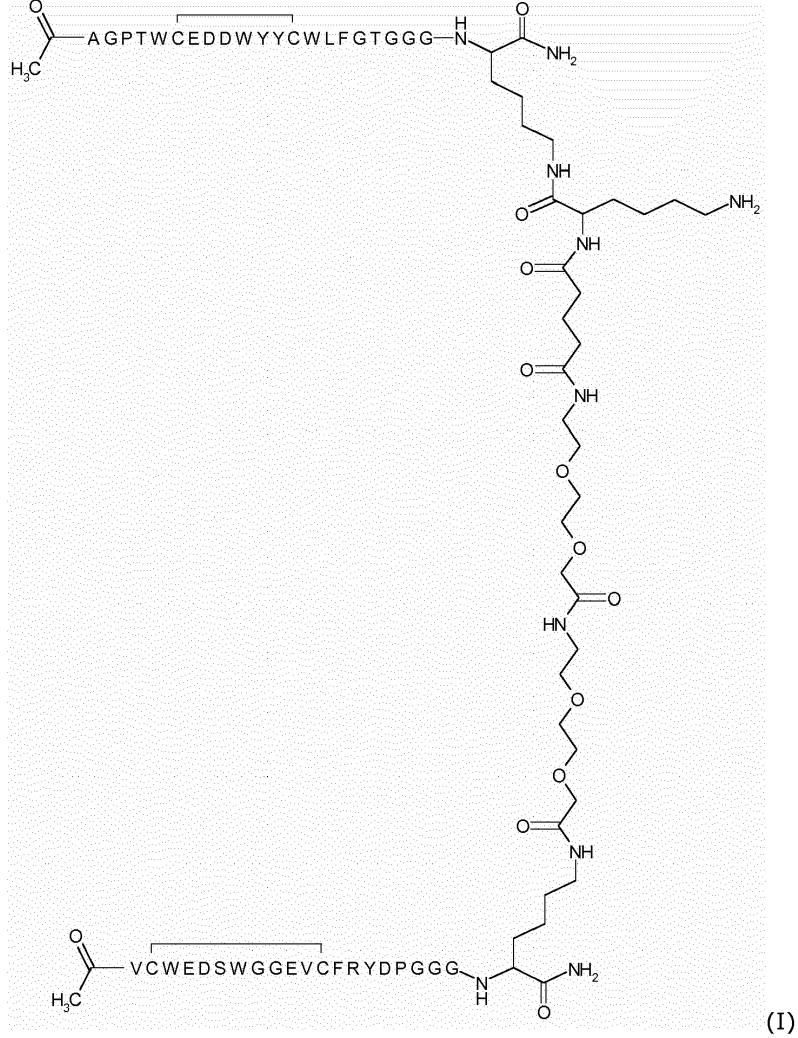
Sumario de la invención

60 Un aspecto de la invención se refiere a una suspensión acuosa de microvesículas rellenas de gas, comprendiendo dichas microvesículas un fosfolípido y un ligando de direccionamiento que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEQ ID NO: 01), VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK (SEQ ID NO: 02) o una combinación de las mismas, comprendiendo dicha suspensión además un carbohidrato e histidina.

65 Preferentemente, dicha microvesícula comprende además un ácido graso.

Preferentemente, el ligando de direccionamiento se encuentra en forma de un péptido dimérico que comprende una combinación de ambas SEQ ID NO: 01 y SEQ ID NO: 02.

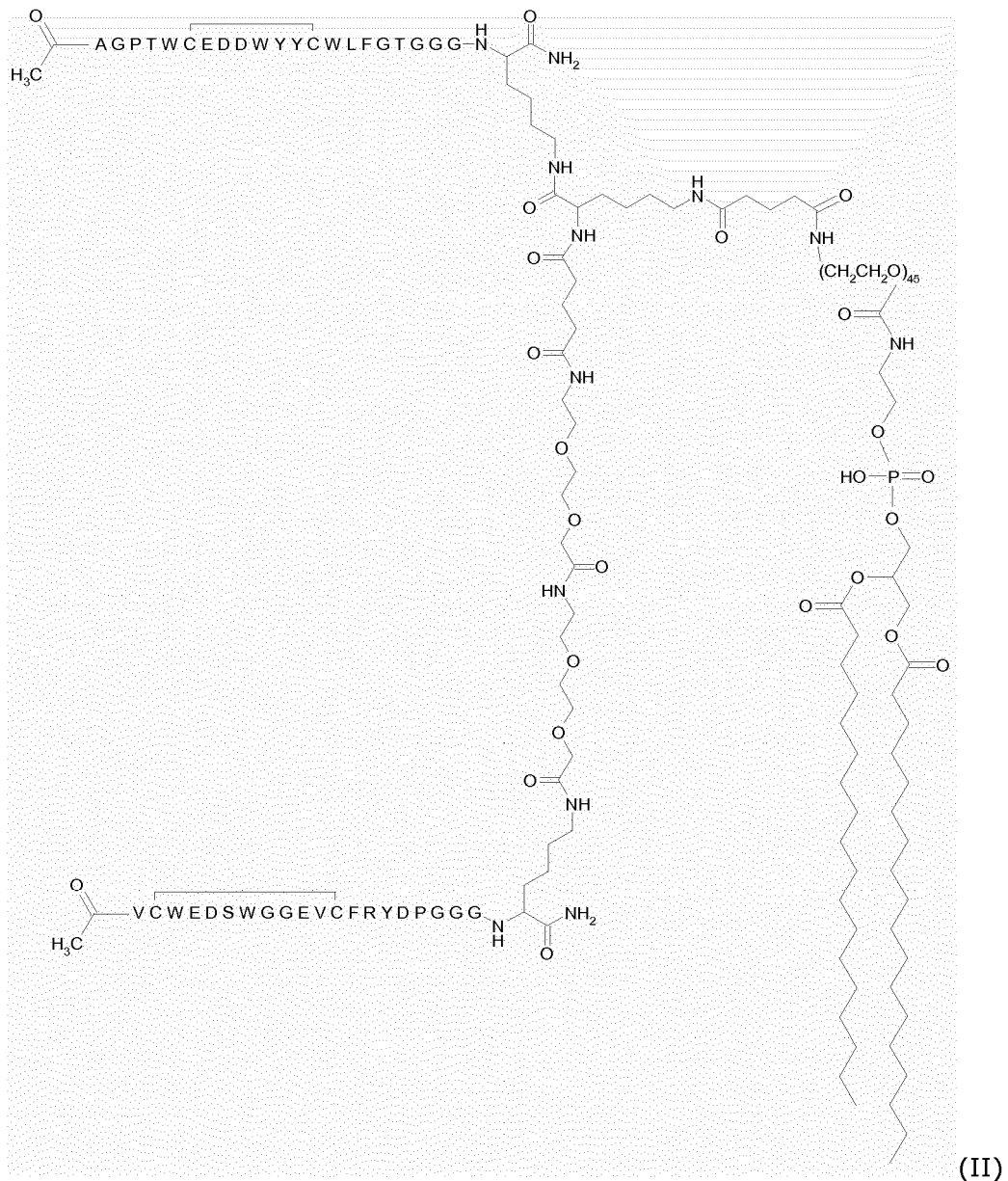
5 De forma más preferida, dicho péptido dimérico tiene la fórmula I siguiente:



En una forma de realización preferida, el ligando dirigido se une covalentemente a un fosfolípido, preferentemente un fosfolípido pegilado.

10

Es particularmente preferido un ligando de direccionamiento en forma de un lipopéptido de fórmula (II):



Preferentemente, el carbohidrato es glucosa, sacarosa o manitol, de forma más preferida glucosa.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a una formulación precursora liofilizada para preparar una suspensión de microvesículas rellenas de gas que comprende:

un fosfolípido, un ligando de direccionamiento, histidina, opcionalmente un ácido graso, opcionalmente un fosfolípido pegilado y un agente liofilizante.

10

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit farmacéutico que comprende:

(a) una formulación precursora liofilizada tal como se ha definido anteriormente y

15

(b) una solución acuosa que contiene carbohidratos, para reconstituir dicho precursor.

Descripción detallada de la invención

20

Una suspensión acuosa de microvesículas rellenas de gas se puede preparar normalmente suspendiendo una formulación precursora liofilizada (que contiene el componente relevante para formar la microvesícula rellena de gas) en un vehículo fisiológicamente aceptable en presencia de un gas adecuado. En general, se prefiere que la solución inyectada sea isoosmolar, de forma que su osmolalidad se encuentre dentro del intervalo fisiológico de

osmolalidad de la sangre, normalmente entre 285 y 310 mOsm por kg. Tal como se sabe en la técnica, la osmolalidad de una solución real corresponde a la molalidad de una solución ideal que contiene solutos no disociables y se expresa en osmoles o miliosmoles por kilogramo de disolvente (Osm por kg o mOsm por kg, respectivamente).

5 Normalmente, las soluciones salinas isoosmolares (por ejemplo, NaCl) son la primera elección de vehículo acuoso para reconstituir la formulación seca a fin de obtener la suspensión deseada de microvesículas para inyección. Sin embargo, tal como observa el solicitante, los vehículos salinos (o más en general vehículos que contienen electrolitos) deberán evitarse preferentemente para la preparación de microvesículas que contienen determinados péptidos de direccionamiento, en particular aquellos que comprenden las secuencias de aminoácidos ilustradas anteriormente. Dichas microvesículas que contienen péptidos rellenas de gas formadas tras la suspensión con un vehículo salino, pueden tender, de hecho, a agregarse entre sí para formar agregados más o menos estables que pueden reducir posteriormente la eficacia de la preparación y posiblemente causar problemas de seguridad, por ejemplo si el tamaño de los agregados es demasiado grande.

15 Para limitar dichos fenómenos de agregación, se pueden utilizar líquidos alternativos para suspender las formulaciones secas, tales como soluciones de carbohidratos disponibles comercialmente.

20 No obstante, las soluciones acuosas comerciales de carbohidratos para inyección (por ejemplo, soluciones de manitol, sacarosa o glucosa) pueden presentar valores variables del pH. Por ejemplo, las soluciones comerciales de glucosa al 5% para inyección pueden tener valores del pH que varían entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 6,5. En la presente descripción y las reivindicaciones, si no se especifica lo contrario, el término "glucosa" se refiere al enantiómero natural "D-glucosa", también conocido como "dextrosa".

25 El solicitante ha observado ahora que las formulaciones que contienen péptidos de direccionamiento, y en particular los péptidos de unión a KDR enumerados anteriormente, muestran una variabilidad sustancial en las características finales de la suspensión de microvesículas cuando se dispersan en soluciones de carbohidratos (y particularmente glucosa) a diferentes valores de pH. En particular, se ha observado que mientras la reconstitución de formulaciones secas con soluciones a un pH de aproximadamente 6,5 proporciona suspensiones con un número relativamente alto de microvesículas, cuando la misma formulación seca se reconstituye con soluciones a un pH más bajo, el número de microvesículas en la suspensión puede disminuir.

35 Para evitar los efectos negativos de dichos valores de pH bajos en la suspensión final se pueden utilizar agentes de ajuste del pH para permitir que la reconstitución del residuo seco tenga lugar a un pH adecuado (normalmente de aproximadamente 6 a aproximadamente 8,5, preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8). Sin embargo, el solicitante ha observado que la mayor parte de los agentes de ajuste del pH convencionales muestran una determinada serie de inconvenientes dentro de los intervalos de pH habituales de soluciones de carbohidratos para inyección.

40 Por ejemplo, cuando la solución dispersante tenga un pH relativamente bajo se añadirán agentes alcalinizantes, tales como el bicarbonato de sodio, en una concentración relativamente alta a la suspensión, para permitir una redispersión óptima de las microvesículas formadas. Por otra parte, si el valor de pH de la solución dispersante es relativamente alto, dichas concentraciones altas de agente alcalinizante darían como resultado valores del pH demasiado altos en la suspensión final que son incompatibles con la inyección intravenosa de la suspensión.

45 Se añadirán agentes tampón convencionales, tales como tampón Tris/HCl o tampón fosfato, a concentraciones relativamente altas para obtener el efecto de ajuste del pH deseado en todo el rango de preparaciones de microvesículas; sin embargo, se ha observado que dichas concentraciones altas pueden presentar inconvenientes no deseados en el proceso de preparación de las microvesículas, con posibles efectos negativos sobre las características de las microvesículas en la suspensión final.

50 A diferencia de los efectos negativos de los agentes de ajuste del pH anteriores, el solicitante ha descubierto que la histidina proporciona suspensiones aceptables de microvesículas rellenas de gas tras la redispersión de diferentes residuos secos que tienen formulaciones variables (en particular con diferentes cantidades de péptidos de direccionamiento) dentro del intervalo típico de valores del pH de soluciones dispersantes de carbohidratos disponibles comercialmente. Además, se ha observado que la histidina se puede utilizar dentro de un intervalo de concentraciones relativamente grande sin afectar negativamente a las propiedades de la suspensión final de microvesículas.

60 La suspensión líquida de microvesículas rellenas de gas según la invención puede prepararse normalmente disolviendo una formulación que contiene fosfolípidos en un vehículo acuoso. La formulación comprende así un fosfolípido opcionalmente en combinación con materiales anfífilos adicionales (por ejemplo, ácidos grasos); el péptido de direccionamiento está presente preferentemente en la formulación como un lipopéptido (es decir, un péptido unido covalentemente a un fosfolípido). La formulación se encuentra normalmente en forma de una formulación liofilizada (secada por congelación), que comprende preferentemente aditivos de liofilización. Las

65

microvesículas rellenas de gas de la invención se pueden preparar mezclando (o reconstituyendo) dicha formulación con el vehículo líquido fisiológicamente aceptable en presencia de un gas fisiológicamente aceptable.

### Fosfolípidos

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fosfolípido" pretende abarcar compuestos anfifílicos que contienen al menos un grupo fosfato y al menos una, preferentemente dos, cadenas de hidrocarburo (C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>), capaces de formar una capa de película estabilizadora (normalmente en forma de una capa monomolecular) en la interfaz del límite gas-agua en la suspensión final de microburbujas. En consecuencia, estos materiales también se denominan en la técnica "fosfolípidos formadores de película".

El término fosfolípidos incluye productos naturales, semisintéticos o sintéticos, que pueden emplearse individualmente o en forma de mezclas.

Los ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen ésteres de glicerol con uno o preferentemente dos residuos (iguales o diferentes) de ácidos grasos y con ácido fosfórico, en los que el residuo de ácido fosfórico está a su vez unido a un grupo hidrófilo tal como, por ejemplo, colina (fosfatidilcolinas - PC), serina (fosfatidilserinas - PS), glicerol (fosfatidilglicerol - PG), etanolamina (fosfatidiletanolaminas - PE), inositol (fosfatidilinositol). Los ésteres de fosfolípidos con un solo residuo de ácido graso se denominan generalmente en la técnica las formas "liso" del fosfolípido o "lisofosfolípidos". Los residuos de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos son, en general, ácidos alifáticos de cadena larga, que normalmente contienen de 12 a 24 átomos de carbono, preferentemente de 14 a 22; la cadena alifática puede contener una o más insaturaciones o preferentemente está completamente saturada. 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. Preferentemente, 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 del ácido glicerol-fosfórico con ácidos grasos; esfingolípidos tales como esfingomielinas, es decir, aquellos análogos de fosfatidilcolina en los que el residuo de diéster de glicerol con ácidos grasos está reemplazado por una cadena de ceramida; cardiolipinas, es decir, los ésteres de 1,3-difosfatidilglicerol con un ácido graso; glicolípidos tales como gangliósidos GM1 (o GM2) o cerebrósidos; glucolípidos; sulfátidos y glucoesfingolípidos.

Ejemplos de fosfolípidos naturales son lecitinas naturales (derivados de fosfatidilcolina (PC)) tales como, por lo general, lecitinas de soja o de yema de huevo.

Ejemplos de fosfolípidos semisintéticos son los derivados parcialmente o totalmente hidrogenados de las lecitinas naturales. Los fosfolípidos preferidos son diésteres de ácidos grasos de fosfatidilcolina, etilfosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol o de esfingomielina.

Ejemplos específicos de fosfolípidos son, por ejemplo, dilauril-fosfatidilcolina (DLPC), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), diaraquidoil-fosfatidilcolina (DAPC), diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), dioleoil-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-estearoil-fosfatidilcolina (PSPC), 1-estearoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (SPPC), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), 1-oleoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (OPPC), dilauril-fosfatidilglicerol (DLPG) y sus sales de metales alcalinos, diaraquidoil-fosfatidilglicerol (DAPG) y sus sales de metales alcalinos, dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG) y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG) y sus sales de metales alcalinos, diestearoil-fosfatidilglicerol (DSPG) y sus sales de metales alcalinos, dioleoil-fosfatidilglicerol (DOPG) y sus sales de metales alcalinos, ácido dilauril-fosfatídico (DLPA), ácido dimiristoil-fosfatídico (DMPA) y sus sales de metales alcalinos, ácido dipalmitoil-fosfatídico (DPPA) y sus sales de metales alcalinos, ácido diestearoil-fosfatídico (DSPA), ácido diaraquidoil-fosfatídico (DAPA) y sus sales de metales alcalinos, dilauril-fosfatidiletanolamina (DLPE) dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), diaraquidoil-fosfatidiletanolamina (DAPE), dilinoleil-fosfatidiletanolamina, dilauril-fosfatidilserina (DLPS), dimiristoil-fosfatidilserina (DMPS), diaraquidoil-fosfatidilserina (DAPS), dipalmitoil-fosfatidilserina (DPPS), diestearoil-fosfatidilserina (DSPS), dioleoil-fosfatidilserina (DOPS), dipalmitoil-esfingomielina (DPSP), diestearoil-esfingomielina (DSSP), dilauril-fosfatidilinositol (DLPI), diaraquidoil-fosfatidilinositol (DAPI), dimiristoil-fosfatidilinositol (DMPI), dipalmitoil-fosfatidilinositol (DPPI), diestearoil-fosfatidilinositol (DSP), dioleoil-fosfatidilinositol (DOP).

Los fosfolípidos adecuados incluyen también fosfolípidos modificados por medio de la unión de un polímero hidrófilo, tal como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG), a los mismos. Los fosfolípidos modificados con polímeros preferidos incluyen "fosfolípidos pegilados", es decir, fosfolípidos unidos a un polímero de PEG. Ejemplos de fosfolípidos pegilados son fosfatidiletanolaminas pegiladas ("PE-PEG" de forma abreviada), es decir, fosfatidiletanolaminas en las que el resto etanolamina hidrófila está unido a una molécula de PEG de peso molecular variable (por ejemplo, de 300 a 20000 daltons, preferentemente de 500 a 5000 dalton), tal como DPPE-PEG (o

DSPE-PEG, DMPE-PEG, DAPE-PEG o DOPE-PEG). Por ejemplo, DPPE-PEG2000 se refiere a DPPE que tiene unido al mismo un polímero de PEG que tiene un peso molecular promedio medio de aproximadamente 2000.

- 5 Fosfolípidos particularmente preferidos son DAPC, DSPC, DPPC, DMPA, DPPA, DSPA, DMPG, DPPG, DSPG, DMPS, DPPS, DSPS, DPPE, DSPE, DMPE, DAPE, etil-DSPC y mezclas de los mismos. Los más preferidos son DSPG, DSPS, DSPE, DSPC, DAPC y mezclas de los mismos. También se pueden utilizar mezclas de fosfolípidos, tales como, por ejemplo, mezclas de DPPE y/o DSPE (incluidos los derivados pegilados), DPPC, DSPC y/o DAPC con DSPS, DPPS, DSPA, DPPA, DSPG, DPPG, etil-DSPC y/o etil-DPPC.
- 10 Según una forma de realización preferida, la formulación comprende al menos DSPC, preferentemente en combinación con DSPE-PEG2000 o DPPE-PEG5000.

*Otros materiales anfífilicos*

- 15 La composición que forma la capa estabilizadora de las microvesículas rellenas de gas puede comprender opcionalmente componentes anfífilicos adicionales que pueden contribuir también a la formación de la capa estabilizadora tal como, por ejemplo, ácidos grasos tales como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico, preferentemente ácidos grasos saturados tales como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido araquídico; lípidos que portan
- 20 polímeros, tales como quitina, ácido hialurónico, polivinilpirrolidona o polietilenglicol (PEG), también denominados "lípidos pegilados"; lípidos que portan mono-, di-, oligo- o polisacáridos sulfonados; colesterol, sulfato de colesterol o hemisuccinato de colesterol; hemisuccinato de tocoferol; lípidos con ácidos grasos unidos a éter o éster; lípidos polimerizados; fosfato de diacetilo; fosfato de dicetilo; ceramidas; ésteres de ácidos grasos de polioxietileno (tales como estearatos de ácidos grasos de polioxietileno), alcoholes grasos de polioxietileno, éteres de alcoholes grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilados, ricinoleato de glicerol-polietilenglicol, esteroides de soja etoxilados, aceite de ricino etoxilado o copolímeros de bloque de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO); ésteres de ácido alifático de esteroles, incluidos butirato de colesterol, isobutirato de colesterol, palmitato de
- 25 colesterol, estearato de colesterol, acetato de lanosterol, palmitato de ergosterol o n-butilato de fitoesterol; ésteres de esteroles de ácidos de azúcar que incluyen glucurónidos de colesterol, glucurónidos de lanosterol, glucurónido de 7-deshidrocolesterol, glucurónido de ergosterol, gluconato de colesterol, gluconato de lanosterol o gluconato de ergosterol; ésteres de ácidos de azúcar y alcoholes que incluyen laurilglucurónido, estearoilglucurónido, miristoilglucurónido, laurilgluconato, miristoilgluconato o estearoilgluconato; ésteres de azúcares con ácidos alifáticos que incluyen laurato de sacarosa, laurato de fructosa, palmitato de sacarosa, estearato de sacarosa; saponinas que incluyen sarsasapogenina, esmilagenina, hederagenina o digitoxigenina; glicerol o ésteres de glicerol que incluyen
- 30 tripalmitato de glicerol, diestearato de glicerol, triestearato de glicerol, dimiristato de glicerol, trimiristato de glicerol, dilaurato de glicerol, trilaurato de glicerol, dipalmitato de glicerol; alcoholes de cadena larga que incluyen alcohol n-decílico, alcohol láurico, alcohol mirístico, alcohol cetílico o alcohol n-octadecílico; 6-(5-colesten-3 $\beta$ -iloxi)-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido; digalactosildiglicérido; 6-(5-colesten-3 $\beta$ -iloxi)hexil-6-amino-6-desoxi-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido; 6-(5-colesten-3 $\beta$ -iloxi)hexil-6-amino-6-desoxil-1-tio- $\beta$ -D-manopiranosido; 1,2-dioleil-sn-glicerol; 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerol; 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol; palmitoilhomocisteína; alquilaminas o sales de alquilamonio, que comprenden al menos una cadena de alquilo (C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>), preferentemente (C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>), tal 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), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); sales de amonio terciario o
- 35 cuaternario que comprenden una o preferentemente dos cadenas de acilo (C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>), preferentemente (C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>), unidas al átomo de N a través de un puente de alquileo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), tal como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP), 1,2-oleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (DSDAP); y mezclas o combinaciones de los mismos.
- 40
- 45
- 50 Estos otros compuestos anfífilicos, si están presentes, pueden estar presentes en cantidades variables, por ejemplo de hasta el 25% en moles de la composición que forma la capa estabilizadora, preferentemente de hasta el 20%.

Según una forma de realización preferida, la formulación para preparar las microvesículas rellenas de gas comprende al menos un ácido graso, preferentemente ácido palmítico, en combinación con un fosfolípido tal como se ha definido anteriormente, preferentemente DSPC y DPPE-PEG5000, de forma más preferida en una relación respectiva del 5% (relación molar) al 20%.

*Ligando de direccionamiento*

- 60 El ligando de direccionamiento es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre AGPTWCEDDWWYCWLFGTGGGK (SEQ ID NO: 01) or VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK (SEQ ID NO: 02).

De forma más preferida, dicho péptido es un péptido dímero de fórmula I.

- 65 El péptido de direccionamiento se conjuga preferentemente con un fosfolípido, preferentemente un fosfolípido pegilado e incluso de forma más preferida DSPE-PEG. Preferentemente, dicho péptido de direccionamiento es un

lipopéptido de fórmula II. La cantidad de lipopéptido en la formulación es preferentemente del 0,1% al 5% en proporción molar con respecto a todos los lípidos (fosfolípido + ácido graso), de forma más preferida del 0,2% al 1%.

5 Los detalles sobre la preparación de los péptidos monoméricos, del péptido dimérico y del lipopéptido se ilustran en el documento WO 2007/067979, que se incorpora al presente documento por referencia.

#### *Histidina*

10 Se puede añadir histidina, preferentemente L-histidina, a la formulación seca que se va a reconstituir o a la solución de carbohidratos para reconstitución. Preferentemente se añade histidina a la formulación que se va a liofilizar; esto permite el uso de soluciones redispersantes de carbohidratos convencionales.

15 La cantidad de histidina será preferentemente tal que la concentración de histidina en la suspensión acuosa de microvesículas rellenas de gas para inyección es de 1,5 mM a 20 mM, preferentemente de 2,5 mM a 10 mM y de forma aún más preferida de 3 mM a 8 mM.

#### *Vehículo acuoso*

20 El vehículo acuoso para preparar la suspensión de microvesículas rellenas de gas es una solución acuosa que contiene carbohidratos, preferentemente iso-osmolar. Preferentemente el carbohidrato es glucosa. La concentración del carbohidrato en la suspensión es preferentemente del 2% al 20% (p/p), de forma más preferida del 3% al 15%. Particularmente para la glucosa, la concentración en la suspensión final es preferentemente del 3% al 8%, de forma más preferida del 4 al 6%.

#### *Preparación de microvesículas*

25 Las microvesículas según la invención pueden fabricarse según cualquier procedimiento conocido en la técnica. Normalmente, el procedimiento de fabricación implica la preparación de un material seco en polvo que comprende la composición de la invención, preferentemente mediante liofilización (secado por congelación) de una suspensión acuosa u orgánica que comprende dicha composición. Las microvesículas pueden obtenerse después mediante reconstitución de la preparación liofilizada en un vehículo acuoso, con agitación suave en presencia de un gas.

30 Preferentemente, tal como se divulga, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO2004/069284, una composición que comprende la mezcla de fosfolípidos y ácidos grasos puede dispersarse en una emulsión de agua con un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, alcanos ramificados o lineales, alquenos, cicloalcanos, hidrocarburos aromáticos, alquiléteres, cetonas, hidrocarburos halogenados, hidrocarburos perfluorados o mezclas de los mismos) con agitación, preferentemente en mezcla con un agente lioprotector (como los enumerados anteriormente, en particular carbohidratos, alcoholes de azúcar, poliglicoles, polioxialquilenglicoles y mezclas de los mismos). La emulsión se puede obtener sometiendo el medio acuoso y el disolvente en presencia de los fosfolípidos y ácidos grasos a cualquier técnica apropiada de generación de emulsión conocida en la técnica, tal como, por ejemplo, sonicación, agitación, homogeneización a alta presión, micromezclado, emulsificación en membrana, emulsificación de enfoque de flujo, agitación a alta velocidad o mezclado de alto cizallamiento. Preferentemente, en primer lugar se prepara una solución orgánica que contiene un fosfolípido y un ácido graso; por separado, se disuelven un lipopéptido de direccionamiento y, opcionalmente, un fosfolípido pegilado en una solución acuosa que contiene un agente lioprotector y opcionalmente histidina; a continuación, las fases orgánica y acuosa se mezclan y se emulsifican tal como se ha descrito anteriormente. La microemulsión así obtenida puede diluirse opcionalmente con una solución que contenga un agente lioprotector y opcionalmente histidina. La microemulsión, que contiene microgotas de disolvente rodeadas y estabilizadas por fosfolípidos y ácidos grasos, se liofiliza según técnicas convencionales para obtener un material liofilizado.

50 El producto liofilizado (o secado por congelación) se encuentra generalmente en forma de polvo o de torta, y puede almacenarse (normalmente en un vial) en contacto con el gas deseado. El producto es fácilmente reconstituible en un vehículo líquido acuoso aceptable fisiológicamente adecuado, tal como una solución acuosa que contiene carbohidratos tal como se ha discutido anteriormente.

#### *Gas*

55 Puede emplearse cualquier gas biocompatible, precursor de gas o mezcla de los mismos para formar las microvesículas de la invención (en adelante también identificado como "gas formador de microvesículas").

60 El gas puede comprender, por ejemplo, aire; nitrógeno; oxígeno; dióxido de carbono; hidrógeno; óxido nitroso; un gas noble o inerte tal como helio, argón, xenón o criptón; un hidrocarburo de bajo peso molecular (por ejemplo, que contenga hasta 7 átomos de carbono), por ejemplo un alcano tal como metano, etano, propano, butano, isobutano, pentano o isopentano, un cicloalcano tal como ciclobutano o ciclohexano, un alqueno tal como propeno, buteno o isobuteno, o un alquino tal como acetileno; un éter; una cetona; un éster; gases halogenados, preferentemente gases fluorados, tales como hidrocarburos de bajo peso molecular (por ejemplo, que contengan hasta 7 átomos de



carbono) halogenados, fluorados o perfluorados; o una mezcla de cualquiera de los anteriores. Cuando se utiliza un hidrocarburo halogenado, preferentemente al menos algunos, de forma más preferida todos, los átomos de halógeno de dicho compuesto son átomos de flúor.

5 Se prefieren los gases fluorados, en particular los gases perfluorados. Los gases fluorados incluyen materiales que contienen al menos un átomo de flúor tal como, por ejemplo, hidrocarburos fluorados (compuestos orgánicos que contienen uno o más átomos de carbono y flúor); hexafluoruro de azufre; cetonas fluoradas, preferentemente perfluoradas, tales como perfluoroacetona; y éteres fluorados, preferentemente perfluorados, tales como perfluorodietiléter. Son compuestos preferidos gases perfluorados, tales como SF<sub>6</sub> o perfluorocarbonos  
10 (hidrocarburos perfluorados), es decir, hidrocarburos en los que todos los átomos de hidrógeno están reemplazados por átomos de flúor, que se sabe que forman suspensiones de microburbujas particularmente estables, tal como se divulga, por ejemplo, en el documento EP 0554 213, que se incorpora al presente documento por referencia.

15 El término perfluorocarbono incluye perfluorocarbonos saturados, insaturados y cíclicos. Los ejemplos de perfluorocarbonos biocompatibles y fisiológicamente aceptables son: perfluoroalcanos, tales como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropanos, perfluorobutanos (por ejemplo, perfluoro-n-butano opcionalmente en mezcla con otros isómeros tales como perfluoro-isobutano), perfluoropentanos, perfluorohexanos o perfluoroheptanos; perfluoroalquenos, tales como perfluoropropeno, perfluorobutenos (por ejemplo, perfluorobut-2eno) o perfluorobutadieno; perfluoroalquinos (por ejemplo perfluorobut-2-ino); y perfluorocicloalcanos (por ejemplo  
20 perfluorociclobutano, perfluorometilciclobutano, perfluorodimetilciclobutanos, perfluorotrimetilciclobutanos, perfluorociclopentano, perfluorometilciclopentano, perfluorodimetilciclopentanos, perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano y perfluorocicloheptano). Los perfluorocarbonos saturados preferidos incluyen, por ejemplo, CF<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>, C<sub>5</sub>F<sub>12</sub> y C<sub>6</sub>F<sub>12</sub>.

25 También puede ser ventajoso utilizar una mezcla de cualquiera de los gases anteriores en cualquier relación. Por ejemplo, la mezcla puede comprender un gas convencional, tal como nitrógeno, aire o dióxido de carbono y un gas que forma una suspensión de microburbujas estable, tal como hexafluoruro de azufre o un perfluorocarbono tal como se indicó anteriormente. Se pueden encontrar ejemplos de mezclas de gases adecuadas, por ejemplo, en el documento WO 94/09829, que se incorpora al presente documento por referencia. Las combinaciones siguientes  
30 son particularmente preferidas: una mezcla de gases (A) y (B) en la que el gas (B) es un gas fluorado, seleccionado de entre los enumerados anteriormente, incluidas sus mezclas, y (A) se selecciona de entre aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono o mezclas de los mismos. La cantidad de gas (B) puede representar de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 95% v/v de la mezcla total, preferentemente de aproximadamente el 5% al 80%.

35 Los gases particularmente preferidos son SF<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>10</sub> o mezclas de los mismos, opcionalmente en mezcla con aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono o mezclas de los mismos. Particularmente preferido es C<sub>4</sub>F<sub>10</sub> y aún más preferida es una mezcla de nitrógeno con C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>, preferentemente en una relación de 35/65 v/v.

40 En determinadas circunstancias, puede ser deseable incluir un precursor de una sustancia gaseosa (es decir, un material que sea capaz de convertirse en un gas *in vivo*). Preferentemente, el precursor gaseoso y el gas derivado del mismo son fisiológicamente aceptables. El precursor gaseoso puede estar activado por pH, fotoactivado, activado por temperatura, etc. Por ejemplo, pueden utilizarse determinados perfluorocarbonos como precursores gaseosos activados por temperatura. Estos perfluorocarbonos, tales como el perfluoropentano o el perfluoroheptano, tienen una temperatura de transición de fase líquido/gas superior a la temperatura ambiente (o la temperatura a la  
45 que se producen y/o almacenan los agentes) pero inferior a la temperatura corporal; por lo tanto, experimentan una transición de fase líquido/gas y se convierten en un gas dentro del cuerpo humano.

#### *Kit farmacéutico y administración*

50 Las suspensiones de microvesículas según la invención pueden almacenarse como tales o, preferentemente, en forma de precursor liofilizado que puede reconstituirse con un vehículo acuoso. Según la invención, el precursor de la suspensión de microvesículas se almacena, por lo tanto, preferentemente en forma de polvo seco y, como tal, puede envasarse ventajosamente en un kit de diagnóstico y/o terapéutico de dos componentes, preferentemente para administración por inyección. El kit comprende preferentemente un primer recipiente, que contiene la  
55 composición precursora liofilizada en contacto con un gas que forma microvesículas seleccionado, y un segundo recipiente, que contiene un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable para reconstituir la suspensión de microvesículas, en particular una solución de carbohidratos tal como se ha discutido anteriormente, preferentemente una solución de glucosa al 5% (p/p). Dicho kit de dos componentes puede incluir dos recipientes separados o un recipiente de doble cámara. En el primer caso, el recipiente es preferentemente un vial convencional sellado con  
60 septo, en el que el vial que contiene el residuo liofilizado está sellado con un septo a través del cual se puede inyectar el líquido vehículo utilizando una jeringa opcionalmente precargada. En tal caso, la jeringa utilizada como recipiente del segundo componente también se utiliza para inyectar el agente de contraste. En el último caso, el recipiente de doble cámara es preferentemente una jeringa de doble cámara y una vez que el liofilizado se ha reconstituido y se ha mezclado después adecuadamente o se ha agitado suavemente, el recipiente se puede utilizar  
65 directamente para inyectar el agente de contraste.

Según una forma de realización preferida, se administra una cantidad eficaz de microvesículas dirigidas a un paciente, normalmente mediante inyección de una suspensión de las mismas. La imagen de la región de interés (que supuestamente comprende un tejido que expresa receptores KDR) se verá así realizada por la presencia de las microvesículas unidas al receptor (si existe) en la región de interés.

La suspensión de microvesículas de la presente invención se puede utilizar en una diversidad de técnicas de diagnóstico y/o terapéuticas, que incluyen en particular obtención de imagen por ultrasonidos realizada por contraste.

Los ejemplos de técnicas de imagen que pueden emplearse en aplicaciones de ultrasonidos incluyen, por ejemplo, imagen en modo B fundamental y no lineal (por ejemplo, armónica), imagen por inversión de pulso o de fase e imagen Doppler fundamental y no lineal; si se desea, se pueden utilizar técnicas de imagen tridimensionales o cuatridimensionales. Además, también se contemplan técnicas de diagnóstico que implican la destrucción de microvesículas rellenas de gas (por ejemplo, mediante ondas de ultrasonido a alta presión acústica) que son procedimientos de detección altamente sensibles.

Normalmente, una vez que se ha administrado al sujeto (por ejemplo, un mamífero) que se somete a la técnica de obtención de imágenes por ultrasonidos deseada una cantidad eficaz de la suspensión de microvesículas, una región seleccionada de interés se somete a irradiación con ultrasonidos y se recoge la señal de eco resultante. Por lo tanto, la señal recogida se puede utilizar, por ejemplo, para mostrar una imagen realizada por contraste de la región de interés; como alternativa, la señal puede utilizarse para calcular mapas paramétricos de la región de interés.

La suspensión de microvesículas según la invención puede administrarse normalmente, preferentemente mediante inyección i.v., en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0  $\mu$ l de gas por kg de paciente, dependiendo, por ejemplo, de su composición respectiva, el tejido u órgano del que se tomará la imagen y/o la técnica de imagen elegida. Por supuesto, este intervalo de concentración general puede variar según las aplicaciones de imágenes específicas, por ejemplo, cuando se pueden observar señales a dosis muy bajas tales como en Doppler color o inversión de pulsos de potencia.

Los ejemplos siguientes ayudarán a ilustrar adicionalmente la invención.

## Ejemplos

### *Materiales y procedimientos*

Se emplean los materiales siguientes en los ejemplos subsiguientes:

DSPC	1,2-Distearoil-SN-glicero-3-fosfocolina (Genzyme pharmaceuticals)
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico (Fluka)
DSPE-PEG 2000	1,2-Distearoil-SN-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (Genzyme pharmaceuticals)
DPPE-PEG 5000	1,2-Dipalmitoil-SN-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000] (Genzyme pharmaceuticals)
PEG4000	Polietilenglicol (PM = 4000) (Fluka)
Ciclooctano	(Fluka)
Bicarbonato	Hidrogenocarbonato de sodio (Fluka)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dodecahidrato de hidrogenofosfato de disodio (Fluka)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihidrogenofosfato de sodio (Fluka)
Tris	Base Trizma (Fluka)
Histidina	L-Histidina (Fluka)

Las concentraciones de las distribuciones de tamaño de las microvesículas en la suspensión se midieron por medio de un contador Coulter (Multisizer 3) provisto de una abertura de 30  $\mu$ m (dilución: 50  $\mu$ l en 100 ml de solución de NaCl al 0,9%); Los valores de pH se midieron utilizando un medidor de pH MP230 (Mettler Toledo) equipado con un electrodo Inlab 410 (Mettler Toledo).

### Ejemplo 1

*Preparación de precursores liofilizados de microvesículas rellenas de gas sin aditivos de ajuste del pH*

*Preparación de lipopéptido de fórmula II*

El lipopéptido de fórmula II se preparó tal como se describe en detalle en los ejemplos de trabajo de la solicitud de patente PCT WO 2007/067979. En resumen, tal como se explica con más detalle en la solicitud PCT anterior, el péptido AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEQ ID NO: 01) se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc. El extremo N-terminal se acetiló y se acopló Fmoc-Lys (ivDde)-OH (N $\alpha$ -Fmoc-N $\epsilon$ -[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil]-L-lisina) a la cadena lateral de Lys<sup>22</sup>. Después de la desprotección de Fmoc, la escisión de la resina y la escisión de los otros grupos protectores (con la excepción del grupo ivDde), se cicló el péptido (formación de puente disulfuro). El péptido ciclado se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó.

El péptido VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEQ ID NO: 02) también se sintetizó mediante SPPS utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc. El extremo N-terminal se acetiló y se realizaron dos acoplamientos secuenciales de Fmoc-Adoa-OH (ácido 8-(Fmoc-amino)-3,6-dioxa-octanoico) a la cadena lateral de Lys<sup>21</sup>. Después de la desprotección de Fmoc, la escisión de la resina y la escisión de los otros grupos protectores, se cicló el péptido (formación de puente disulfuro). El péptido ciclado se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó.

Preparación del péptido dimérico (fórmula I): se acopló glutarato de disuccinimidilo (DSG) a la función  $\alpha$ -amino de la lisina unida a la función  $\epsilon$ -amino de Lys<sup>22</sup> del péptido (SEQ ID NO: 01). Después de la purificación, el producto se hizo reaccionar con la función amino del resto Adoa unido a la Lys<sup>21</sup> del péptido (SEQ ID NO: 02). El heterodímero bruto se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó. A continuación se escindió el grupo protector ivDde restante y el producto final se purificó de nuevo mediante HPLC preparativa y se formó la sal acetato mediante intercambio iónico. La solución del producto se liofilizó para producir un péptido dimérico (fórmula I).

Preparación del lipopéptido (fórmula II): se acopló glutarato de disuccinimidilo (DSG) al péptido dimérico sintetizado previamente (fórmula I). Después de la purificación, el producto se hizo reaccionar con DSPE-PEG2000-amina. El producto se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó.

*Prep-01*

Se preparó un precursor liofilizado para preparar una suspensión de microvesículas rellenas de gas de la forma siguiente:

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

(ii) Por separado, se dispersaron DSPE-PEG 2000 (3% p/p) y el lipopéptido de fórmula II (0,2% p/p) en 1 ml de un tampón Tris 20 mM (pH 7,6); a continuación, la dispersión se mezcló con 60 ml de una solución de PEG4000 al 10%.

(iii) La preparación de ciclooctano (i) se emulsionó en la solución acuosa de PEG4000 (ii) utilizando un homogeneizador de alta velocidad en línea (Megatron MT3000) durante 5 minutos a 12.000 rpm.

(iv) La emulsión resultante se calentó a 80°C durante 1 hora con agitación. Después de enfriar a temperatura ambiente (~1 hora).

(v) La emulsión se diluyó cuatro veces con una solución acuosa al 10% de PEG4000 y se tomaron muestras en volúmenes de 1 ml en viales DIN8R.

(vi) Los viales se insertaron en un liofilizador (liofilizador TELSTAR Lyobeta-35), se enfriaron a -50 °C durante 2 horas y después se liofilizaron a -25 °C y 0,2 mbar durante 12 horas, con una etapa final de secado a 30 °C y 0,1 mbar durante 6 horas adicionales.

Se añadió una mezcla 35/65 (en volumen) de C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>/N<sub>2</sub> al espacio de cabeza de los viales, que después se taparon y se sellaron.

*Prep-02 a Prep-05*

La preparación de la Prep-01 anterior se repitió con varias proporciones molares de DSPC/ácido palmítico en la fase orgánica (véase la tabla 1) y con la diferencia de que las cantidades de DSPE-PEG 2000 o DPPE-PEG 5000 y del lipopéptido de fórmula II se modificaron en la preparación de la solución acuosa de la etapa (ii), tal como se ilustra en la tabla 1. Además, se diluyeron Prep-03 y Prep-05 dos veces (en lugar de cuatro veces) en la etapa (v) y a continuación se tomaron muestras en volúmenes de 1,5 ml en viales DIN8R.

La tabla 1 siguiente resume las diferencias en las diversas preparaciones de precursores liofilizados.

Tabla 1: Preparación de precursores liofilizados

	Relación molar DSPC/PA	DSPE-PEG2000 (% molar)	DPPE-PEG5000 (% molar)	Lipopéptido (% molar)	Dilución de la emulsión (ml en vial)
<b>Prep-01</b>	80/20	3%	-	0.2%	4 x (1,0 ml)
<b>Prep-02</b>	95/5		0,5%	0,5%	4 x (1,0 ml)
<b>Prep-03</b>	95/5	-	0,5%	0,5%	2 x (1,5 ml)
<b>Prep-04</b>	80/20	-	-	0,8%	4 x (1,0 ml)
<b>Prep-05</b>	80/20	-	-	0,8%	2 x (1,5 ml)

**Ejemplo 2**

5

Efecto del pH de soluciones de sacáridos dispersantes sobre la agregación de microvesículas

Las preparaciones obtenidas según el ejemplo 1 se redispersaron en 1 ml de agua o de varias soluciones de glucosa al 5% (p/p) a diferentes valores de pH, a saber, 3,5, 3,8 y 6,5.

10

Para obtener una solución de glucosa al 5% con un pH de 6,5, se añadieron de 30 a 34 µl de NaOH 0,1 N en 20 ml de solución de glucosa al 5% (NaOH → 0,15 a 0,17 mM). Para obtener una solución de glucosa al 5% con un pH de 3,5, se añadieron de 32 a 40 µl de HCl 0,1 N a 20 ml de una solución de glucosa al 5%.

15

Las suspensiones obtenidas se identifican como Susp-01 a Susp-05 (a partir de las preparaciones respectivas Prep-01 a Prep-05, con los sufijos a a d que identifican la reconstitución con (a) agua destilada (control), (b) solución de glucosa, pH 3,5, (c) solución de glucosa, pH 3,8 y (d) solución de glucosa, pH 6,5, respectivamente. Así, por ejemplo, Susp.02c identifica una suspensión de microvesículas obtenida al dispersar la Prep.02 anterior en 1 ml de glucosa al 5% a pH 3,8.

20

Las suspensiones obtenidas de microvesículas rellenas de gas se caracterizaron con un contador Coulter para determinar la concentración de microvesículas y el tamaño de partícula medio en número ( $D_N$ ) de microvesículas en las suspensiones. Los resultados se ilustran en la tabla 2 y la tabla 3, respectivamente (en estas tablas y en las siguientes, los valores indican el valor real referido a una única suspensión o un valor promedio en caso de preparaciones múltiples de la misma suspensión). El pH de la suspensión preparada también se midió y se indicó en la tabla 4 siguiente.

25

Tabla 2: Concentración de microvesículas tras reconstitución con diferentes soluciones

	Número de microvesículas ( $10^9$ partículas/ml) medido en suspensiones obtenidas tras reconstitución con solución:			
	(a)*	(b)	(c)	(d)
<b>Susp-01</b>	3,61	1,25	2,66	3,92
<b>Susp-02</b>	2,58	0,55	1,32	2,76
<b>Susp-03</b>	2,68	0,25	0,34	2,26
<b>Susp-04</b>	2,29	0,22	0,73	2,69
<b>Susp-05</b>	3,27	0,07	0,10	3,22

\* = control

Tabla 3:  $D_N$  de las suspensiones de microvesículas tras reconstitución con diferentes soluciones

30

	$D_N$ (µm) de microvesículas medido en suspensiones obtenidas tras reconstitución con solución:			
	(a)*	(b)	(c)	(d)
<b>Susp-01</b>	1,29	1,76	1,38	1,29
<b>Susp-02</b>	1,38	2,36	1,64	1,35
<b>Susp-03</b>	1,50	4,05	3,48	1,56
<b>Susp-04</b>	1,38	2,40	1,59	1,33
<b>Susp-05</b>	1,40	5,22	4,84	1,39

\* = control

TABLA 4: pH de las suspensiones de microvesículas tras reconstitución con diferentes soluciones

	pH de la suspensión después de reconstitución con			
	(a)*	(b)	(c)	(d)
Susp-01	7,6	4,7	6,0	7,3
Susp-02	7,6	5,0	6,4	7,3
Susp-03	6,9	4,6	4,8	7,0
Susp-04	n.d.	4,7	5,2	7,1
Susp-05	7,5	4,4	5,1	7,3

\* = control

5 Como se infiere a partir de los valores en la tabla 2, la concentración de microvesículas en la suspensión obtenida disminuye sustancialmente con respecto al control cuando se emplea una solución de glucosa a un pH de 3,5 o 3,9 (columnas b y c) para la reconstitución de las preparaciones liofilizadas, mientras que cuando se utiliza una solución de glucosa a pH de 6,5 (col. d), la concentración es sustancialmente similar al control (col. a).

10 Como se puede inferir a partir de la tabla 3, la reconstitución de las preparaciones liofilizadas con soluciones de glucosa de pH bajo proporciona un aumento no deseable del valor de  $D_N$  de las microvesículas.

### Ejemplo 3

15 Efecto sobre la agregación de microvesículas de diversos agentes de ajuste del pH en la reconstitución de Prep-01 con soluciones de sacáridos a diferentes valores de pH

#### Ejemplo 3a: bicarbonato de sodio

20 La preparación del precursor liofilizado de Prep-01 se repitió según el procedimiento del ejemplo 1, con la diferencia de que se añadieron diversas cantidades de bicarbonato de sodio a la solución de PEG4000 al 10% utilizada para diluir la emulsión en la etapa (v), para obtener las respectivas preparaciones de precursor liofilizado con diferentes cantidades de bicarbonato de sodio incorporadas. Las cantidades de bicarbonato añadidas a la solución de PEG4000 fueron las necesarias para obtener una concentración de bicarbonato en la emulsión de la etapa (v) de 0,125, 0,31, 0,38, 0,80, 1,20 y 2,0 mM, respectivamente.

25 Las preparaciones obtenidas se redispersaron después en 1 ml de agua o de varias soluciones de glucosa al 5% (p/p) a diferentes valores de pH según el procedimiento del ejemplo 2.

30 La tabla 5 muestra la concentración de microvesículas medida en las diversas suspensiones obtenidas a partir de las respectivas preparaciones que contienen diferentes cantidades de bicarbonato de sodio.

Tabla 5: Concentración de microvesículas en suspensiones con bicarbonato de sodio

Susp-	10 <sup>9</sup> partículas/ml en la suspensión (concentración de bicarbonato - mM - en emulsión antes de la dilución)						
	-	0,125	0,31	0,38	0,80	1,25	2,0
01(a)	3,61*	3,28	3,50	3,82	3,52	3,55	3,71
01(b)	1,25	1,34	1,81	3,61	3,90	3,56	4,04
01(c)	2,66	2,71	3,43	3,89	3,58	3,49	4,08
01(d)	3,92	3,73	4,03	3,95	-	3,64	4,24

\* = control

35 Como se infiere a partir de los datos ilustrados en la tabla anterior, se recomiendan concentraciones de bicarbonato de sodio de al menos 0,38 mM en la emulsión diluida a fin de obtener una concentración aceptable de microburbujas en todo el intervalo de pH de la solución de glucosa utilizada para la reconstitución. Por otra parte, concentraciones más bajas de bicarbonato pueden proporcionar suspensiones con una concentración indeseablemente más baja de microvesículas, particularmente cuando el precursor liofilizado se reconstituye con una solución de glucosa a un pH de 3,5.

40

La tabla 6 muestra los valores de pH medidos en las suspensiones de la tabla 5.

Tabla 6: Valores de pH de suspensiones de microvesículas con bicarbonato de sodio

Susp-	Valor de pH en la suspensión (concentración de bicarbonato - mM - en emulsión antes de la dilución)						
	-	0,125	0,31	0,38	0,80	1,25	2,0
01(a)	7,6*	-	-	-	8,1	9,4	9,5
01(b)	4,7	5,1	5,4	6,0	6,8	7,8	8,2
01(d)	6,0	5,5	5,8	7,6	8,1	8,5	8,6
01(d)	7,3	7,3	7,6	8,2	-	9,0	9,2

\* = control

5 Como se sabe en la técnica, el pH de soluciones de pH ajustado inyectables por vía intravenosa deberá encontrarse preferentemente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8,5, preferentemente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. Como se infiere a partir de la tabla 6, cuando la solución de glucosa para reconstitución se encuentra en el extremo superior del intervalo de pH (solución d, pH = 6,5), concentraciones relativamente bajas de bicarbonato pueden aumentar ya el pH de la suspensión final de microvesículas por encima de los valores aceptables para inyección. Por lo tanto, observando las tablas 5 y 6 de forma combinada, parece que 10 concentraciones relativamente altas de bicarbonato de sodio (que son necesarias para proporcionar la concentración deseada de microvesículas en solución de glucosa a pH relativamente bajo) pueden aumentar excesivamente el pH de la solución inyectable. Por otra parte, concentraciones relativamente bajas de bicarbonato pueden no proporcionar la concentración deseada de microvesículas en la suspensión reconstituida (particularmente cuando se 15 utilizan soluciones de glucosa de pH bajo).

### 15 Ejemplo 3b: tampón Tris/HCl

20 Se repitió el ejemplo 3a con la diferencia de que el bicarbonato de sodio se reemplazó por solución de tampón Tris/HCl (pH = 8,0), preparada disolviendo base de Tris (121,1 g - 1 mol) en agua destilada (750 ml), añadiendo HCl (aproximadamente 40 ml) y después completando el volumen a 1 l con agua destilada. Los volúmenes de la solución tampón de Tris/HCl añadidos a la solución de PEG4000 fueron los necesarios para obtener una concentración de Tris/HCl en la emulsión de la etapa (v) de 0,125, 2,5, 5,0, 10,0 mM, respectivamente.

25 La tabla 7 muestra la concentración de microvesículas medida en las diversas suspensiones obtenidas a partir de las respectivas preparaciones que contienen diferentes cantidades de tampón Tris/HCl.

Tabla 7: Concentración de microvesículas en suspensiones con tampón Tris/HCl (pH = 8,0)

Susp-	Partículas (10 <sup>9</sup> )/ml en la suspensión (concentración de Tris/HCl - mM - en emulsión antes de la dilución)				
	-	1,25	2,5	5,0	10,0
01(a)	3,61*	2,96	2,77	2,23	1,71
01(b)	1,25	2,68	2,62	2,16	1,79
01(c)	2,66	3,02	2,56	2,24	1,82
01(d)	3,92	3,09	N.D.	2,29	1,91

\* = control

30 Como se puede inferir a partir de los datos en la tabla anterior, la reconstitución de preparaciones que contienen tampón Tris/HCl proporciona concentraciones relativamente más bajas de microvesículas en la suspensión (en comparación con el control), en particular cuando la preparación se reconstituye con soluciones de glucosa de pH bajo. Se observó una disminución importante de la concentración de microburbujas, en particular, cuando se 35 utilizaron altas concentraciones de tampón Tris/HCl, particularmente 5,0 mM o superiores. Por esta razón, el tampón Tris/HCl 2,5 mM se seleccionó como agente de ajuste del pH comparativo en experimentos posteriores.

### 40 Ejemplo 3c: tampón fosfato

Se repitió el ejemplo 3a con la diferencia de que el bicarbonato de sodio se reemplazó por tampón fosfato (pH = 7,6) 40 preparado mezclando 43,5 ml de solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2 M) con 6,5 ml de solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 m). Los volúmenes de la solución de tampón fosfato añadidos a la solución de PEG4000 fueron los necesarios para obtener una concentración de fosfato en la emulsión de la etapa (v) de 2,5, 5,0 y 10,0 mM, respectivamente.

La tabla 8 y la tabla 9 muestran la concentración de microvesículas y los valores de  $D_N$ , respectivamente, medidos en las diversas suspensiones obtenidas a partir de las respectivas preparaciones que contienen diferentes cantidades de tampón fosfato.

5                                      Tabla 8: Concentración de microvesículas en suspensiones con tampón fosfato (pH = 7,6)

Susp-	Partículas ( $10^9$ )/ml en la suspensión (concentración de fosfato - mM - en emulsión antes de la dilución)			
	-	2,5	5,0	10,0
01(a)	3,61*	3,26	3,04	2,38
01(b)	1,25	3,30	2,89	2,32
01(c)	2,66	3,24	3,08	2,40
01(d)	3,92	3,42	2,93	1,84

\* = control

10 Como en el ejemplo 3b, la reconstitución de preparaciones que contienen tampón fosfato proporciona concentraciones relativamente más bajas de microvesículas en la suspensión (en comparación con el control), en particular cuando la preparación se reconstituye con soluciones de glucosa de pH bajo. Se observó una disminución importante de la concentración de microburbujas, en particular, cuando se utilizaron concentraciones más altas de tampón fosfato. Por esta razón, se seleccionó el tampón fosfato 2,5 mM como agente de ajuste del pH comparativo en experimentos posteriores.

15                                      Tabla 9: Valores de  $D_N$  de microvesículas en suspensiones con tampón fosfato (pH = 7,6)

Susp-	$D_N$ ( $\mu\text{m}$ ) en la suspensión (concentración de fosfato - mM - en emulsión antes de la dilución)			
	-	2,5	5,0	10,0
01(a)	1,28*	1,31	1,35	1,50
01(b)	1,76	1,32	1,38	1,50
01(d)	1,38	1,32	1,36	1,44
01(d)	1,28	1,30	1,38	1,66

\* = control

20 Como se observa en la tabla anterior, los valores de  $D_N$  de las suspensiones de microvesículas son ligeramente más altos que los del control, en particular para preparaciones reconstituidas con soluciones de glucosa de pH bajo y a concentraciones más altas de tampón fosfato.

### Ejemplo 3d: histidina

25 El ejemplo 3a se repitió con la diferencia de que el bicarbonato de sodio se reemplazó por histidina. Las cantidades de histidina añadidas a la solución de PEG4000 fueron las necesarias para obtener una concentración de histidina en la emulsión de la etapa (v) de 2,5, 5,0 y 10,0 mM, respectivamente.

30 La tabla 10 muestra la concentración de microvesículas y la tabla 11 los valores de  $D_N$  medidos en las diversas suspensiones obtenidas a partir de las respectivas preparaciones que contienen diferentes cantidades de histidina. La concentración de histidina en la suspensión final de microvesículas fue de 2,5, 5,0 y 10,0 mM, respectivamente.

Tabla 10: Concentración de microvesículas en suspensiones con histidina a diferentes concentraciones

Susp-	Partículas ( $10^9$ )/ml en la suspensión (concentración de histidina - mM - en emulsión antes de la dilución)			
	-	2,5	5,0	10,0
01(a)	3,61*	3,49	3,37	3,51
01(b)	1,25	3,29	3,35	3,52
01(c)	2,66	3,36	3,22	3,54
01(d)	3,92	3,48	3,48	-

\* = control

Tabla 11: D<sub>N</sub> de microvesículas en suspensiones con histidina a diferentes concentraciones

Susp-	D <sub>N</sub> (µm) en la suspensión (concentración de histidina - mM - en emulsión antes de la dilución)			
	-	2,5	5,0	10,0
01(a)	1,28*	1,22	1,22	1,20
01(b)	1,76	1,25	1,22	1,21
01(c)	1,38	1,24	1,22	1,22
01(d)	1,28	1,24	1,20	ND

\* = control

5 Como se observa en la tabla anterior, los valores de D<sub>N</sub> de las suspensiones de microvesículas con histidina son comparables o ligeramente más bajos que los del control, lo que indica que las microvesículas en las suspensiones que contienen histidina tienen tamaños comparables a los del control, independientemente del pH de la solución de glucosa y la concentración de la histidina.

10 **Ejemplo 4**

Efecto sobre la agregación de microvesículas de diversos agentes de ajuste del pH en la reconstitución de Prep-02 con soluciones de sacáridos a diferentes valores de pH

15 **Ejemplo 4a: suspensión de microvesículas con agentes de ajuste del pH comparativos**

15 La preparación del precursor liofilizado de Prep-02 se repitió según el procedimiento del ejemplo 1, con la diferencia de que se añadieron bicarbonato de sodio, tampón Tris/HCl o tampón fosfato a la solución de PEG4000 al 10% utilizada para la dilución de la emulsión en la etapa v, para obtener las respectivas preparaciones precursoras liofilizadas. Las cantidades de agente de ajuste del pH añadidas a la solución de PEG4000 fueron las necesarias para obtener una concentración optimizada (tal como se determina en el ejemplo 3) del agente de ajuste del pH respectivo en la emulsión diluida tal como se indica en las tablas 12 y 13.

20 Las preparaciones obtenidas se redispersaron a continuación en 1 ml de agua o de las diversas soluciones de glucosa al 5% (p/p) a diferentes valores de pH según el procedimiento del ejemplo 2.

25 Las tablas 12 y 13 muestran la concentración de microvesículas y los valores de D<sub>N</sub> medidos en las diversas suspensiones obtenidas a partir de las respectivas preparaciones que contienen el agente de ajuste del pH seleccionado.

30 Tabla 12: Concentración de microvesículas en suspensiones con diferentes agentes de ajuste del pH

Susp-	10 <sup>9</sup> partículas/ml en la suspensión (concentración del ajustador del pH en emulsión antes de la dilución)			
	-	NaHCO <sub>3</sub> 0,5 mM	Tris/HCl 2,5 mM	Fosfato 2,5 mM
02(a)	2,58*	2,89	1,79	1,89
02(b)	0,55	2,17	1,65	1,61
02(c)	1,32	2,71	1,62	1,64
02(d)	2,76	2,63	1,50	1,75

\* = control



Tabla 13: Valor de  $D_N$  de las microvesículas en suspensiones con diferentes agentes de ajuste del pH

Susp-	Valores de $D_N$ de microvesículas en la suspensión (concentración de ajustador del pH-en emulsión antes de la dilución)			
	-	NaHCO <sub>3</sub> 0,5 mM	Tris/HCl 2,5 mM	Fosfato 2,5 mM
02(a)	1,38*	1,36	1,52	1,52
02(b)	2,36	1,48	1,57	1,57
02(c)	1,64	1,38	1,54	1,55
02(d)	1,35	1,39	1,58	1,53

\* = control

5 Como se puede inferir a partir de los datos ilustrados en las tablas 12 y 13, el número de partículas en suspensiones con diferentes agentes de ajuste del pH convencionales es generalmente más bajo que el control, en particular para la reconstitución con soluciones de glucosa de bajo pH - 02 (b) - mientras que el valor de  $D_N$  es generalmente más alto.

#### 10 Ejemplo 4b: suspensión de microvesículas con histidina

El ejemplo 4a se repitió con la diferencia de que los agentes de ajuste del pH comparativos se reemplazaron por histidina a diferentes concentraciones, tal como se ilustra en las tablas 14 y 15. También en este caso la concentración de histidina en la suspensión final de microvesículas fue de 2,5 mM, 5,0 mM y 10 mM, respectivamente.

Tabla 14: Concentración de microvesículas en suspensiones con histidina

Susp-	10 <sup>9</sup> partículas/ml en la suspensión (concentración de histidina en emulsión antes de la dilución)			
	-	2,5 mM	5 mM	10 mM
02(a)	2,58*	2,50	2,49	2,53
02(b)	0,55	2,16	2,43	2,06
02(c)	1,32	2,42	2,58	2,48
02(d)	2,76	2,34	2,61	2,57

\* = control

Tabla 15: Valor de  $D_N$  de las microvesículas en suspensiones con histidina

Susp-	Valores de $D_N$ de microvesículas en la suspensión (concentración de histidina en emulsión antes de la dilución).			
	-	2,5 mM	5 mM	10 mM
02(a)	1,38*	1,33	1,35	1,32
02(b)	2,36	1,38	1,37	1,39
02(c)	1,64	1,35	1,32	1,33
02(d)	1,35	1,36	1,34	1,32

\* = control

20 Como se puede inferir a partir de los datos ilustrados en las tablas 14 y 15, el número de partículas y los valores de  $D_N$  de las microvesículas medidos en suspensiones con histidina son generalmente comparables a los medidos en la solución de control, a cualquier pH de la solución reconstituyente de glucosa y a cualquier concentración de histidina.

#### 25 Ejemplo 5

30 Efecto sobre la agregación de microvesículas de tampón fosfato e histidina en la reconstitución de Prep-03 con soluciones de sacáridos a diferentes valores de pH

La preparación del precursor liofilizado Prep-03 se repitió según el procedimiento del ejemplo 1, con la diferencia de que se añadieron tampón fosfato o histidina a la solución de PEG4000 al 10% utilizada para la dilución de la emulsión (etapa v) para obtener las respectivas preparaciones precursoras liofilizadas. Las cantidades de fosfato o de histidina añadidas a la solución de PEG4000 fueron las necesarias para obtener una concentración de fosfato 2,5 mM y concentraciones de histidina 5 mM, 10 mM y 20 mM en la emulsión diluida de la etapa (v), tal como se indica en las tablas 16 y 17, correspondientes a una concentración de histidina en la suspensión final de microvesículas de aproximadamente 3,75 mM, 7,5 mM y 15 mM.

Las preparaciones obtenidas se redispersaron después en 2 ml de las diversas soluciones de glucosa al 5% (p/p) a diferentes valores de pH según el procedimiento del ejemplo 2.

Las tablas 16 y 17 muestran la concentración y los valores de  $D_N$  en las diversas suspensiones con las respectivas preparaciones que contienen el agente de ajuste del pH seleccionado.

Tabla 16: Concentración de microvesículas en suspensiones

Susp-	10 <sup>9</sup> partículas/ml en la suspensión (concentración de agente de ajuste del pH en emulsión antes de la dilución)			
	Fosfato 2,5 mM	Hist 5,0 mM	Hist 10 mM	Hist 20 mM
03(a)	1,09	2,51	2,59	2,86
03(b)	0,72	2,08	2,55	2,32
03(c)	0,92	2,37	2,55	2,62
03(d)	0,90	2,23	2,54	2,70

Tabla 17: Valor de  $D_N$  de las microvesículas en suspensiones con diferentes ajustadores de pH

Susp-	Valor de $D_N$ (concentración de agente de ajuste del pH en emulsión antes de la dilución)			
	Fosfato 2,5 mM	Hist 5,0 mM	Hist 10 mM	Hist 20 mM
03(a)	1,93	1,50	1,47	1,43
03(b)	2,14	1,56	1,48	1,52
03(c)	1,97	1,51	1,47	1,48
03(d)	2,04	1,55	1,48	1,47

Como se infiere a partir de los datos en la tabla 16, el número de partículas de microvesículas medido en suspensiones con histidina a diferentes concentraciones generalmente es mayor que el número medido en la preparación comparativa tamponada con fosfato, particularmente a altos valores de pH de la solución de glucosa y a altas concentraciones de histidina. Como se puede inferir a partir de los datos de la tabla 17, los valores de  $D_N$  de las microvesículas medidos en suspensiones con histidina a diferentes concentraciones son generalmente más bajos que los valores de  $D_N$  medidos en la preparación comparativa tamponada con fosfato.

### Ejemplo 5

Efecto sobre la agregación de microvesículas de tampón fosfato e histidina en la reconstitución de Prep-04 con soluciones de sacáridos a diferentes valores de pH

La preparación del precursor liofilizado Prep-04 se repitió según el procedimiento del ejemplo 1, con la diferencia de que se añadieron agentes de ajuste del pH comparativos (es decir, bicarbonato, Tris/HCl o fosfato) o histidina a la solución de PEG4000 al 10% utilizada para la dilución de la emulsión (etapa v), para obtener las respectivas preparaciones precursoras liofilizadas. Las cantidades de agentes de ajuste del pH añadidas fueron las necesarias para obtener las siguientes concentraciones en la emulsión diluida, tal como se indica en las tablas 18 y 19: bicarbonato 0,38 mM, Tris/HCl 2,5 mM, fosfato 2,5 mM o histidina 2,5 mM.

Las preparaciones obtenidas se redispersaron luego en 1 ml de las diversas soluciones de glucosa al 5% (p/p) a diferentes valores de pH según el procedimiento del ejemplo 2.

5 Las tablas 18 y 19 muestran la concentración de microvesículas y los valores de  $D_N$  medidos en las diversas suspensiones obtenidas a partir de las respectivas preparaciones que contienen el agente de ajuste del pH seleccionado.

Tabla 18: Concentración de microvesículas en suspensiones

Susp-	10 <sup>9</sup> partículas/ml en la suspensión (concentración del agente de ajuste del pH en emulsión antes de la dilución)			
	Bicarbonato (0,38 mM)	Tris/HCl (2,5 mM)	Fosfato (2,5 mM)	Histidina (2,5 mM)
03(a)	3,70	2,26	3,10	3,11
03(b)	1,47	2,15	2,69	2,82
03(c)	3,28	2,49	2,82	2,87
03(d)	3,65	2,41	2,77	3,07

\* = control

10

Tabla 19: Valor de  $D_N$  de las microvesículas en suspensiones con diferentes ajustadores del pH

Susp-	Valor de $D_N$ (concentración de agente de ajuste del pH en emulsión antes de la dilución)			
	Bicarbonato (0,38 mM)	Tris/HCl (2,5 mM)	Fosfato (2,5 mM)	Histidina (2,5 mM)
03(a)	1,32	1,36	1,38	1,29
03(b)	1,47	1,40	1,42	1,31
03(c)	1,35	1,38	1,38	1,31
03(d)	1,33	1,40	1,39	1,30

15

Como se puede inferir a partir de los datos en la tabla 18, el número de partículas en suspensiones con diferentes agentes de ajuste del pH convencionales es generalmente más bajo que el número medido en la suspensión con histidina, en particular en soluciones de glucosa de pH bajo. Como se puede inferir a partir de los datos en la tabla 19, los valores de  $D_N$  de las microvesículas en suspensiones con diferentes agentes de ajuste del pH convencionales son generalmente más altos que el valor de  $D_N$  medido en la suspensión con histidina, particularmente en soluciones de glucosa de pH bajo.

20

### Ejemplo 7

25

Efecto sobre la agregación de microvesículas de tampón fosfato e histidina en la reconstitución de Prep-05 con soluciones de sacáridos a diferentes valores de pH

30

La preparación del precursor liofilizado Prep-05 se repitió según el procedimiento del ejemplo 1, con la diferencia de que se añadieron tampón fosfato o histidina a la solución de PEG4000 al 10% utilizada para la dilución de la emulsión (etapa v), para obtener las respectivas preparaciones de precursores liofilizados. Las cantidades de fosfato o de histidina añadidas a la solución de PEG4000 fueron las necesarias para obtener una concentración de fosfato 2,5 mM y concentraciones de histidina 2,5 mM, 5 mM o 10 mM en la emulsión diluida tal como se indica en las tablas 20 y 21.

35

Las preparaciones obtenidas se redispersaron después en 2 ml de agua o de varias soluciones de glucosa al 5% a diferentes valores de pH según el procedimiento del ejemplo 2.

Las tablas 20 y 21 muestran la concentración de microvesículas y los valores de  $D_N$  medidos en las diversas suspensiones obtenidas a partir de las respectivas preparaciones que contienen el agente de ajuste del pH seleccionado.

Tabla 20: Concentración de microvesículas en suspensiones

Susp-	10 <sup>9</sup> partículas/ml en la suspensión (concentración del agente de ajuste del pH en emulsión antes de la dilución)		
	Fosfato 2,5 mM	Hist. 5 mM	Hist. 10 mM
05(a)	3,00	3,17	3,40
05(b)	2,68	3,00	3,16
05(c)	2,76	3,07	3,38
05(d)	2,93	3,28	3,43

5

Tabla 21: Valor de D<sub>N</sub> de las microvesículas en suspensiones.

Susp-	Valor de D <sub>N</sub> (concentración de agente de ajuste del pH en emulsión antes de la dilución)		
	Fosfato 2,5 mM	Hist. 5 mM	Hist. 10 mM
05(a)	1,39	1,35	1,34
05(b)	1,42	1,37	1,36
05(c)	1,43	1,37	1,35
05(d)	1,39	1,34	1,34

10 Como se puede inferir a partir de los datos ilustrados en la tabla 20, el número de partículas en suspensiones con tampón fosfato es generalmente más bajo que el número medido en la suspensión con histidina a diferentes concentraciones, particularmente en soluciones de glucosa de pH bajo. Como se puede inferir a partir de los datos ilustrados en la tabla 21, los valores de DN de microvesículas en suspensiones con tampón fosfato generalmente son más altos que el valor de DN medido en las suspensiones con histidina a diferentes concentraciones, particularmente en soluciones de glucosa de pH bajo.

15 Listado de secuencias

<110> BRACCO SUISSE SA

20 <120> FORMULACIÓN DE MICROVESÍCULAS DIRIGIDAS RELLENAS DE GAS

<130> ID1304

<160> 2

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> Péptido sintético

35 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN

40 <220>

<221> DISULFURO

<222> (6)..(13)

<400> 1

ES 2 726 924 T3

Ala Gly Pro Thr Trp Cys Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Phe  
1 5 10 15

Gly Thr Gly Gly Gly Lys  
20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN,

15 <220>

<221> DISULFURO

<222> (2)..(12)

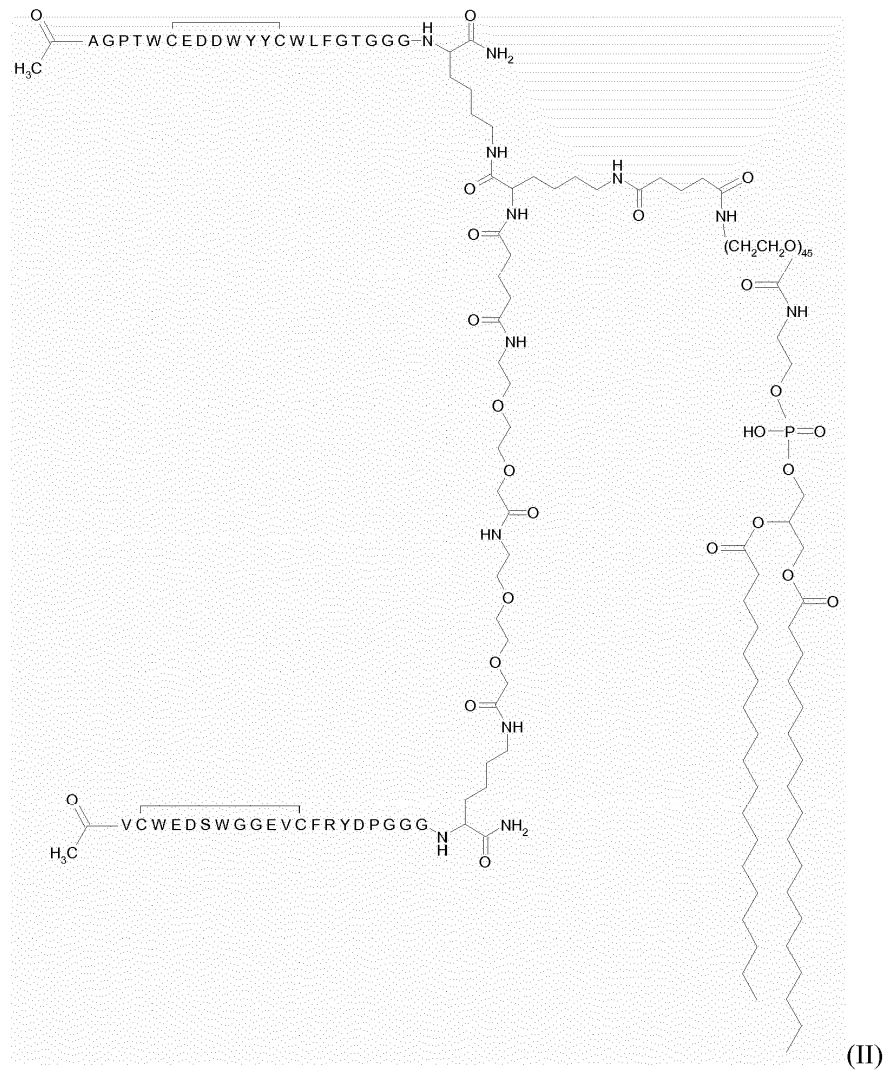
<400> 2

20

Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys Phe Arg Tyr Asp  
1 5 10 15  
Pro Gly Gly Gly Lys  
20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una suspensión acuosa de microvesículas rellenas de gas, comprendiendo dichas microvesículas un fosfolípido y un ligando de direccionamiento que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEQ ID NO: 01), VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEQ ID NO: 02) o una combinación de las mismas, comprendiendo dicha suspensión además un carbohidrato e histidina.
- 10 2. La suspensión acuosa según la reivindicación 1, en la que dicho ligando de direccionamiento se encuentra en forma de un péptido dimérico que comprende una combinación de SEQ ID NO: 01 y SEQ ID NO: 02.
3. La suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho carbohidrato es glucosa.
- 15 4. La suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas microvesículas comprenden un fosfolípido seleccionado del grupo que consiste en dilauroil-fosfatidilcolina (DLPC), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), diaraquidoil-fosfatidilcolina (DAPC), diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (etil-DSPC), dipentadecanoilfosfatidilcolina (DPDPC), 1-miristoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoil-fosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoil-fosfatidilcolina (PSPC), 1-estearoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (SPPC) 20 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC), 1-oleil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (OPPC), dilauroilfosfatidilglicerol (DLPG) y sus sales de metales alcalinos, diaraquidoilfosfatidil-glicerol (DAPG) y sus sales de metales alcalinos, dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG) y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG) y sus sales de metales alcalinos, diestearoil-fosfatidilglicerol (DSPG) y sus sales de metales alcalinos, dioleoil-fosfatidilglicerol (DOPG) y sus sales de metales alcalinos, ácido dilauroil-fosfatídico (DLPA), ácido dimiristoil-fosfatídico (DMPA) y sus sales de metales alcalinos, ácido dipalmitoil-fosfatídico (DPPA) y sus sales de metales alcalinos, ácido diestearoil-fosfatídico (DSPA), ácido diaraquidoil-fosfatídico (DAPA) y sus sales de metales alcalinos, dilauroil-fosfatidiletanolamina (DLPE) 25 dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), diaraquidoil-fosfatidiletanolamina (DAPE), dilinoleil-fosfatidiletanolamina, dilauroil-fosfatidilserina (DLPS), dimiristoil-fosfatidilserina (DMPS), diaraquidoil-fosfatidilserina (DAPS), dipalmitoil-fosfatidilserina (DPPS), diestearoil-fosfatidilserina (DSPS), dioleoil-fosfatidilserina (DOPS), dipalmitoil-esfingomielina (DPSP), diestearoil-esfingomielina (DSSP), dilauroil-fosfatidilinositol (DLPI), diaraquidoil-fosfatidilinositol (DAPI), dimiristoil-fosfatidilinositol (DMPI), dipalmitoil-fosfatidilinositol (DPPI), diestearoil-fosfatidilinositol (DSPi), dioleoil-fosfatidilinositol (DOPI).
- 35 5. La suspensión acuosa según la reivindicación 4, en la que dichas microvesículas comprenden además un fosfolípido pegilado.
6. La suspensión acuosa según la reivindicación 4 o 5, en la que dichas microvesículas comprenden además un ácido graso seleccionado el grupo que consiste en ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, 40 ácido araquídico, ácido behénico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linoléico.
7. La suspensión acuosa según la reivindicación 6, en la que dichas microvesículas comprenden una mezcla de DSPC, ácido palmítico y DSPE-PEG2000 o DPPE-PEG5000.
- 45 8. La suspensión acuosa según la reivindicación 7, en la que el ácido palmítico está presente en una cantidad molar del 5% al 20%.
9. La suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el péptido se conjuga con un fosfolípido para formar un lipopéptido.
- 50 10. La suspensión acuosa según la reivindicación 9, en la que dicho lipopéptido está presente en una cantidad molar del 0,1% al 5% en proporción molar con respecto a los otros componentes de las microvesículas.
- 55 11. La suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho ligando de direccionamiento es un lipopéptido de fórmula II:



- 5 12. La suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas microvesículas rellenas de gas comprenden un gas fluorado fisiológicamente aceptable.
- 10 13. La suspensión acuosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de histidina en la suspensión es de 1,5 mM a 20 mM.
- 10 14. La suspensión acuosa según la reivindicación 13, en la que la concentración de histidina en la suspensión es de 2,5 mM a 10 mM.
15. Un kit farmacéutico que comprende:
- 15 (a) Un primer recipiente que comprende un gas fisiológicamente aceptable en contacto con una formulación liofilizada que comprende (i) un fosfolípido, (ii) un ligando de direccionamiento que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEQ ID NO: 01), VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK SEQ ID NO: 02) o una combinación de las mismas y (iii) histidina y
- 20 (b) un segundo recipiente que comprende una solución fisiológicamente aceptable que contiene carbohidratos para reconstituir la formulación liofilizada dando una suspensión de microvesículas rellenas de gas.
16. El kit farmacéutico según la reivindicación 15, en el que dicho ligando de direccionamiento se encuentra en forma de un péptido dimerico que comprende una combinación de la SEQ ID NO: 01 y la SEQ ID NO: 02.
- 25 17. El kit farmacéutico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 15 o 16, en el que dicho segundo recipiente comprende una solución de glucosa.

18. El kit farmacéutico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 15 a 17, en el que la cantidad de histidina en el primer recipiente es tal que la concentración de histidina en la suspensión acuosa reconstituida de microvesículas rellenas de gas es de 1,5 mM a 20 mM.
- 5 19. El kit farmacéutico según la reivindicación 18, en el que la cantidad de histidina es tal que la concentración de histidina en la suspensión acuosa reconstituida de microvesículas rellenas de gas es de 2,5 mM a 10 mM.
- 10 20. Un procedimiento para obtener imágenes de una región de interés en un sujeto al que se ha administrado previamente una cantidad eficaz de una suspensión de microvesículas rellenas de gas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende someter dicha región de interés a irradiación con ultrasonidos y recoger las señales de eco respectivas provenientes de dicha región de interés.
- 15 21. Un procedimiento para obtener imágenes de una región de interés en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de una suspensión de microvesículas rellenas de gas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 al sujeto, someter dicha región de interés a irradiación con ultrasonidos y recoger las señales de eco respectivas provenientes de dicha región de interés.