

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 721**

51 Int. Cl.:

A61K 49/22

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2011** **E 18156131 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020** **EP 3338807**

54 Título: **Constructo de selección de dianas para microvesículas llenas de gas**

30 Prioridad:

09.08.2010 EP 10172318

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

11.08.2021

73 Titular/es:

BRACCO SUISSE SA (100.0%)

Via Ponteggia 23

6814 Cadempino, CH

72 Inventor/es:

LAMY, BERNARD;

BETTINGER, THIERRY;

BUSSAT, PHILIPPE;

CHERKAoui, SAMIR y

GUILBERT-BRIGGER, IRENE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 848 721 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

Construido de selección de dianas para microvesículas llenas de gas

Campo técnico

- 5 La invención se refiere, en términos generales, a microvesículas llenas de gas seleccionadas como dianas, y a suspensiones acuosas que contienen tales microvesículas, para uso, en particular, en métodos de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

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

- 10 Más recientemente, se ha prestado atención a la denominada "formación de imágenes moleculares", en la que se utilizan componentes diana específicos adecuados en la formulación de los agentes de contraste, para permitir la formación selectiva de imágenes de órganos o tejidos con contraste mejorado. Además, también se ha descrito el uso terapéutico de formulaciones de agentes de contraste, opcionalmente en combinación con formación de imágenes moleculares.

- 15 Una clase de agentes de contraste, particularmente útil para la formación de imágenes de contraste por ultrasonidos, incluye suspensiones de burbujas de gas de tamaño nano- y/o micrométrico dispersas en un medio acuoso. De particular interés son aquellas formulaciones en las que las burbujas de gas están estabilizadas, por ejemplo utilizando 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 se denominan generalmente en la técnica con diversas terminologías, dependiendo típicamente del material estabilizador empleado para su preparación; estos términos incluyen, por ejemplo, "microesferas", "microburbujas", "microcápsulas" o "microglobos". La expresión "microvesículas llenas de gas", o de forma más corta, "microvesículas", como se usa aquí, incluye cualquiera de la terminología anterior.

- 25 Las formulaciones de microvesículas llenas de gas se pueden modificar de forma adecuada, ya sea para mejorar el efecto de diagnóstico (por ejemplo, mediante formación de imágenes moleculares) y/o con fines terapéuticos, tales como administración de fármacos y/o trombólisis. Por ejemplo, las microvesículas se pueden asociar (por ejemplo, mediante su inclusión en su envoltura límite) con agentes terapéuticos y/o con componentes específicos que son capaces de unirse a una diana determinada dentro del cuerpo de un paciente (conocido como "ligandos seleccionadores de dianas"). Los ejemplos de ligandos seleccionadores de dianas incluyen, por ejemplo, péptidos, proteínas, anticuerpos, aptámeros, o hidratos de carbono, capaces de unirse a receptores específicos expresados por órganos o tejidos durante 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, por el endotelio vascular durante los procesos de inflamación. Los ligandos de selectina, y en particular el ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1: n° de acc. GenBank Q14242.1), se expresan constitutivamente en todos los leucocitos (neutrófilos, monocitos, y la mayoría de linfocitos) y células mieloides. Como tal, desempeña un papel crítico en la unión de estas células a plaquetas activadas o endotelios que expresan P-selectina y, aunque con menor afinidad, a E- y L-selectina. Ejemplos de ligandos de P-selectina se describen, por ejemplo, en la patente US n° 5.840.679.

- 40 La Publicación de Solicitud de Patente Internacional n° WO 2008/131217 describe composiciones de microburbujas que comprenden ligandos seleccionadores de dianas dirigidos contra P-selectina. En particular, el ligando seleccionador de dianas es una proteína de fusión que comprende un ligando de P-selectina y un dominio de dimerización. En realizaciones prácticas, la Solicitud describe el uso de ligando de P-selectina recombinante compuesto por la región amino terminal de PSGL-1 en una glicoforma de unión a selectina fusionada a la porción Fc de IgG₁ humana (rPSGL-Ig), para conjugarlo mediante la unión de biotina-estreptavidina a microburbujas que contienen biotina. Aunque 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 US n° 2003/0166521.

- 45 El documento US 2003/0166521 describe una proteína de fusión de PSGL-1 (dimPSGL-1), también denominada PSGL-Ig recombinante (o rPSGL-Ig), producida truncando los 47 aminoácidos del término N de PSGL-1 madura y uniendo dichos 47 aminoácidos del término N de PSGL-1 a una porción Fc de la inmunoglobulina G-1 humana (IgG₁).

J. J. Rychak et al., "Selectin ligands promote ultrasound contrast agent adhesion under shear flow", Molecular Pharmaceutics, 3(5) 2006, p. 516-524, describen microburbujas asociadas con ligandos de P-selectina a través de la unión de biotina-estreptavidina.

El Solicitante ha observado ahora que las microvesículas que poseen solo un fragmento de dicha proteína rPSGL-1 pueden tener algunas ventajas en comparación con las microvesículas que poseen la proteína completa, por ejemplo en términos de eficacia de unión y/o en términos de estabilidad de una suspensión acuosa que contiene las microvesículas.

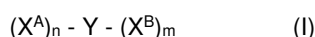
5 Sumario de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un constructo que comprende un compuesto anfifílico asociado con un polipéptido que consiste en una secuencia de como máximo 200 restos de aminoácidos y que comprende al menos los aminoácidos 5-16 como se expone en SEQ ID NO: 1, estando dicho polipéptido en forma dimérica y asociado a través de un enlace covalente con dicho compuesto anfifílico.

- 10 Preferiblemente, dicho polipéptido comprende al menos el aminoácido 1-19 como se expone en SEQ ID NO: 1, más preferiblemente al menos el aminoácido 5-41 como se expone en SEQ ID NO: 1, e incluso más preferiblemente al menos el aminoácido 1-47 como se expone en SEQ ID NO: 1.

Según una realización preferida, dicho polipéptido comprende como máximo 100 restos de aminoácidos, más preferiblemente como máximo 75 restos de aminoácidos.

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



en la que:

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

- 20 n es un número entero de 12 a 199; y

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

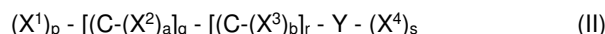
$(X^B)_m$ representa una secuencia de m aminoácidos X^B , en la que:

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

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

- 25 Y es lisina o cisteína, incluso más preferiblemente lisina.

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



en la que

C representa cisteína;

- 30 Y representa lisina o cisteína, preferiblemente lisina;

$(X^1)_p$ representa una secuencia de p aminoácidos X^1 que comprende al menos los aminoácidos 5-16 como se expone en SEQ ID NO: 1, $(X^2)_a$ representa una secuencia de aminoácidos X^2 , $(X^3)_b$ representa una secuencia de b aminoácidos X^3 , $(X^4)_s$ representa una secuencia de s aminoácidos X^2 , en las que:

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

- 35 p es un número entero de 12 a 199, preferiblemente de 12 a 99, más preferiblemente 12 a 74;

a y b son independientemente un número entero de 0 a 50, preferiblemente 0 a 20, y más preferiblemente de 0 a 10;

q y r son independientemente 0 o 1, siendo al menos uno 1; y

s es un número entero de 0 a 10;

- 40 con la condición de que la suma p+(a·q)+(b·r)+s sea como máximo 199, preferiblemente como máximo 99, e incluso más preferiblemente 74,

Los polipéptidos ilustrados anteriormente comprenden preferiblemente al menos un resto de O-glicano y/o al menos un resto de sulfato unido a un aminoácido de la secuencia.

Según una realización preferida, el polipéptido ilustrado anterior está en forma homodimérica.

Según una realización particularmente preferida, dicho polipéptido consiste en una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, los dos restos de cisteína de la secuencia pueden unirse a los restos de cisteína respectivos de una secuencia correspondiente, para proporcionar el polipéptido en forma dimérica.

- 5 La descripción se refiere además a precursores de dichas microvesículas llenas de gas, en forma de polvo seco o resto liofilizado. Dicho precursor es en particular reconstituible en presencia de un gas poniéndolo en contacto con un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable, para formar una suspensión acuosa de dichas microvesículas llenas de gas al agitar la mezcla.

- 10 Otro aspecto de la descripción se refiere a un kit farmacéutico que comprende un precursor de dichas microvesículas llenas de gas y un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

- 15 La expresión “microvesículas llenas de gas” incluye cualquier estructura que comprenda burbujas de gas de tamaño micrométrico o nanométrico rodeadas por una envoltura o capa (incluyendo capas formadoras de película) de un material estabilizador. La expresión incluye lo que se conoce en la técnica como liposomas, microburbujas, microesferas, microglobos o microcápsulas llenos de gas. Las microvesículas se suspenden típicamente en un vehículo acuoso, en particular un vehículo acuoso fisiológicamente aceptable. El material estabilizador puede ser cualquier material conocido típicamente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, tensioactivos, lípidos, esfingolípidos, oligolípidos, fosfolípidos, proteínas, polipéptidos, hidratos de carbono, y materiales poliméricos sintéticos o naturales.

- 20 El término “microburbujas” incluye burbujas de gas suspendidas en un vehículo acuoso, que están unidas en la interfaz gas/líquido por una envoltura muy delgada (película) que involucra un material anfifílico estabilizador dispuesto en la interfaz gas-líquido (a veces mencionada en la técnica como envoltura “evanescente”). Las suspensiones de microburbujas se pueden preparar poniendo en contacto un precursor adecuado de las mismas, tales como materiales anfifílicos en polvo (por ejemplo, liposomas preformados liofilizados o dispersiones o disoluciones de fosfolípidos liofilizados o secadas por aspersión), con aire u otro gas, y después con un vehículo acuoso, mientras se agita para
25 generar una suspensión de microburbujas que entonces se puede administrar, preferiblemente poco después de su preparación. Ejemplos de suspensiones acuosas de microburbujas de gas, de precursores, y de su preparación, se describen, 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 y WO 04/069284.

- 30 Los términos “microglobos” o “microcápsulas” incluyen suspensiones en las que las burbujas de gas están rodeadas por una envoltura de material sólido de un lípido o de polímeros naturales o sintéticos. Ejemplos de microglobos y de la preparación de los mismos se describen, por ejemplo, en los documentos US 5.711.933 y US 6.333.021.

El término polipéptido, como se usa aquí, incluye secuencias de aminoácidos, que pueden ser aminoácidos sintéticos o, preferiblemente, naturales.

- 35 La expresión “ligando seleccionador de dianas” incluye cualquier compuesto, fragmento o resto que tenga o sea capaz de promover una actividad seleccionadora de dianas hacia tejidos y/o receptores *in vivo*. Las dianas con las que se puede asociar un ligando seleccionador de dianas incluyen tejidos tales como, por ejemplo, tejido miocárdico (que incluye células de miocardio y cardiomiocitos), tejidos membranosos (que incluyen endotelio y epitelio), láminas, tejido conjuntivo (que incluye tejido intersticial), o tumores; coágulos de sangre; y receptores tales como, por ejemplo, receptores de superficie celular para hormonas peptídicas, neurotransmisores, antígenos, fragmentos del complemento, e inmunoglobulinas. La expresión incluye en particular polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que exhiben afinidad de unión (“secuencias activas”) por selectinas, particularmente por P-selectina; dichas secuencias activas incluyen, por ejemplo, los aminoácidos 5-16, 1-19, 5-41 y 1-47 como se expone en SEQ ID NO: 1.

- 45 La expresión “microvesícula llena de gas seleccionada como dianas” incluye cualquier microvesícula llena de gas que comprenda al menos un ligando seleccionador de dianas en su formulación.

- La expresión “intermedio de una microvesícula llena de gas seleccionada como diana” incluye cualquier microvesícula llena de gas que se pueda convertir en una microvesícula llena de gas seleccionada como diana. Dicho intermedio puede incluir, por ejemplo, microvesículas llenas de gas (o precursores de las mismas) que incluyen un resto reactivo adecuado (por ejemplo, maleimida), que se puede hacer reaccionar con un reactivo complementario correspondiente (por ejemplo, tiol) unido a un ligando seleccionador de dianas.
50

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

- 55 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 del anticuerpo. Al unirse a proteínas específicas,

el dominio Fc asegura que cada anticuerpo genere una respuesta inmune apropiada para un antígeno dado. Este dominio Fc también se une a diversos receptores celulares, tales como los receptores Fc, y otras moléculas inmunes, tales como las proteínas del complemento. Al hacer esto, media diferentes efectos fisiológicos que incluyen opsonización, lisis celular, y desgranulación de mastocitos, basófilos y eosinófilos. Las secuencias de dominio Fc de longitud completa comprenden secuencias de aminoácidos no modificadas (originales) o secuencias de aminoácidos correspondientes en las que se han mutado uno o más aminoácidos no esenciales. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos 49 a 272 de SEQ ID NO: 4 corresponde al dominio Fc de longitud completa de la inmunoglobulina IgG₁, con las dos excepciones de los aminoácidos 59 y 62 (en los que los restos de Leu y Gly de la secuencia Fc original han sido reemplazados por restos de Ala).

La expresión "agente terapéutico" incluye en su significado cualquier compuesto, fragmento o resto que pueda usarse en cualquier aplicación terapéutica, tal como en métodos para el tratamiento de una enfermedad en un paciente, así como cualquier sustancia que sea capaz de ejercer un responsable de ejercer un efecto biológico in vitro y/o in vivo. Los agentes terapéuticos incluyen así cualquier compuesto o material que se pueda usar en el tratamiento (incluyendo la prevención, el alivio, el alivio del dolor, o cura) de cualquier estado patológico en un paciente (incluyendo una dolencia, aflicción, enfermedad, lesión o herida). Ejemplos de agentes terapéuticos son fármacos, productos farmacéuticos, agentes bioactivos, agentes citotóxicos, agentes de quimioterapia, agentes radioterapéuticos, proteínas, péptidos naturales o sintéticos, incluyendo oligopéptidos y polipéptidos, vitaminas, esteroides, y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, y plásmidos.

La expresión "vehículo acuoso fisiológicamente aceptable" incluye vehículos líquidos que se emplean generalmente para inyecciones, tales como, por ejemplo, agua, normalmente estéril, agua libre de pirógenos (para evitar la mayor contaminación posible en el producto liofilizado intermedio), disoluciones acuosas tales como disolución salina (que puede equilibrarse ventajosamente de modo que el producto final para inyección no sea hipotónico), o disoluciones acuosas de una o más sustancias que ajustan la tonicidad tales como sales o azúcares, alcoholes de azúcar, glicoles u otros materiales poliólicos no iónicos (por ejemplo glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, glicerol, polietilenglicoles, propilenglicoles, y similares).

Microvesículas llenas de gas

Según un aspecto de la presente descripción, las microvesículas llenas de gas asociadas con un ligando seleccionador de dianas como se definió anteriormente son microburbujas.

Los componentes adecuados para formar una envoltura estabilizadora de microburbujas comprenden, por ejemplo, fosfolípidos; lisofosfolípidos; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico o ácido oleico; lípidos que portan 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 enlazados mediante éter o éster; lípidos polimerizados; fosfato de diacetilo; fosfato de dicetilo; ceramidas; ésteres de ácidos grasos polioxietilenados (tales como estearatos de ácidos grasos polioxietilenados), alcoholes grasos polioxietilenados, éteres de alcoholes grasos polioxietilenados, ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxetilado, polietilenglicol-ricinoleato de glicerol, esteroides de soja etoxilados, aceite de ricino etoxilado, o copolímeros de bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO); ésteres de esterol con ácido alifático, que incluyen butirato de colesterol, isobutirato de colesterol, palmitato de colesterol, estearato de colesterol, acetato de lanosterol, palmitato de ergosterol, o n-butirato de fitosterol; ésteres de esterol con 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 con alcoholes, que incluyen glucurónido de laurilo, glucurónido de estearoilo, glucurónido de miristoilo, gluconato de laurilo, gluconato miristoilo, o gluconato de estearoilo; ésteres de azúcares con ácidos alifáticos, que incluyen laurato de sacarosa, laurato de fructosa, palmitato de sacarosa, estearato de sacarosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, o ácido poliurónico; saponinas, que incluyen sarsasapogenina, esmilagenina, hederagenina, ácido oleanólico, o digitoxigenina; glicerol o ésteres de glicerol, que incluyen 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 laurílico, alcohol miristílico, alcohol cetílico, o alcohol n-octadecílico; 6-(5-colesten-3 β -iloxi)-1-tio- β -D-galactopiranosido; digalactosildiglicérido; 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-aminopalmítico; 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), preferiblemente (C₁₄-C₁₈), 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 dimetildiocetadecilamonio (DDAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); sales de amonio terciario o cuaternario, que comprenden una o preferiblemente dos cadenas de acilo (C₁₀-C₂₀), preferiblemente (C₁₄-C₁₈), enlazadas al átomo de N a través de un puente de alquileo (C₃-C₆), 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.

Dependiendo de la combinación de componentes y del procedimiento de fabricación de las microburbujas, los compuestos ejemplares enumerados anteriormente pueden emplearse como el compuesto principal para formar la envoltura de las microburbujas o como simples aditivos, estando de este modo presentes solo en cantidades menores.

Según un aspecto preferido, al menos uno de los compuestos que forman la envoltura de las microburbujas es un compuesto anfílico (es decir, una molécula orgánica que comprende un resto hidrófilo y lipófilo), preferiblemente un fosfolípido, opcionalmente mezclado con cualquiera de los demás materiales citados anteriormente. Según la presente descripción, el término fosfolípido pretende abarcar cualquier compuesto de fosfolípido anfílico, cuyas moléculas sean capaces de formar una película estabilizadora de material (típicamente en forma de una capa monomolecular) en la interfase límite gas-agua en la suspensión final de microburbujas. Por consiguiente, estos materiales también se denominan en la técnica "fosfolípidos formadores de película".

Los compuestos de fosfolípidos anfílicos contienen típicamente al menos un grupo fosfato y al menos uno, preferiblemente dos, grupos hidrocarbonados lipófilos de cadena larga.

Ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen ésteres de glicerol con uno o preferiblemente dos (iguales o diferentes) restos de ácidos grasos y con ácido fosfórico, en los que el resto 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 - PI). Los ésteres de fosfolípidos con un solo resto de ácido graso se denominan generalmente en la técnica las formas "liso" del fosfolípido, o "lisofosfolípidos". Los restos de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos son en general ácidos alifáticos de cadena larga, que contienen típicamente de 12 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 14 a 22; la cadena alifática puede contener una o más insaturaciones, o preferiblemente está completamente saturada. 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. Preferiblemente, 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 esfingomielinas, es decir, aquellos análogos de fosfatidilcolina en los que el resto 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 gangliósidos GM1 (o GM2) o cerebrósidos; glucolípidos; sulfátidos, y glicoesfingolípidos.

Como se usa aquí, el término fosfolípidos incluye productos naturales, semisintéticos, o preparados sintéticamente, que pueden emplearse individualmente o como mezclas.

Ejemplos de fosfolípidos de origen natural son lecitinas naturales (derivados de fosfatidilcolina (PC)) tales como, típicamente, lecitinas de soja o yema de huevo.

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

Ejemplos de fosfolípidos preferidos son, por ejemplo, dilauoil-fosfatidilcolina (DLPC), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), diaraquidoil-fosfatidilcolina (DAPC), distearoil-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-oleil-2-palmitoil-fosfatidilcolina (OPPC), dilauoil-fosfatidilglicerol (DLPG) y sus sales de metales alcalinos, diaraquidoilfosfatidilglicerol (DAPG) y sus sales de metales alcalinos, dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y sus sales de metales alcalinos, dioleoil-fosfatidilglicerol (DOPG) y sus sales de metales alcalinos, 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 diaraquidoilfosfatídico (DAPA) y sus sales de metales alcalinos, dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleilfosfatidil-etanolamina (DOPE), diaraquidoilfosfatidil-etanolamina (DAPE), dilinoleilfosfatidiletanolamina (DLPE), dimiristoilfosfatidilserina (DMPS), diaraquidoilfosfatidilserina (DAPS), dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS), distearoilfosfatidilserina (DSPS), dioleilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoilesfingomielina (DPSP), y diestearoilesfingomielina (DSSP), dilauoil-fosfatidilinositol (DLPI), diaraquidoilfosfatidilinositol (DAPI), dimiristoilfosfatidilinositol (DMPI), dipalmitoilfosfatidilinositol (DPPI), distearoilfosfatidilinositol (DSPI), dioleoil-fosfatidilinositol (DOPI).

Los fosfolípidos adecuados incluyen además fosfolípidos modificados uniendo un polímero hidrófilo, tal como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG), a los mismos. Los fosfolípidos modificados con polímero preferidos incluyen "fosfolípidos pegilados", es decir, fosfolípidos unidos a un polímero de PEG. Ejemplos de fosfolípidos

pegilados son fosfatidiletanolaminas pegiladas (abreviadamente "PE-PEG"), es decir, fosfatidiletanolaminas en las que el resto de etanolamina hidrófilo está unido a una molécula de PEG de peso molecular variable (por ejemplo, de 300 a 20000 daltons, preferiblemente de 500 a 5000 daltons), tales 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 de alrededor de 2000.

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

También se pueden 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 aspectos preferidos, el fosfolípido es el componente principal de la envoltura estabilizadora de microburbujas, que da cuenta de al menos 50% (p/p) de la cantidad total de componentes que forman la envoltura de las microburbujas llenas de gas. En algunos de los aspectos preferidos, sustancialmente la totalidad de la envoltura (es decir, al menos el 80%, y hasta el 100% en peso) puede estar formada por fosfolípidos.

Los fosfolípidos pueden usarse convenientemente mezclados con cualquiera de los compuestos enumerados anteriormente. Así, por ejemplo, sustancias tales como colesterol, ergosterol, fitosterol, sitosterol, lanosterol, tocoferol, galato de propilo o palmitato de ascorbilo, ácidos grasos tales como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico y derivados de los mismos, o hidroxitolueno butilado y/u otros compuestos no fosfolipídicos se pueden añadir opcionalmente a uno o más de los fosfolípidos anteriores en proporciones que oscilan entre el 0 y el 50% en peso, preferiblemente hasta el 25%. Particularmente preferidos son los compuestos anfífilos, tales como ácidos carboxílicos de C₁₀-C₂₀, preferiblemente ácido palmítico.

Según un aspecto preferido, la envoltura de microburbujas según la descripción incluye un compuesto que posee una carga neta global (positiva o negativa). Dicho compuesto puede ser un material anfífilo cargado, preferiblemente un lípido o un fosfolípido.

Ejemplos de fosfolípidos que portan una carga negativa global son derivados, en particular derivados de diésteres de ácidos grasos, 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, como moléculas cargadas negativamente, pueden utilizarse fosfolípidos modificados, en particular fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, tales como DPPE-PEG o DSPE-PEG. También, como compuestos cargados negativamente, se puede usar ventajosamente la lisoforma de los fosfolípidos citados anteriormente, tales como derivados de lisofosfatidilserina (por ejemplo, liso-DMPS, -DPPS o -DSPS), derivados del ácido lisofosfatídico (por ejemplo, liso-DMPA, -DPPA o -DSPA), y derivados de lisofosfatidilglicerol (por ejemplo, liso-DMPG, -DPPG o -DSPG). Otros ejemplos de compuestos cargados negativamente son sales de ácidos biliares tales como sales de ácido cólico, sales de ácido desoxicólico, o sales de ácido glicocólico; y sales de ácidos grasos (C₁₂-C₂₄), preferiblemente (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.

Preferiblemente, el compuesto cargado negativamente se selecciona entre DPPA, DPPS, DSPG, DPPG, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG5000, o mezclas de los mismos.

El componente cargado negativamente se asocia típicamente con un contraión positivo correspondiente, que puede ser mono- (por ejemplo, un metal alcalino o amonio), di- (por ejemplo, un metal alcalino-térreo) o trivalente (por ejemplo, aluminio). Preferiblemente, el contraión se selecciona entre cationes de metales alcalinos, tales como Na⁺ o K⁺, más preferiblemente Na⁺.

Ejemplos de fosfolípidos que poseen una carga positiva global son derivados de etilfosfatidilcolina, en particular diésteres 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 preferiblemente un ión haluro, en particular un ión cloruro o bromuro. Ejemplos de compuestos cargados positivamente que pueden incorporarse a la envoltura de microburbujas son sales de mono, di-, tri- o tetra-alkilamonio con un contraión de haluro (por ejemplo, cloruro o bromuro) que comprende al menos una cadena de alquilo (C₁₀-C₂₀), preferiblemente (C₁₄-C₁₈), tal como, por ejemplo, cloruro de mono- o di-estearilamonio, cloruro de mono- o di-hexadecilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Otros ejemplos de compuestos cargados positivamente que se pueden incorporar en la envoltura de microburbujas son sales de amonio terciario o cuaternario con un contraión de haluro (por ejemplo, cloruro o bromuro) que comprende una o preferiblemente dos cadenas de acilo (C₁₀-C₂₀), preferiblemente (C₁₄-C₁₈), unidas al átomo de N a través de un puente de alquileo (C₃-C₆), 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), o 1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (DSDAP).

DSEPC, DPEPC y/o DSTAP se emplean preferiblemente como compuestos cargados positivamente en la envoltura de microburbujas.

El componente cargado positivamente se asocia típicamente con un contraión negativo correspondiente, que puede ser mono- (por ejemplo, haluro), di- (por ejemplo, sulfato) o trivalente (por ejemplo, fosfato). Preferiblemente, el contraión se selecciona de entre los iones haluro, tales como F⁻ (flúor), Cl⁻ (cloro) o Br⁻ (bromo).

- 5 Para formar la envoltura de microburbujas, se pueden emplear satisfactoriamente mezclas de compuestos neutros y cargados, en particular de fosfolípidos y/o lípidos. La cantidad de lípido o fosfolípido cargado puede variar desde alrededor de 95% en moles hasta alrededor de 0,1% en moles, con respecto a la cantidad total de lípido y fosfolípido, preferiblemente desde 80% en moles hasta 0,5% en moles.

Las mezclas preferidas 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.

- 10 Cualquiera de los componentes ilustrados anteriormente útiles para formar la envoltura estabilizadora de la microvesícula llena de gas, en particular fosfolípidos, preferiblemente fosfolípidos pegilados, se puede modificar insertando un resto reactivo adecuado en el mismo, para permitir la unión de compuestos adecuados, tal como un ligando seleccionador de dianas que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, un fosfolípido pegilado (por ejemplo, DSPE-PEG2000) puede comprender un resto reactivo terminal (por ejemplo, maleimida, abreviadamente "mal", que forma así un componente DSPE-PEG-mal) capaz de reaccionar (covalentemente) con un resto reactivo correspondiente en un compuesto que comprende la secuencia anterior. En lo siguiente de esta memoria descriptiva se ilustran ejemplos de restos reactivos adecuados adicionales.

- 20 Según un aspecto alternativo, el componente de ligando seleccionador de dianas puede asociarse con microcápsulas llenas de gas. Los ejemplos preferidos de microcápsulas son aquellas que tienen una envoltura estabilizadora que comprende un polímero, preferiblemente un polímero biodegradable, o un lípido insoluble en agua biodegradable (tal como tripalmitina) opcionalmente mezclado con un polímero biodegradable. En los documentos US 5.711.933 y US 6.333.021, por ejemplo, se describen ejemplos de microcápsulas adecuadas y de la preparación de las mismas. También se pueden emplear microcápsulas que tienen una envoltura proteica, es decir, hechas de proteínas naturales (albúmina, hemoglobina), tales como las descritas en los documentos US-A-4.276.885 o EP-A-0 324 938. El ligando seleccionador de dianas se puede incorporar en las microcápsulas, por ejemplo uniéndolo a un componente formador de envoltura de las microcápsulas, según los métodos de preparación ilustrados anteriormente, o mezclando con los componentes que forman la envoltura de las microcápsulas un componente anfífilico, tales como los ilustrados anteriormente, unido covalentemente al ligando seleccionador de dianas.

- 30 Otros excipientes o aditivos pueden estar presentes en la formulación seca de las microvesículas, o pueden añadirse junto con el vehículo acuoso utilizado para la reconstitución de las mismas, sin estar necesariamente involucrados (o solo parcialmente) en la formación de la envoltura estabilizadora de las microvesículas. Estos incluyen reguladores de pH (tales como histidina), ajustadores de osmolalidad, potenciadores de viscosidad, emulsionantes, agentes de carga, etc., y pueden usarse en cantidades convencionales. Por ejemplo, se pueden usar compuestos como polioxipropilenglicol y polioxietilenglicol, así como sus copolímeros. Ejemplos de estabilizadores o potenciadores de la viscosidad son compuestos seleccionados de polisacáridos y oligosacáridos lineales y reticulados, azúcares, y polímeros hidrófilos tales como polietilenglicol.

- 35 Puesto que la preparación de microvesículas llenas de gas puede implicar una etapa de liofilización o secado por pulverización, puede ser ventajoso incluir en la formulación un aditivo de liofilización, tal como un agente con efecto crioprotector y/o lioprotector, y/o un agente de carga, por ejemplo un aminoácido tal como glicina; un hidrato de carbono, por ejemplo un azúcar tal como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa, glucosa, lactosa, o una ciclodextrina, o un polisacárido tal como dextrano; o un polioxialquilenglicol tal como polietilenglicol. Típicamente, la cantidad de aditivo de liofilización puede oscilar de alrededor de 10 a alrededor de 1000 veces (p/p) la cantidad de componentes formadores de microvesículas.

- 40 Para llenar las microvesículas anteriores, puede emplearse cualquier gas biocompatible, precursor de gas, o mezcla de los mismos (de aquí en adelante también identificado como "gas formador de microvesículas").

- 45 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 gas radiactivo tal como Xe¹³³ o Kr⁸¹; un gas noble hiperpolarizado tal como helio hiperpolarizado, xenón hiperpolarizado, o neón hiperpolarizado; un hidrocarburo de bajo peso molecular (por ejemplo, que contiene 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 ciclopentano, un alqueno tal como propeno, buteno o isobuteno, o un alquino tal como acetileno; un éter; una cetona; un éster; gases halogenados, preferiblemente gases fluorados, tales como hidrocarburos de bajo peso molecular halogenados, fluorados o perfluorados (por ejemplo, que contienen hasta 7 átomos de carbono); o una mezcla de cualquiera de los anteriores. Cuando se usa un hidrocarburo halogenado, preferiblemente al menos algunos, más preferiblemente todos, los átomos de halógeno en dicho compuesto son átomos de flúor.

Se prefieren los gases fluorados, en particular los gases perfluorados, especialmente en el campo de la formación de imágenes por ultrasonidos. 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, preferiblemente perfluoradas, tales como perfluoroacetona; y éteres fluorados, preferiblemente perfluorados, tales como perfluorodietiléter. Los compuestos preferidos son gases perfluorados, tales como SF₆ o perfluorocarbonos (hidrocarburos perfluorados), es decir, hidrocarburos en los que todos los átomos de hidrógeno son reemplazados por átomos de flúor, que se sabe que forman suspensiones de microburbujas particularmente estables, como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0554 213.

El término perfluorocarbono incluye perfluorocarbonos saturados, insaturados y cíclicos. Ejemplos de perfluorocarbonos fisiológicamente aceptables biocompatibles 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-2-eno), o perfluorobutadieno; perfluoroalquinos (por ejemplo, perfluorobut-2-ino); y perfluorocicloalcanos (por ejemplo, perfluorociclobutano, perfluorometilciclobutano, perfluorodimetilciclobutanos, perfluorotrimetilciclobutanos, perfluorociclopentano, perfluorometilciclopentano, perfluorodimetilciclopentanos, perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano y perfluorocicloheptano). Los perfluorocarbonos saturados preferidos incluyen, por ejemplo, CF₄, C₂F₆, C₃F₈, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₂ y C₆F₁₂.

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 estable de microburbujas, tal como hexafluoruro de azufre o un perfluorocarbono como se indicó anteriormente. En el documento WO 94/09829, por ejemplo, se pueden encontrar ejemplos de mezclas de gases adecuadas. Se prefieren particularmente las siguientes combinaciones: una mezcla de gases (A) y (B) en la que el gas (B) es un gas fluorado, seleccionado entre los ilustrados anteriormente, incluyendo mezclas de los mismos, y (A) se selecciona de aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, o mezclas de los mismos. La cantidad de gas (B) puede representar de alrededor de 0,5% a alrededor de 95% v/v de la mezcla total, preferiblemente de alrededor de 5% a 80%.

Los gases particularmente preferidos son SF₆, C₃F₈, C₄F₁₀, o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclados con aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, o mezclas de los mismos.

En ciertas circunstancias, puede ser deseable incluir un precursor de una sustancia gaseosa (es decir, un material que pueda convertirse en gas in vivo). Preferiblemente, el precursor gaseoso y el gas derivado del mismo son fisiológicamente aceptables. El precursor gaseoso puede activarse por pH, fotoactivarse, activarse por 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 fase líquido/gas por encima de la temperatura ambiente (o la temperatura a la que se producen y/o almacenan los agentes) pero por debajo de la temperatura corporal; de este modo, se someten a una transición de fase líquido/gas y se convierten en gas dentro del cuerpo humano.

Para el uso en MRI, las microvesículas contendrán preferiblemente un gas noble hiperpolarizado, tal como neón hiperpolarizado, helio hiperpolarizado, xenón hiperpolarizado, o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclado con aire, dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno, helio, xenón, o cualquiera de los hidrocarburos halogenados como se definieron anteriormente.

Para uso en gammagrafía, la microvesícula contendrá preferiblemente gases radiactivos tales como Xe¹³³ o Kr⁸¹, o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclados con aire, dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno, helio, kriptón, o cualquiera de los hidrocarburos halogenados como se definieron anteriormente.

Ligando seleccionador de dianas

El polipéptido asociado con el compuesto anfifílico en un constructo seleccionador de dianas según la presente invención comprende al menos una parte de la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 que exhibe afinidad de unión por selectinas, particularmente por P-selectina. En particular, dicho polipéptido comprende al menos los aminoácidos 5-16 de SEQ ID NO: 1, correspondientes a los aminoácidos 46-57 del "ligando 1 de glicoproteína de P-selectina" (PSGL-1, nº de acc. GenBank Q14242.1). Según una realización preferida, el ligando seleccionador de dianas comprende al menos los aminoácidos 1-19, más preferiblemente al menos los aminoácidos 5-41, e incluso más preferiblemente al menos los aminoácidos 1-47 como se expone en SEQ ID NO: 1 (estos últimos correspondientes a los aminoácidos 42-88 del "ligando 1 de glicoproteína de P-selectina").

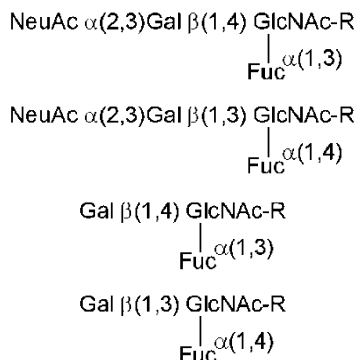
El "ligando 1 de glicoproteína de P-selectina" y los polipéptidos que comprenden las secuencias activas ilustradas anteriormente, incluyendo SEQ ID NO: 1, comprenden preferiblemente un resto de glicano unido a al menos un aminoácido de dichas secuencias.

La expresión "resto de glicano" comprende restos de glicano unidos a O (unidos al átomo de oxígeno de grupos hidroxilo de restos de aminoácidos tales como serina, treonina, tirosina, hidroxitirosina, o hidroxiprolina) y restos de glicano unidos a N (unidos al átomo de nitrógeno de grupos amino terciarios de aminoácidos, tal como asparagina).

Los glicanos unidos a O comprenden típicamente restos 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 a O consisten preferiblemente en una estructura de sialil-Lewis x (sLe^x, ácido siálico-galactopiranosil-fucosa-N-acetilglucosamina).

- 5 Los glicanos unidos a N comprenden típicamente un núcleo pentasacárido (Man3GlcNAc2). Las cadenas de tipo complejo pueden presentar estructuras mono-, bi-, tri- (2,4 y 2,6 ramificadas), tetra- y pentaantenarias. Pueden comprender además diversos sacáridos tales como galactosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa, y combinaciones de los mismos.

10 El polipéptido contiene preferiblemente uno o más de los siguientes glicanos (o mezclas de los mismos) unidos a un aminoácido de la secuencia:



- 15 en las que:

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

Los restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que opcionalmente pueden portar un resto de glicano como se definió anteriormente comprenden: (a) aminoácidos en la posición 16, 25, 26, 28, 29, 32, 36, 39, 40 o 41, que portan preferiblemente restos de glicano unidos a O; y/o (b) aminoácido en la posición 24 que porta preferiblemente restos de glicano unidos a N.

Ventajosamente, SEQ ID 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, p. 520-528).

- 25 Además, al menos un resto de tirosina en la posición 5, 7 y/o 10 de SEQ ID NO: 1 puede estar opcionalmente sulfatado (TyrSO₃). Más preferiblemente, al menos dos, e incluso más preferiblemente todos los tres restos de tirosina, pueden contener un grupo sulfato.

El polipéptido es una secuencia de aminoácidos de 12 a 200, más preferiblemente de 12 a 100, restos de aminoácidos de longitud, y comprende un resto reactivo capaz de reaccionar con un resto reactivo correspondiente de un componente de una microvesícula. Es particularmente preferida una secuencia de aminoácidos de 12 a 75 restos de aminoácidos, incluso más preferiblemente de 12 a 50 restos.

Según una realización preferida, el polipéptido comprende un aminoácido que posee un resto reactivo. Preferiblemente, dicho aminoácido se selecciona del grupo que consiste en: cisteína y/o un aminoácido básico, preferiblemente lisina. Preferiblemente, dicho resto reactivo está en la posición C-terminal del polipéptido, siendo preferiblemente lisina. En una realización preferida, la presencia de un único resto reactivo (en particular, lisina) en el término C-terminal de la secuencia polipeptídica permite una funcionalización controlada de dicho grupo y una posterior condición de reacción eficaz con un grupo reactivo correspondiente en un componente de la microvesícula. Por otro lado, la presencia de una pluralidad de grupos de lisina reactivos en una cadena peptídica (tal como en el caso de la porción Fc de SEQ ID 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 de los diversos grupos reactivos del péptido se unirá al componente de las microvesículas.

Los polipéptidos preferidos son los representados por la fórmula (I), y más preferiblemente la fórmula (II), como se ilustró previamente.

- 45 En una realización preferida, el polipéptido comprende los aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unidos a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 o a un fragmento N-terminal de la misma, en la que dicho fragmento corresponde a los aminoácidos 1-20, 1-15, 1-10, 1-5 o 1-4 de SEQ ID NO: 2.

Cuando el fragmento N-terminal es un resto de un solo aminoácido, dicho aminoácido es preferiblemente una prolina (Pro).

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

- 5 El polipéptido de fusión se puede obtener mediante 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 enlaces peptídico en el lado C-terminal de los restos 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 madura rPSGL-Ig, proporcionando una secuencia dimérica que contiene un único resto de lisina (C-terminal) (aminoácido en posición 71 en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) para cada secuencia del dímero, que puede emplearse ventajosamente para el procedimiento de unión posterior del polipéptido a un compuesto anfifílico adecuado.

- 15 Alternativamente, el polipéptido se puede obtener mediante la producción de proteína recombinante a partir de un ADN hecho a medida. Brevemente, se prepara un plásmido insertando la secuencia de ADNc del polipéptido deseado en un vector plasmídico. A continuación, el vector plasmídico se asocia con un sistema de expresión adecuado para producir el polipéptido recombinante (por ejemplo, como se expone en SEQ ID NO: 3). Ejemplos de sistemas de expresión adecuados incluyen células de mamífero, tales como células CHO (células de ovario de hámster chino), células HEK293 (células 293 de riñón embrionario humano), células Sp2/0 (línea celular de mieloma de ratón), células MEL (células de eritroleucemia de ratón), o células COS (células de riñón del mono que portan el material genético SV40); células de insectos, tales como líneas celulares Sf9; células que contienen virus, tales como células BEVS (sistema de vector de expresión de baculovirus); o sistemas de expresión basados en plantas, tales como hojas de tabaco, maíz, células de arroz o patatas transgénicas. Lo más preferible, las células CHO que expresan de manera estable core-2 β 1,6N-acetilglucosaminiltransferasa (C2GlcNAcT-I) y α -1,3-fucosiltransferasa-VII (fucT-VII) se transfectan con el ADNc que codifica el polipéptido. Se seleccionan las células que expresan permanentemente el polipéptido recombinante. Después, estas células se transfieren a un biorreactor para permitir la producción a gran escala del polipéptido.

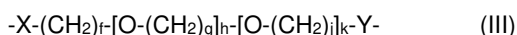
El polipéptido recombinante se obtiene en forma dimérica, en particular en forma homodimérica. En general, la dimerización de péptidos es un proceso natural que ocurre en las células que expresan el polipéptido recombinante, típicamente durante la modificación post-traducciona (PTM) del polipéptido.

- 30 La técnica de preparación recombinante anterior puede usarse para preparar un polipéptido según la invención, que comprende cualquier aminoácido de secuencia activa que exhiba afinidad de unión por selectinas, particularmente p-selectina, como se expone anteriormente (incluyendo el polipéptido como se expone en SEQ ID NO: 3), en forma dimérica. En una realización particularmente preferida, el método puede usarse para preparar un polipéptido que contiene un único aminoácido de lisina (preferiblemente en posición terminal, particularmente en posición C-terminal) y que comprende cualquiera de las secuencias activas ilustradas anteriormente.

Para proporcionar la forma dimérica preferida para asociarla con el compuesto anfifílico, el polipéptido comprende preferiblemente en su secuencia uno o más restos de cisteína que están unidos a uno o más restos de cisteína respectivos en una secuencia polipeptídica correspondiente, para formar al menos uno (preferiblemente al menos dos) puentes de disulfuro entre las dos secuencias.

- 40 En una realización de la invención, el polipéptido se puede unir al componente anfifílico a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados son preferiblemente restos hidrófilos, que contienen típicamente en la cadena principal unidades de oxietileno repetidas.

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



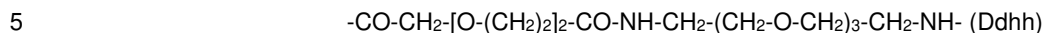
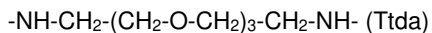
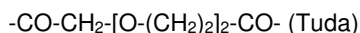
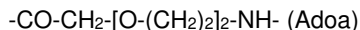
- 45 en la que

f, g, h y j representan independientemente un número entero de 1 a 4, k representa un número entero de 0 a 4, y X e Y representan respectivamente restos reactivos respectivos para unir el enlazador al polipéptido, en un extremo, y al componente anfifílico, en el otro extremo.

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

- 55 Los ejemplos de dichos restos reactivos incluyen grupos amino (-NH₂, que forman el resto de unión -NH-), grupos carboxilo (-COOH, que forman el resto de unión -CO-), o grupos tiol (-SH, que forman el resto de unión -S-). Preferiblemente, dicho resto de unión es un grupo amino o carboxilo.

Los ejemplos preferidos de enlazadores de fórmula III son:



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

Ejemplos de enlazadores combinados son:

-Adoa-Adoa- o -Ddhh- (que está comprendido por los enlazadores Ttda- y Tuda-).

10 Los polisacáridos, que contienen restos de unión reactivos adecuados, son ejemplos adicionales de enlazadores adecuados.

La secuencia que comprende SEQ ID NO: 1, o fragmentos activos de la misma, y el enlazador deseado se pueden preparar según métodos convencionales de síntesis de péptidos.

El polipéptido se une covalentemente al componente anfifílico respectivo.

15 Por ejemplo, si el polipéptido incluye un grupo amino reactivo (por ejemplo, un grupo amino primario de lisina), se puede hacer reaccionar con el componente anfifílico que contiene un resto reactivo correspondiente adecuado, tal como un grupo isotiocianato (para formar un enlace de tiourea), un éster reactivo (para formar un enlace de amida), o un grupo aldehído (para formar un enlace de imina, que puede reducirse a un enlace de alquilamina).

20 Alternativamente, cuando el ligando seleccionador de dianas incluye un grupo tiol reactivo, los restos reactivos complementarios adecuados en el componente anfifílico pueden incluir derivados de haloacetilo, maleimidas (para formar un enlace de tioéter), o un disulfuro mixto que comprende un sulfuro en forma de un grupo 2-piridiltio (PDT) (que, tras la reacción con un tiol derivado del ligando seleccionador de dianas, da como resultado la formación de un enlace de disulfuro estable).

25 Alternativamente, según una realización de la invención, un ligando seleccionador de dianas que contiene un resto de amino reactivo (por ejemplo, un grupo amino secundario, en particular el grupo $-\text{NH}_2$ terminal) se puede hacer reaccionar primero con un compuesto que contiene azufre, para introducir un resto de tiol reactivo en el ligando seleccionador de dianas, que entonces se hace reaccionar con un resto complementario correspondiente en el componente anfifílico como se ilustra anteriormente. Ejemplos de compuestos que contienen azufre adecuados útiles para introducir un resto de tiol reactivo en un ligando seleccionador de dianas que contiene un resto de amino reactivo incluyen, por ejemplo: tioimidato (tal como reactivo de Traut), S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA), S-acetiltiopropionato de N-succinimidilo (SATP), o 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP). Se puede encontrar una descripción detallada de los agentes que contienen S, y las respectivas reacciones de tiolación, 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 derivatizado con maleimida (por ejemplo, fosfatidiletanolamina-PE-, o PE pegilada), y hacerlo reaccionar con un ligando seleccionador de dianas (por ejemplo, 30 SEQ ID NO: 3) en el que un grupo amino secundario (por ejemplo, el $-\text{NH}_2$ de lisina terminal) se ha hecho reaccionar previamente con un compuesto que contiene azufre (tal como los ilustrados anteriormente), para introducir un resto de tiol reactivo; el compuesto obtenido se puede utilizar entonces en la preparación de microvesículas llenas de gas seleccionadas como dianas.

40 Según una alternativa adicional, cuando el ligando seleccionador de dianas incluye un grupo carboxílico reactivo, los restos reactivos adecuados en el componente anfifílico pueden ser aminas e hidrazidas (para formar funciones amida o N-acilo, N'-alquilhidrazida).

45 Según una realización preferida, un ligando seleccionador de dianas que contiene un resto reactivo de amino (por ejemplo, en un resto de lisina), puede reaccionar primero con un compuesto que contiene maleimida, para introducir un resto de maleimida reactivo en el ligando seleccionador de dianas, que entonces se hace reaccionar con un resto complementario correspondiente en el componente de la microvesícula. Los agentes que contienen maleimida, útiles para introducir un resto de maleimida reactivo en un ligando seleccionador de dianas que contiene un resto de amino reactivo, y la reacción respectiva de adición del grupo maleimida son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de compuestos que contienen maleimida adecuados 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 (4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de succinimidilo), MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), SMCC (4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo), SMPB (4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo), reactivo SM (PEG) $_n$ (éster de succinimidil-(N-maleimidopropionamido)- 50

etilenglicol)), SMPH (6-((β-maleimidopropionamido)hexanoato) de succinimidilo), sulfo-EMCS (éster de N-(ε-maleimidocaproilo) sulfosuccinimida), sulfo-GMBS (éster de N-(γ-maleimidobutiroilo) sulfosuccinimida), sulfo-KMUS (éster de N-(κ-maleimidoundecanoilo) sulfosuccinimida), sulfo-MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida), sulfo-SMCC (4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo), sulfo-SMPB (4-(p-maleimidofenil)butirato) de sulfosuccinimidilo). Según una realización particularmente preferida, se puede hacer reaccionar un fosfolípido que contiene tiol (por ejemplo, fosfatidiletanolamina -PE- tiolada, o PE pegilada) con un ligando seleccionador de dianas (por ejemplo, SEQ ID NO: 3), en el que un grupo amino secundario (por ejemplo, el NH₂ de lisina terminal) se ha hecho reaccionar previamente con un compuesto que contiene maleimida (tal como los ilustrados previamente), para introducir un resto de maleimida reactivo en el mismo; el compuesto obtenido puede usarse entonces en la preparación de las microvesículas. El fosfolípido que contiene tiol se puede obtener, por ejemplo, haciendo reaccionar un grupo 2-piridilditio (PDT) unido a un fosfolípido con un agente reductor (tal como TCEP (hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina) para generar un resto de tiol reactivo en el fosfolípido. Ejemplos de fosfolípidos que contienen tiol incluyen 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanol de sodio, (de Avanti Polar Lipids, IUPAC: (R)-2,3-bis(palmitoiloxi)propil(2-mercaptoetil)fosfonato de sodio), o los que se pueden obtener por reducción química de precursores de piridiltio respectivos, tales como: (R)-2,3-bis (palmitoiloxi)propil(2-(3-mercaptopropanamido)etil)fosfato de sodio (de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato de sodio], Avanti Polar Lipids), (R)-2,3-bis(oleoiloxi)propil(2-(3-mercaptopropanamido)etil)fosfato de sodio (de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato de sodio], Avanti Polar Lipids), o (R)-2,3-bis(esteatiloiloxi)propil(2-(((2-(3-mercaptopropanamido)polietilenglicol 2000)carbonil)amino)etil)fosfato de amonio (de 1,2-diesteatoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[PDP(polietilenglicol)-2000], Avanti Polar Lipids).

Microvesículas llenas de gas seleccionadas como dianas

Las microvesículas seleccionadas como dianas que comprenden el constructo seleccionador de dianas de la invención se pueden producir según cualquier método conocido en la técnica, como se ilustra en los documentos de patente citados anteriormente.

Por ejemplo, el método de fabricación de microburbujas puede implicar la preparación de un material en polvo seco que comprende un material anfifílico como se indicó anteriormente, preferiblemente mediante liofilización (secado por congelación) de una suspensión/emulsión acuosa y/u orgánica que comprende dicho material. Dicho material en polvo seco, identificado en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones como "precursor" de las microvesículas llenas de gas, se pone entonces en contacto con una disolución fisiológicamente aceptable en presencia del gas deseado, para formar la suspensión deseada de microvesículas llenas de gas al agitar la mezcla.

Según el método de preparación descrito en el documento WO 91/15244, los compuestos anfifílicos formadores de película se pueden convertir primero en una forma laminar mediante cualquier método empleado para la formación de liposomas. Para este fin, una disolución acuosa que comprende los lípidos formadores de película y opcionalmente otros aditivos (por ejemplo, mejoradores de la viscosidad, tensioactivos no formadores de película, electrolitos, etc.) puede someterse a una homogeneización mecánica de alta velocidad o a ultrasonidos a frecuencias acústicas o ultrasónicas, y después se puede liofilizar para formar un polvo de flujo libre que entonces se almacena en presencia de un gas. Antes de la liofilización, se pueden llevar a cabo etapas de lavado opcionales, como se describe, por ejemplo, en el documento US 5.597.549.

Según un aspecto alternativo (descrito por ejemplo en el documento US 5.597.549), un compuesto formador de película y un estabilizador hidrófilo (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 C₂Cl₄F₂), y la disolución se puede liofilizar para formar un polvo seco.

Preferiblemente, como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO2004/069284, un fosfolípido (seleccionado entre los citados anteriormente y que incluye al menos uno de los fosfolípidos cargados identificados anteriormente) y un agente lioprotector (tales como los enumerados anteriormente, en particular hidratos de carbono, alcoholes de azúcar, poliglicoles, polioxialquilenglicoles, y mezclas de los mismos) pueden 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. La emulsión se puede obtener sometiéndola al medio acuoso y el disolvente en presencia de al menos un fosfolípido a cualquier técnica apropiada de generación de emulsión conocida en la técnica. Preferiblemente, el fosfolípido se dispersa en el medio acuoso antes de que este último se mezcle con el disolvente orgánico. Alternativamente, el fosfolípido se puede dispersar en el disolvente orgánico, o se puede añadir por separado a la mezcla acuosa-orgánica antes o durante la etapa de emulsionamiento. La microemulsión así obtenida, que contiene microgotitas de disolvente rodeadas y estabilizadas por el material fosfolipídico (y opcionalmente por otros compuestos filmógenos anfifílicos y/o aditivos), se liofiliza entonces según técnicas convencionales para obtener un material liofilizado, que se almacena (por ejemplo, en un vial en presencia de un gas adecuado) y que se puede reconstituir con un vehículo acuoso para finalmente dar una suspensión de microburbujas llenas de gas en la que las dimensiones y distribución de tamaño de las microburbujas son sustancialmente comparables con las dimensiones y distribución de tamaño de la suspensión de microgotas.

Un procedimiento 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 formadores de película anfífilos y/o aditivos) a una alta energía de agitación controlada (por ejemplo, por medio de una mezcladora de tipo rotor estator, o mediante ultrasonidos) en presencia de un gas deseado, y usando la mezcla obtenida como tal, o sometiendo la dispersión obtenida a liofilización para producir un producto reconstituible seco. Un ejemplo de este procedimiento se da, por ejemplo, en el documento WO97/29782.

También se pueden utilizar técnicas de secado por pulverización (como se describe, por ejemplo, en el documento US 5.605.673) para obtener un polvo seco, reconstituible al entrar en 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, estará generalmente en forma de polvo o torta, y se puede almacenar (por ejemplo, en un vial) en contacto con el gas deseado. El precursor se puede reconstituir fácilmente, en presencia del gas deseado, en un vehículo líquido acuoso adecuado fisiológicamente aceptable, que típicamente es inyectable, para formar las microburbujas llenas de gas, al agitar suavemente la suspensión. Los vehículos líquidos fisiológicamente aceptables adecuados son agua estéril, disoluciones acuosas tales como disolución salina (que puede ser ventajosamente equilibrada para que el producto final para inyección no sea hipotónico) o disoluciones de una o más sustancias que ajustan 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, propilenglicoles, y similares).

Según un aspecto de la descripción, un constructo seleccionador de dianas (es decir, que comprende el ligando seleccionador de dianas unido a un componente de la microvesícula) se puede mezclar como tal con los otros componentes de la formulación, de modo que se incorpore en la envoltura estabilizadora tras la reconstitución del material liofilizado obtenido según cualquiera de los métodos de preparación anteriores.

Alternativamente, la formulación inicial de microburbujas puede contener un componente funcionalizado intermedio adecuado (por ejemplo, una fosfatidiletanolamina que contiene maleimida), para producir un material liofilizado que contiene dicho intermedio; el ligando seleccionador de dianas, que contiene un resto reactivo complementario adecuado (por ejemplo, tiol), se une entonces, haciendo reaccionar los restos reactivos respectivos, al compuesto intermedio funcionalizado ya incorporado en la envoltura de las microburbujas reconstituidas.

En el caso del procedimiento descrito en el documento WO2004/069284, el constructo seleccionador de dianas que comprende el ligando seleccionador de dianas unido al componente de la microvesícula también se puede mezclar con los componentes de la mezcla inicial, sometándose a las etapas de emulsión y liofilización. Alternativamente, se puede preparar por separado una suspensión micelar que contiene el constructo seleccionador de dianas, y posteriormente se puede añadir a la emulsión ya formada (que contiene los otros componentes formadores de película), preferiblemente con calentamiento. Como anteriormente, en lugar del constructo formado, se puede usar alternativamente un intermedio funcionalizado, que entonces se puede hacer reaccionar en cualquier etapa del procedimiento (por ejemplo, en la fase de emulsión o tras la reconstitución del compuesto liofilizado) con un ligando seleccionador de dianas que contiene un resto reactivo complementario. Según un aspecto, un componente formador de envoltura funcionalizado (o constructo intermedio formador de envoltura/espaciador) se añade como una suspensión micelar a la emulsión formada, bajo agitación. A continuación, a la emulsión obtenida se añade el ligando seleccionador de dianas (que contiene el resto reactivo complementario).

Según un aspecto preferido, la secuencia peptídica como se expone en SEQ ID NO: 3, en forma dimérica, se hace reaccionar en primer lugar con un agente tiolante (seleccionado, por ejemplo, entre los ilustrados previamente) para introducir un grupo tiol reactivo en el grupo amino primario del resto de lisina C-terminal. El agente tiolante se emplea preferiblemente en un exceso molar con respecto al resto de lisina, preferiblemente de alrededor de 5 a 200 veces el exceso molar, más preferiblemente de 20 a 100 veces, e incluso más preferiblemente de alrededor de 50 veces. El péptido tiolado se añade entonces a una suspensión de un componente de microvesículas llenas de gas que contiene maleimida (por ejemplo, un fosfolípido pegilado modificado con maleimida, tal como DSPE-PEG-maleimida). Después, la mezcla se incuba, y el constructo obtenido (que comprende la SEQ ID NO: 3 y el componente de la microvesícula) se puede usar para las etapas de preparación posteriores de las microvesículas llenas de gas, como se ilustra anteriormente.

La cantidad de ligando seleccionador de dianas unido a la superficie de una microvesícula se selecciona de modo que proporcione preferiblemente una microvesícula multivalente, es decir, una microvesícula que comprende una pluralidad de ligando seleccionador de dianas en su superficie. En general, la microvesícula comprende al menos 200 moléculas seleccionadoras de diana por μm^2 de superficie de microvesículas, preferiblemente al menos 500 moléculas/ μm^2 , más preferiblemente al menos 1000 moléculas/ μm^2 , e incluso más preferiblemente al menos 2000 moléculas/ μm^2 . Por otro lado, como no se requiere necesariamente una concentración demasiado alta de ligando seleccionador de dianas en la superficie de la microvesícula, la microvesícula generalmente comprende menos de 15000 moléculas seleccionadoras de diana por μm^2 de superficie de microvesículas, preferiblemente menos de 12000 moléculas/ μm^2 , más preferiblemente menos de 10000 moléculas/ μm^2 , e incluso más preferiblemente menos de 8000 moléculas/ μm^2 .

La cantidad de ligando seleccionador de dianas unido a la superficie de una microvesícula se puede determinar según técnicas comunes conocidas en la técnica. Por ejemplo, en primer lugar se puede determinar la superficie total de la envoltura de las microvesículas en una suspensión de microvesículas, por ejemplo mediante una medida con un Coulter Counter. Después, se puede determinar la cantidad total de moléculas de ligando seleccionador de dianas en la suspensión de microvesículas, por ejemplo midiendo la cantidad total de un marcador químico del ligando seleccionador de dianas (por ejemplo, ácido siálico o un aminoácido específico), por ejemplo mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS). La densidad del ligando seleccionador de dianas en la superficie de las microvesículas se puede calcular entonces fácilmente.

Uso de microvesículas seleccionadas como dianas

Las microvesículas llenas de gas seleccionadas como dianas se pueden utilizar en cualquier análisis *in vitro* o *in vivo* que requiere la detección de receptores capaces de unirse al ligando seleccionador de dianas identificado anteriormente, tales como tejidos o células que expresan un receptor de selectina, preferiblemente receptores de E-selectina y/o P-selectina, más preferiblemente receptores de p-selectina. En particular, las microvesículas descritas aquí son útiles en métodos de diagnóstico para detectar posibles afecciones patológicas 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 P-selectina y/o E-selectina. Además, las microvesículas se pueden emplear como una herramienta de diagnóstico eficaz durante el tratamiento (terapéutico) de un paciente que padece una enfermedad o patología inflamatoria, en el que “durante” incluye cualquier momento antes del inicio del tratamiento, en el curso de dicho tratamiento, y/o al final de dicho tratamiento. Por ejemplo, las microvesículas se pueden emplear ventajosamente en la monitorización y/o 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 fármaco antiinflamatorio o inhibidor de la inflamación sobre la enfermedad o patología. En un aspecto preferido, durante un tratamiento, una región de interés del paciente se somete a formación de imágenes por ultrasonidos tras la administración de las microvesículas, por ejemplo a intervalos de tiempo regulares, en un intervalo de tiempo predeterminado después de cada administración de fármaco o intervención terapéutica y/o después de un número seleccionado de administraciones o tratamientos de fármacos; a continuación, al final o conclusión del tratamiento, se lleva a cabo preferiblemente una obtención de imágenes final de la región de interés.

Las microvesículas llenas de gas se pueden utilizar además en métodos de formación de imágenes asociados a la terapia, incluyendo dicha formación de imágenes asociada a la terapia cualquier método para el tratamiento de una enfermedad en un paciente, que comprende el uso de un agente de formación de imágenes con contraste (por ejemplo, para el suministro de un compuesto terapéutico a un receptor o tejido seleccionado), y que es capaz de ejercer o es responsable de ejercer un efecto biológico *in vitro* y/o *in vivo*. La formación de imágenes asociada a la terapia puede asociarse ventajosamente con la destrucción localizada controlada de las microvesículas llenas de gas, por ejemplo por medio de ondas de ultrasonido a alta presión acústica (típicamente más alta que la empleada generalmente en métodos de formación de imágenes de diagnóstico no destructivos). Esta destrucción controlada puede usarse, por ejemplo, para el tratamiento de coágulos de sangre (una técnica también conocida como sonotrombólisis), opcionalmente en combinación con la liberación de un compuesto terapéutico adecuado asociado con el agente de contraste. Alternativamente, dicha formación de imágenes asociada a la terapia puede 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 utilizar, por ejemplo, para un suministro eficaz de material genético a las células; alternativamente, un fármaco puede administrarse localmente, opcionalmente en combinación con material genético, permitiendo así una terapia combinada farmacéutica/genética del paciente (por ejemplo, en el caso de tratamiento tumoral). El agente terapéutico puede asociarse con la microvesícula llena de gas según métodos convencionales, o puede administrarse como un compuesto separado de la composición.

Por lo general, se administra una cantidad eficaz del agente de contraste (por ejemplo, mediante inyección) a un paciente que lo necesita, y la parte del cuerpo o el tejido del paciente que se va a fotografiar o tratar (“región de interés”) se somete al método de obtención de imágenes deseado. Preferiblemente, el agente de contraste se administra por vía intravenosa. El término paciente incluye a cualquier sujeto (humano o animal) que se somete a la administración del agente de contraste, ya sea con fines diagnósticos/terapéuticos o con fines experimentales (incluyendo, por ejemplo, el uso de un agente de contraste en animales de laboratorio, por ejemplo para seguir un tratamiento terapéutico experimental).

Según un aspecto preferido, se administra a un paciente una cantidad eficaz de microvesículas seleccionadas como dianas, típicamente mediante la inyección de una suspensión de las mismas. La formación de imágenes de la región de interés se verá reforzada así por la presencia de las microvesículas unidas al receptor en la región de interés.

Puede emplearse una variedad de técnicas de formación de imágenes en aplicaciones de ultrasonido, por ejemplo que incluyen formación de imágenes en modo B fundamental y no lineal (por ejemplo, armónica), formación de imágenes por inversión de pulso o fase, y formación de imágenes Doppler fundamental y no lineal; si se desea, se pueden utilizar técnicas de formación de imágenes tridimensionales o tetradimensionales. Además, también se

contemplan técnicas de diagnóstico que implican la destrucción de microvesículas llenas de gas (por ejemplo, por medio de ondas de ultrasonido a alta presión acústica), que son métodos de detección altamente sensibles.

Las microvesículas se pueden administrar típicamente en una concentración de alrededor de 0,01 a alrededor de 5,0 µl de gas (atrapado dentro de las microvesículas) por kg de paciente, dependiendo, por ejemplo, de su composición respectiva, el tejido u órgano del que se va a formar la imagen, y/o la técnica de obtención de imágenes escogida. Por supuesto, este intervalo de concentración general puede variar dependiendo de aplicaciones de formación de imágenes específicas, por ejemplo cuando las señales se pueden observar a dosis muy bajas, tal como en Doppler en color o en la inversión del pulso de potencia. Otras posibles aplicaciones de formación de imágenes de diagnóstico incluyen gammagrafía, formación de imágenes ópticas, formación de imágenes fotoacústicas, formación de imágenes mediante resonancia magnética, y formación de imágenes mediante rayos X, incluyendo formación de imágenes mediante contraste de fase de rayos X.

Los siguientes ejemplos ayudarán a ilustrar más la invención.

EJEMPLOS

Los siguientes materiales y abreviaturas se han utilizado en los siguientes ejemplos.

15	DSPC	Distearoilfosfatidilcolina (Genzyme)
	Ácido palmítico	Ácido palmítico, ácido hexadecanoico (Fluka)
	DSPE-PEG2000	Distearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG2000, sal de sodio (Genzyme)
	DSPE-PEG2000-mal	Distearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG2000-maleimida (Avanti Polar Lipids)
20	DSPE-PEG2000-PDP	1,2 Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato (polietilenglicol)-2000] sal de amonio (Avanti Polar Lipids)
	PDP	Piridilditiopropionilo
	Reactivo de Traut	Hidrocloreuro de 2-iminotiolano (Pierce)
	SATA	S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (Pierce)
	Sulfo-SMCC	(4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo) (Pierce)
25	Hidroxilamina.HCl	Hidrocloreuro de hidroxilamina (Fluka)
	EDTA.4Na	Ácido etilendiaminotetraacético, sal tetrasódica (Fluka)
	PEG4000	Polyglycol 4000S de Clariant
	Ciclooctano	Fluka
	TCEP	Hidrocloreuro de tris (2-carboxietil)-fosfina (Pierce)
30	rPSGL-Ig	SEQ ID NO: 4 glicosilada, obtenida según el documento US 2003/0166521, Ejemplo 1
	Lys-C	Endoproteasa Lys-C (Pierce, #90051)
	Fr-1	Fragmento purificado de rPSGL-Ig (SEQ ID NO: 3)

Ejemplo 1

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

- 35 Se colocaron 2 mg de rPSGL-Ig en 200 µl de amortiguador de digestión (Tris.HCl 25 mM - EDTA 1 mM - pH 8,5) en un tubo de microcentrífuga, al que se añadió una disolución 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 de microcentrífuga. Después, la mezcla se incubó 18 h a 37°C en el calentador de bloque seco.

Ejemplo 2

- 40 Separación de Fr-1 por cromatografía de intercambio aniónico

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 amortiguador que contenía acetato de sodio 0,05 M - NaCl 0,05 M (pH 4,0). A la columna se le hicieron pasar 3-4 volúmenes del amortiguador de partida, para permitir que el gel sedimentara. El caudal fue aproximadamente 0,23 ml/min.

Se diluyeron 290 μ l de la suspensión que contenía la proteína digerida obtenida en el Ejemplo 1 con 440 μ l de amortiguador 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 amortiguadores de acetato 0,05 M/NaCl pH = 4,0 a concentraciones crecientes de NaCl que oscilan de 0,05 a 1 M.

- 5 Durante la elución, se recogieron fracciones de 2 ml. El contenido de proteína en cada fracción se evaluó mediante una medida de DO (densidad óptica) a 280 nm (DO₂₈₀), y la presencia de restos de azúcar se determinó mediante la valoración con resorcinol. Fr-1 se recuperó en fracciones eluyendo a una concentración de NaCl 1 M. Las fracciones que contenían Fr-1 se recogieron y utilizaron para preparaciones posteriores. La pureza de las fracciones que contienen Fr-1 se evaluó mediante análisis de SDS-PAGE y LC-UV. El peso molecular medio de Fr-1 (alrededor de 32 kDaltos) se determinó mediante MALDI-ToF (desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo).

Ejemplo 3

Tiolación de rPSGL-Ig (comparativo)

Se diluyó una alícuota de disolución madre de rPSGL-Ig (789 μ l - 15,1 mg de rPSGL-Ig - 188,75 nmoles) con 200 μ l de PBE (amortiguador de fosfato 25 mM, disolución salina 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

- 15 Se preparó una disolución de reactivo de Traut (2,76 mg/ml - 20 mM) en PBE, y se añadieron 75 μ l de esta disolución a la disolución de rPSGL-Ig. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 1 h con agitación. Esta disolución se centrifugó a través de una columna de centrifugación (columna de centrifugación Zeba de 5 ml, Pierce, #89891) equilibrada en amortiguador de fosfato 20 mM pH 6. El volumen final de la disolución fue de alrededor de 1,2 ml (concentración de rPSGL-Ig tiolada: aprox. 111 nmoles/ml).
- 20 El contenido de rPSGL-Ig en la disolución final se determinó mediante espectrometría UV a 280 nm.

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

Ejemplo 4

Preparación de microvesículas con ligando rPSGL-Ig (comparativo)

- 25 Se disolvió DSPE-PEG-maleimida (6,6 mg - 2,24 μ moles) en amortiguador de fosfato 20 mM pH 6 (0,5 ml) a 45°C con agitación (vórtice) para obtener una disolución transparente. Entonces se añadieron 0,5 ml de la disolución resultante a 59,5 ml de una disolución de PEG4000 al 10%.

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

- 30 Las disoluciones acuosa y orgánica preparadas anteriormente se mezclaron usando un homogeneizador de alta velocidad (Megatron MT3000) durante 5 min (11.500 rpm), para obtener una emulsión. La emulsión resultante se calentó con agitación a 60°C durante 1 h, después se enfrió a temperatura ambiente (alrededor de 22°C). La emulsión se dividió en fracciones de 10 ml en tubos de polipropileno (Falcon-15 ml).

- 35 Se añadió rPSGL-Ig tiolada preparada según el ejemplo 3 (15 nmoles) a 10 ml de la emulsión, y la mezcla resultante se agitó a 22°C durante 2 h 30 min. La emulsión obtenida se diluyó finalmente dos veces con 10 ml de disolución de PEG4000 al 10%, y se distribuyó en muestras en viales DIN4R (300 μ l por vial). Los viales se congelaron a -50°C durante 2 h (liofilizador Christ Epsilon), después se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbares durante 12 h. A continuación, el producto liofilizado se expuso a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v), y los viales se sellaron.

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

Ejemplo 5

Tiolación de Fr-1

- 45 Se disolvió Fr-1 seco (17,1 nmoles) del ejemplo 2 en 160 μ l de PBE (amortiguador de fosfato 25 mM, disolución salina 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se preparó una disolución de SATA 10 mg/ml en DMSO anhidro, y se añadieron 4 μ l (10 equivalentes de SATA) de esta disolución en la disolución de Fr-1. La disolución obtenida se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Después, la disolución se diluyó con PBE (150 μ l). Esta disolución se centrifugó a través de una columna de centrifugación (columna de centrifugación Zeba de 2 ml, Pierce, #89890) equilibrada en PBE (usando 50 μ l de PBE como apilador). El volumen final de la disolución fue de alrededor de 360 μ l.

- 50 Se preparó una disolución de hidrocloreto de hidroxilamina (0,696 g) y sal tetrasódica de EDTA (0,19 g) en PBE (15 ml). El pH de esta disolución se ajustó a 7,3 con NaOH 10 N, y el volumen se completó hasta 20 ml. Se añadió una alícuota de esta disolución de desacetilación (40 μ l) a la disolución de Fr-1 (360 μ l). La disolución obtenida se incubó

durante 2 h a temperatura ambiente. Esta disolución se centrifugó a través de una columna de centrifugación (columna de centrifugación Zeba de 2 ml, Pierce, #89890) equilibrada en amortiguador de fosfato 20 mM pH 6 (usando 50 µl de PBE como apilador). El volumen final de la disolución fue de alrededor de 450 µl (concentración de Fr-1 tiolado: aprox. 33 nmoles/ml).

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

Ejemplo 6

Preparación de microvesículas con Fr-1

- 10 Se disolvió DSPE-PEG-maleimida (6,6 mg - 2,24 µmoles) en amortiguador de fosfato 20 mM pH 6 (0,5 ml) a 45°C con agitación (vórtice) para obtener una disolución transparente. A continuación, se añadieron 0,5 ml de la disolución resultante a 59,5 ml de disolución al 10% de PEG4000.

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

- 15 Las disoluciones acuosa y orgánica preparadas anteriormente se mezclaron usando un homogeneizador de alta velocidad (Megatron MT3000) durante 5 min (11.500 rpm), para obtener una emulsión. La emulsión resultante se calentó con agitación a 60°C durante 1 h, después se enfrió a temperatura ambiente (alrededor de 22°C). La emulsión se dividió en fracciones de 10 ml en tubos de PP (Falcon-15 ml).

- 20 Se añadió Fr-1 (preparado según el ejemplo 5, 13 nmoles) a 10 ml de la emulsión, y la mezcla resultante se agitó suavemente a 22°C durante 2 h 30 min. La emulsión obtenida se diluyó finalmente dos veces con disolución de PEG4000 al 10%, y se distribuyó en muestras en viales DIN4R (300 µl por vial). Los viales se congelaron a -50°C durante 2 h (liofilizador Christ Epsilon), después se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbares durante 12 h. A continuación, el producto liofilizado se expuso a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v), y los viales se sellaron.

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

Ejemplo 7

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

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

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

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

- 35 **Ejemplo 8**

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

Se prepararon microvesículas según el ejemplo 6, con la diferencia de que la disolución de Fr-1 se reemplazó por una disolución de Fr-1 monomérico (100 nmoles) preparada según el ejemplo 7.

Ejemplo 9

- 40 Preparación de Fr1-SMCC

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

Ejemplo 10

Preparación de DSPE-PEG-SH

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

Se diluyó una muestra de la disolución en amortiguador, y se comprobó la ausencia de 2-piridintiona.

- 5 La disolución se centrifugó a través de una columna de centrifugación (columna de centrifugación Zeba de 5 ml, Pierce, #89890) equilibrada en amortiguador de fosfato 20 mM pH 6. El volumen final de la disolución fue de alrededor de 620 µl.

Ejemplo 11

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

- 10 Se añadieron 630 µl de disolución de Fr1-SMCC (70 nmoles), obtenida en el ejemplo 9, en 470 µl de disolución de DSPE-PEG-SH (1050 nmoles) obtenida en el ejemplo 10. La disolución se incubó durante tres horas a temperatura ambiente con agitación (rueda giratoria).

A continuación, la disolución se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico con un gel ANX Sepharose (GE Healthcare).

- 15 La disolución que contenía el conjugado de Fr-1 purificado (2,6 ml) se centrifugó a través de una columna de centrifugación (columna de centrifugación Zeba 10 ml, Pierce, #89893) equilibrada en amortiguador de fosfato 20 mM pH 6, y se usó para preparaciones posteriores.

Ejemplo 12

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

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

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

- 25 Las disoluciones orgánica y acuosa preparadas anteriormente se mezclaron usando un homogeneizador de alta velocidad (Polytron PT3000) durante 1 min (8.000 rpm), para obtener una emulsión. La emulsión resultante se calentó con agitación a 60°C durante 1 h, después se enfrió a temperatura ambiente (alrededor de 22°C).

La emulsión obtenida se diluyó dos veces con una disolución de PEG4000 al 10%, y se muestrearon en viales DIN4R (300 µl por vial). Los viales se congelaron a -50°C durante 2 h (liofilizador Christ Epsilon), después se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbares durante 12 h. A continuación, el producto liofilizado se expuso a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v), y los viales se sellaron.

- 30 El producto se dispersó en un volumen de disolución salina (1 ml, NaCl 150 mM) mediante agitación manual suave.

Ejemplo 13

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

- 35 Se dispersaron 10 mg de una mezcla de DSPC y ácido palmítico (80/20 en moles) en agua destilada (10 ml) a 70°C durante 15 min, y después se enfrió hasta temperatura ambiente; a continuación, la disolución de conjugado de DSPE-PEG-SH/Fr-1-SMCC preparada según el ejemplo 11 (20 nmoles) se añadió a la dispersión con agitación.

Se mezcló ciclooctano (0,8 ml) con la dispersión obtenida usando un homogeneizador de alta velocidad (Polytron PT3000) durante 1 min (8000 rpm). La emulsión resultante se calentó con agitación a 60°C durante 1 h, después se enfrió a temperatura ambiente (alrededor de 22°C).

- 40 La emulsión se diluyó dos veces con una disolución de PEG4000 al 20%, y se distribuyó en muestras en viales DIN4R (300 µl por vial). Los viales se congelaron a -50°C durante 2 h (liofilizador Christ Epsilon), después se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbares durante 12 h. A continuación, el producto liofilizado se expuso a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v), y los viales se sellaron.

El producto se dispersó en un volumen de disolución salina (1 ml, NaCl 150 mM) mediante agitación manual suave.

Ejemplo 14

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

Se disolvió DSPE-PEG-mal (0,44 mg - 0,15 µmoles) en amortiguador de fosfato 20 mM pH 6 (0,1 ml) a 45°C con agitación (vórtice) para obtener una disolución transparente. rPSGL-Ig tiolado, preparado según el ejemplo 3 (16

nmoles - 144 μ l - emulsión de 0,8 nmoles/ml), se añadió a la disolución, y la mezcla resultante se agitó a 22°C durante 2 h 30 min. Después se añadieron 0,25 ml de la disolución a 19,75 ml de disolución al 10% de PEG4000.

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

- 5 Las disoluciones acuosa y orgánica preparadas anteriormente se mezclaron usando un homogeneizador de alta velocidad (Polytron PT3000) durante 1 min (11.000 rpm), para obtener una emulsión. La emulsión resultante se calentó con agitación a 60°C durante 1 h, después se enfrió a temperatura ambiente (alrededor de 22°C).

- 10 La emulsión obtenida se diluyó finalmente dos veces con disolución de PEG4000 al 10%, y se distribuyó en muestras en viales DIN4R (300 μ l por vial). Los viales se congelaron a -50°C durante 2 h (liofilizador Christ Epsilon), después se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbares durante 12 h. A continuación, el producto liofilizado se expuso a una atmósfera que contenía perfluoro-n-butano y aire (35/65 v/v), y los viales se sellaron.

Ejemplo 15

Preparación de microvesículas con Fr-1

Se prepararon microvesículas según el ejemplo 14, excepto que se reemplazó rPSGL-Ig tiolada por Fr-1 tiolado (25 nmoles, preparado según el ejemplo 5).

15 Ejemplo 16

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

- 20 El producto liofilizado obtenido en el ejemplo comparativo 14 se dispersó mediante agitación suave en un volumen de disolución salina (1 ml, NaCl 150 mM), con el fin de obtener una suspensión de microvesículas isotónica lista para inyección intravenosa. La suspensión de microvesículas se sometió a análisis de tamaño inmediatamente después de la preparación de la suspensión (tiempo = 0 min) y 30 min después de la preparación (tiempo = 30 min). La distribución de tamaño y la concentración de microvesículas se midieron con un Multisizer™ 3 Coulter Counter® equipado con un tubo de 30 μ m de abertura (dilución: 50 μ l de suspensión de microvesículas en 100 ml de disolución de NaCl al 0,9% - volumen analítico: 100 μ l). La preparación se caracterizó para determinar el diámetro medio en número y el diámetro medio en volumen de microvesículas (Dn y Dv50 en μ m), así como su concentración en número.

- 25 De manera similar, también se dispersó el producto liofilizado obtenido en el ejemplo 15 en un volumen igual de disolución salina, y se determinó el tamaño y distribución de las microvesículas en la suspensión como se indicó anteriormente (tiempo = 0 o 30 min).

Los resultados se proporcionan en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: Caracterización físico-química de suspensiones de microvesículas

Ejemplo	Tiempo [min]	Diámetro Dv50 [μ m]	Diámetro Dn [μ m]	Conc. de microvesículas [$\times 10^8$ / 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

- 30 Como se puede deducir de los resultados anteriores, las microvesículas con ligando rPSGL-Ig sufrieron agregación después de la dispersión en disolución salina, disgregándose gradualmente con el tiempo, lo que no es deseable para una forma inyectable. Por el contrario, el tamaño, la distribución y el recuento de vesículas para las microvesículas que contienen Fr-1 fueron sustancialmente constantes cuando se compararon a T = 0 min y a T = 30 min después de la dispersión.

Ejemplo 17

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

- 40 Las suspensiones de microvesículas obtenidas según el ejemplo 14 y el ejemplo 15 se diluyeron 1/10 en NaCl al 0,9%, y se introdujeron alícuotas de 10 μ l en una celda de recuento de Neubauer (Blaubrand®, Brand GmbH), bajo un microscopio óptico (Leica Cambridge Ltd, equipado con un objetivo de 20x), para la adquisición de imágenes de microvesículas. Se permitió que las microvesículas subieran hasta el cubreobjetos en la parte superior de la celda de Neubauer (2 a 3 min), y, después de enfocar, se tomaron imágenes con la cámara digital. Después, las imágenes se

analizaron con un procesador matemático, para determinar la cantidad de microvesículas no unidas, partiendo del supuesto de que una forma circular pura en la imagen corresponde a una sola microvesícula no agregada, mientras que las agregaciones de microvesículas producen formas no circulares no detectadas. Para detectar "formas circulares puras" en las imágenes en escala de grises, se implementó la transformación circular de Hough en Matlab (The Mathworks Inc., Natick, MA). El programa genera las posiciones centrales y los radios de las formas circulares detectadas. Se observaron los siguientes resultados (Tabla 2).

Tabla 2: Análisis de imágenes mediante detección de objetos por transformación de Hough

	Número de microvesículas no agregadas		
Preparación	Vial #1	Vial #2	Vial #3
Ejemplo 14	157	131	172
Ejemplo 15	332	354	352

Como se puede deducir de los resultados de la Tabla 2, las microvesículas que contienen el fragmento Fr-1 son mucho menos propensas a la agregación que las microvesículas que contienen toda la proteína rPSGL-Ig.

Ejemplo 18

Actividad de unión in vitro de microvesículas seleccionadas como dianas

Para evaluar la unión efectiva, microvesículas seleccionadas como dianas, preparadas según el ejemplo comparativo 4, se inyectaron en un montaje de cámara de flujo que comprende un revestimiento de Fc-P-selectina de ratón (CD62P-Fc Chimera, de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Las microvesículas (a un número equivalente de $80 \times 10^6/400$ μ l de TBS++) se inyectaron a través de la cámara de flujo (FCS2, Bioptech, USA) en forma de bolo, y se evaluó su adhesión a la capa de revestimiento de P-selectina de ratón durante un período de 10 min a un caudal de 1,0 ml/min (velocidad de corte de 714 s^{-1}) en presencia de plasma humano al 50% en PBS (v:v, Biomedica recogido en citrato, ref. ES1020P, Stehelin&Cie AG). Se realizó un análisis cuantitativo de la acumulación de microvesículas contando el número de microvesículas adheridas en el área observada a intervalos de 2 min durante la infusión total de 10 min, utilizando el programa de procesamiento de imágenes Analysis FIVE (SIS, Alemania). Después de 10 min, se tomaron cinco fotografías al azar, y se midió el número de microvesículas unidas y se expresó como el número de burbujas unidas a los 10 min (NBB). Cada área observada fue de $183 \times 137 \mu\text{m}$, medida con la ayuda de un micrómetro de platina. La medida se realizó entre la parte central y la salida de la cámara.

De manera similar, se inyectaron suspensiones de microvesículas seleccionadas como dianas preparadas según el ejemplo 6 (ligando seleccionador de dianas Fr-1) y según el ejemplo 8 (FR-1 monomérico) en una cámara de flujo como se describe anteriormente, y su actividad de unión se determinó según el procedimiento anterior.

La Tabla 3 muestra los resultados de los tres ensayos.

Tabla 3: Número de microvesículas unidas a los 10 min (NBM 10 min)

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

Como se puede deducir de los resultados anteriores, la actividad de unión de las microvesículas que contienen Fr-1 es mayor con respecto a las correspondientes preparaciones de microvesículas que contienen Fr-1 monomérico o la proteína completa rPSGL-Ig.

Ejemplo 19

Comportamiento in vivo de microvesículas con Fr-1 dimérico y monomérico

Las microvesículas preparadas según los ejemplos 6 y 8 se compararon en un modelo inflamatorio de rata. Se indujo inflamación en la extremidad trasera mediante una inyección intramuscular de lipopolisacárido (LPS, 026: B6 Sigma L-8274, 2,1 mg/kg). La unión efectiva de las microvesículas seleccionadas como dianas se evaluó mediante formación de imágenes por ultrasonidos 24 h después de la inducción del proceso inflamatorio. La formación de imágenes por

ultrasonidos se llevó a cabo utilizando un escáner Siemens Sequoia 512 (Siemens Medical Systems, Issaquah, WA) equipado con un transductor lineal 15L8 (frecuencia de transmisión, 7 MHz; intervalo dinámico, 83dB; profundidad, 20 mm; compensación de ganancia de tiempo (TGC): lineal). 10 min después de las inyecciones de dosis única de microvesículas obtenidas del ejemplo 6 y del ejemplo 8, se realizó un análisis cuantitativo de la unión de las microvesículas utilizando un software de cuantificación desarrollado internamente (Bracco Suisse SA, Ginebra, Suiza) diseñado para cuantificar la amplitud de potencia del eco de contraste dentro de las áreas de interés (AOI). La mejora del contraste en las AOI de los fotogramas almacenados se expresó como valores de potencia del eco relativos (rms^2), que son proporcionales al número de microvesículas en las AOI seleccionadas. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Potencia del eco en músculo de rata inflamado

Preparación	Potencia de eco 10 min (rms^2)
Ejemplo 6	43 ± 18
Ejemplo 8	18 ± 10

Como se puede deducir de la tabla anterior, las microvesículas del ejemplo 6 (con Fr-1 dimérico) dan como resultado una unión in vivo más alta con respecto a las microvesículas del ejemplo 8 (con 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. Se indujo inflamación en la extremidad trasera mediante una inyección intramuscular de lipopolisacárido (LPS, 026: B6 Sigma L-8274, 2,1 mg/kg). La monitorización de la eficacia del tratamiento antiinflamatorio se realizó mediante el tratamiento previo de los animales veinticuatro horas antes de la administración de LPS, con una inyección subcutánea de etanercept (0,45 mg/kg, Wyeth) o de disolución salina. La actividad de unión in vivo de las microvesículas de Fr-1 se determinó según el protocolo de formación de imágenes descrito en el ejemplo 19. La inhibición conocida de la inflamación lograda mediante la administración de etanercept para prevenir la actividad de $\text{TNF}\alpha$ (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 microvesículas de Fr-1. Los animales tratados previamente con etanercept mostraron una disminución en la acumulación de microvesículas de Fr-1, en comparación con los animales de control que recibieron disolución salina. Este estudio muestra la capacidad de las microvesículas de Fr-1 para monitorizar la expresión de los receptores de selectina en un sitio de inflamación durante un tratamiento antiinflamatorio con un inhibidor de la inflamación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BRACCO SUISSE SA

<120> Microvesículas llenas de gas seleccionadas como dianas

<130> B0591/064-EP-PO

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(47)

<223> término NH2 del ligando 1 de glicoproteína de P-selectina madura (n° de acc. GenBank: Q14242) (fragmento aa 42-88).

ES 2 848 721 T3

<400> 1

Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr
1 5 10 15

Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr
20 25 30

Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg
35 40 45

<210> 2

<211> 24

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> enlazador

<220>

10

<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (1)..(24)

<223> enlazador: fragmento N-terminal de la región Fc de IgG humana

<400> 2

Pro His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20

15

<210> 3

<211> 71

<212> PRT

<213> artificial

<220>

20

<223> proteína de fusión (SEQIDNO:1 + SEQIDNO:2)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (1)..(71)

<223> SEQIDNO:1 + SEQIDNO:2

25

<400> 3

ES 2 848 721 T3

Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr
1 5 10 15

Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr
20 25 30

Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Pro
35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser
50 55 60

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
65 70

<210> 4

<211> 272

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión PSGL-1-región Fc

<220>

<221> SITIO

10 <222> (1)..(47)

<223> ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1), aa 42-88 nº de acc. GenBank Q14242.

<220>

<221> SITIO

<222> (48)..(71)

15 <223> enlazador

<220>

<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

<222> (72)..(272)

<223> región Fc de IgG (del documento US2003/0166521)

20 <400> 4

ES 2 848 721 T3

Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr
 1 5 10 15
 Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr
 20 25 30
 Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Pro
 35 40 45
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser
 50 55 60
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 85 90 95
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 100 105 110
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 115 120 125
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 130 135 140
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr
 145 150 155 160
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 165 170 175
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 180 185 190
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 210 215 220
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 225 230 235 240
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 245 250 255
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 260 265 270

REIVINDICACIONES

1. Un constructo seleccionador de dianas, que comprende:

a) un compuesto anfifílico; y

b) un polipéptido que consiste en como máximo 200 restos de aminoácidos y que comprende al menos los aminoácidos 5-16 como se expone en SEQ ID NO: 1;

estando dicho polipéptido en forma dimérica, y estando asociado covalentemente con dicho compuesto anfifílico.

2. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende un resto de cisteína, un resto de lisina, o un resto de cisteína y un resto de lisina.

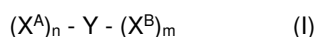
3. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido está asociado covalentemente con dicho compuesto anfifílico a través de dicho resto de lisina.

4. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende al menos los aminoácidos 1-19, 5-41 o 1-47 como se expone en SEQ ID NO: 1.

5. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende como máximo 100 restos de aminoácidos.

6. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 3.

7. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula (I):



en la que:

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

n es un número entero de 12 a 199; y

X^A es cualquier aminoácido, con la excepción de lisina;

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

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

X^B es cualquier aminoácido, con la excepción de lisina y cisteína; e

Y es lisina o cisteína.

8. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 7, en el que $(X^A)_n$ comprende al menos los aminoácidos 1-19, 5-41 o 1-47 como se expone en SEQ ID NO: 1.

9. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 7, en el que Y es lisina.

10. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 7, en el que n es un número entero de 12 a 99, y m+n es como máximo 99.

11. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 7, en el que n es un número entero de 12 a 74, y m+n es como máximo 74.

12. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 7, en el que m es 0.

13. El constructo seleccionador de dianas según las reivindicaciones 7 a 12, en el que X^A comprende dos restos de cisteína.

14. El constructo seleccionador de dianas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 13, en el que dicho polipéptido es una secuencia glicosilada de aminoácidos que comprende un resto de O-glicano unido a un resto de amino de la secuencia.

15. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 14, en el que dicho resto de O-glicano comprende una estructura de sialil-Lewis x.

16. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 14 o 15, que comprende uno o más restos de glicano unidos a aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en las posiciones 16, 24, 25, 26, 28, 29, 32, 36, 39, 40 y 41 de SEQ ID. NO: 1.

5 17. El constructo seleccionador de dianas según la reivindicación 14, 15 o 16, en el que dicha secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende además un grupo sulfato unido a un resto de aminoácido de tirosina.

18. El constructo seleccionador de dianas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 17, en el que dicho compuesto anfifílico de dicho constructo seleccionador de dianas es un fosfolípido.