

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 146**

51 Int. Cl.:

B01J 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2019 PCT/EP2019/086434**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2020 WO20127816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2019 E 19821139 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 3897954**

54 Título: **Microvesículas llenas de gas con ligando**

30 Prioridad:

21.12.2018 EP 18215695

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

29.10.2024

73 Titular/es:

**BRACCO SUISSE SA (100.0%)
Via Ponteggia 23
6814 Cadempino, CH**

72 Inventor/es:

**BUSSAT, PHILIPPE;
CHERKAOUI, SAMIR y
LAZARUS, DAVID**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 984 146 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microvesículas llenas de gas con ligando

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a nuevas formulaciones de microvesículas llenas de gas que comprenden un ligando, que pueden utilizarse ventajosamente en métodos de separación de células, por ejemplo por flotabilidad.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los métodos para el aislamiento de una célula deseada de una mezcla compleja de células (por ejemplo en un fluido fisiológico como sangre o plasma) son útiles en diversos campos biomédicos. En una aplicación, en el campo de la terapia génica, se recogen células de un paciente, se tratan para expresar el gen deseado y se administran de nuevo al paciente. Otra posible aplicación es para la separación de células tumorales circulantes (CTC) o biomarcadores circulantes (por ejemplo biopsia líquida).

20 Los anticuerpos u otras moléculas se pueden utilizar para etiquetar una célula deseada para el posterior aislamiento. Los anticuerpos se pueden conjugar con micropartículas o nanopartículas magnéticas. Al mezclarse con una mezcla de células heterogénea, las partículas magnéticas se unen a la célula objetivo y después se separan utilizando un campo magnético. Este concepto se implementa en diversos productos comerciales (Dynabeads , Magnetic-Activated Cell Sorting "MACS®"). El principal inconveniente es la dificultad para eliminar las perlas de las células objetivo.

25 Recientemente, se han descrito métodos basados en la flotabilidad (véase, por ejemplo el documento US 2015/0219636) en los que se utilizan microvesículas o micropartículas encapsuladas como reactivo de clasificación celular activada por flotabilidad (BACS). En este caso, la interacción microvesícula/célula se realizó también utilizando anticuerpos u otras moléculas. Como se menciona en el documento US2015/0219636, la eficiencia de unión de microvesículas aumenta con la densidad de ligando.

30 El documento WO 2008/028917 A1 divulga una suspensión de microvesículas llenas de gas que comprenden un material anfífilo y 0,15-1 % en moles de un lípido que porta un polímero hidrófilo. El gas es un gas biocompatible, como por ejemplo aire. El material anfífilo es un fosfolípido. El lípido que porta un polímero hidrófilo es un fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva, estando unido dicho fosfolípido pegilado a un ligando a través de dicha fracción reactiva.

35 Sin embargo, como observó el solicitante, una alta densidad de ligando podría promover la agregación de microvesículas (o la desestabilización de preparaciones precursoras de la suspensión de microvesículas).

40 Ahora se ha descubierto que las formulaciones que comprenden un fosfolípido y una mezcla adecuada de un fosfolípido pegilado y de un fosfolípido pegilado que comprende un ligando pueden ser particularmente ventajosas, particularmente para uso en métodos de separación de células o materiales biológicos.

Sumario de la invención

45 Un aspecto de la invención se refiere a una suspensión de microvesículas llenas de gas que comprenden un gas fisiológicamente aceptable con una envoltura estabilizante, que comprende:

a) un fosfolípido

50 b) de 1 % a 8 % en moles de un primer fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva, estando unida al menos una parte de dicho fosfolípido pegilado a un ligando a través de dicha fracción reactiva; y

c) de 1 % a 12 % en moles de un segundo fosfolípido pegilado;

55 comprendiendo dicha suspensión menos de 40 % en moles de dicho ligando, ya sea en forma libre o unido a dicho fosfolípido pegilado, con respecto a la cantidad molar de fosfolípido pegilado que comprende dicho ligando en la envoltura.

60 Preferentemente, dicho ligando es capaz de unirse selectivamente a biotina. Más preferentemente, se selecciona a partir del grupo formado por avidina, neutravidina y estreptavidina, preferentemente estreptavidina. El ligando está unido preferentemente mediante enlace covalente al fosfolípido pegilado.

Preferentemente, la cantidad de ligando no asociado a la envoltura estabilizante es de menos de 33 %, más preferentemente menos de 25 % y aún más preferentemente menos de 20 %.

65

La parte del primer fosfolípido pegilado que comprende un ligando está presente preferentemente en la envoltura estabilizante en una cantidad molar de 0,03 a 0,75 %, preferentemente 0,05 %-0,7 %, más preferentemente 0,08-0,6 %.

5 Dichos primer y segundo fosfolípidos pegilados ("PE-PEG"), que pueden ser iguales o diferentes, son un fosfolípido enlazado covalentemente a un polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular promedio de 1000 a 8000 g/mol, preferentemente de 2000 a 5000 g/mol. El PEG en dicho primer PE-PEG tiene un peso molecular promedio (AMW) que puede ser igual, superior o inferior con respecto al AMW del PEG en el segundo PE-PEG. Preferentemente, el PEG en el primer PE-PEG tiene un AMW que es el mismo o superior al AMW del PEG en el segundo PE-PEG.

10 En una realización, el PEG en el primer y segundo PE-PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 g/mol (PE-PEG2000); preferentemente, la cantidad molar de dicho segundo PE-PEG es de al menos 3,5 %, más preferentemente de al menos 5 %, incluso más preferentemente al menos 6 %.

15 En otra realización, el PEG en el primer y segundo PE-PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 5000 g/mol (PE-PEG5000).

20 En una realización adicional, el PEG en el primer PE-PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 g/mol (PE-PEG2000) y el PEG en el segundo PE-PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 5000 g/mol (PE-PEG5000).

25 En una realización adicional, el PEG en el primer PE-PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 5000 g/mol (PE-PEG5000) y el PEG en el segundo PE-PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 g/mol (PE-PEG2000).

30 En realizaciones preferentes, las microvesículas llenas de gas de la invención tienen ventajosamente una densidad de ligando en la superficie de las mismas de al menos 8000 moléculas/ μm^2 , preferentemente de al menos 12000 moléculas/ μm^2 , más preferentemente de al menos 15000 moléculas/ μm^2 y aún más preferentemente de al menos 18000 moléculas/ μm^2 hasta, por ejemplo, 50000 moléculas/ μm^2 .

También se divulga en el presente documento un método para la fabricación de un precursor liofilizado para la preparación de una suspensión de microvesículas llenas de gas como se definió anteriormente, que comprende:

- 35 • preparación de una emulsión orgánica acuosa que comprende una cantidad molar predeterminada de un fosfolípido y un fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva;
- adición de una cantidad molar de un ligando funcionalizado a dicha emulsión, siendo dicha cantidad molar inferior a la cantidad molar de dicho fosfolípido pegilado;
- 40 • acoplamiento de dicho fosfolípido pegilado con dicho ligando;
- liofilización de dicha emulsión.

45 Un aspecto adicional de la invención comprende el uso de la anterior suspensión acuosa de microvesículas llenas de gas en un método de separación de células. Dicho método comprende preferentemente la unión de dichas microvesículas a una célula deseada en un líquido fisiológico y la separación de dicha célula por flotabilidad.

Descripción detallada de la invención

50 Como se menciona anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a una suspensión de microvesículas llenas de gas que comprenden un gas fisiológicamente aceptable con una envoltura estabilizante. La envoltura estabilizante comprende un fosfolípido y cantidades predeterminadas de un primer fosfolípido pegilado que comprende un ligando y de un segundo fosfolípido pegilado. La suspensión está caracterizada además por comprender una cantidad de menos de 40 % en moles de dicho ligando no asociado a la envoltura estabilizante, ya sea en forma libre o unido a dicho fosfolípido pegilado, con respecto a la cantidad molar de fosfolípido pegilado que comprende dicho ligando en la envoltura.

Fosfolípidos

60 El término "fosfolípido(s)" como se utiliza en el presente documento incluye ésteres de glicerol con uno o preferentemente dos residuos (iguales o diferentes) de un ácido graso y con un residuo de ácido fosfórico, en donde el residuo de ácido fosfórico está unido a su vez a un grupo hidrófilo como, por ejemplo, colina (fosfatidilcolinas - PC), serina (fosfatidilserinas - PS), glicerol (fosfatidilgliceroles - PG), etanolamina (fosfatidiletanolaminas - PE), inositol (fosfatidilinositol). Los ésteres de fosfolípidos con solamente un residuo de ácido graso se denominan en general en la técnica las formas "liso" del fosfolípido o "lisofosfolípidos". Los residuos de ácidos grasos presentes en los

fosfolípidos en general son 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 está preferiblemente saturada completamente. 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.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término fosfolípidos incluye productos naturales, preparados por vía semisintética o sintética que se pueden emplear 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 completamente hidrogenados de las lecitinas de origen natural. Son fosfolípidos preferentes los diésteres de ácidos grasos de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) o de esfingomielina.

Son ejemplos de fosfolípidos preferentes, por ejemplo, dilaurilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitilfosfatidilcolina (DPPC), diaraquidilfosfatidilcolina (DAPC), diestearilfosfatidilcolina (DSPC), dioleilfosfatidilcolina (DOPC), dipentadecanoilfosfatidilcolina (DPDPC), 1-miristil-2-palmitilfosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitil-2-miristilfosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitil-2-stearilfosfatidilcolina (PSPC), 1-estearil-2-palmitilfosfatidilcolina (SPPC), 1-palmitil-2-oleilfosfatidilcolina (POPC), 1-oleil-2-palmitilfosfatidilcolina (OPPC), dilaurilfosfatidilglicerol (DLPG) y sus sales de metal alcalino, diaraquidilfosfatidilglicerol (DAPG) y sus sales de metal alcalino, dimiristilfosfatidilglicerol (DMPG) y sus sales de metal alcalino, dipalmitilfosfatidilglicerol (DPPG) y sus sales de metal alcalino, diestearilfosfatidilglicerol (DSPG) y sus sales de metal alcalino, dioleilfosfatidilglicerol (DOPG) y sus sales de metal alcalino, ácido dimiristilfosfatídico (DMPA) y sus sales de metal alcalino, ácido dipalmitilfosfatídico (DPPA) y sus sales de metal alcalino, ácido diestearilfosfatídico (DSPA), ácido diaraquidilfosfatídico (DAPA) y sus sales de metal alcalino, dimiristilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitilfosfatidiletanolamina (DPPE), diestearilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), diaraquidilfosfatidiletanolamina (DAPE), dilinoleilfosfatidiletanolamina (DLPE), dimiristilfosfatidilserina (DMPS), diaraquidilfosfatidilserina (DAPS), dipalmitilfosfatidilserina (DPPS), diestearilfosfatidilserina (DSPS), dioleilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitilfosfatidilinositol (DPLI) y diestearilfosfatidilinositol (DSPS), dilaurilfosfatidilinositol (DLPI), diaraquidilfosfatidilinositol (DAPI), dimiristilfosfatidilinositol (DMPI), dipalmitilfosfatidilinositol (DPPI), diestearilfosfatidilinositol (DSPS), dioleilfosfatidilinositol (DOPI).

Son fosfolípidos particularmente preferentes DMPC, DAPC, DSPC, DPPC, DMPA, DPPA, DSPA, DMPG, DPPG, DSPG, DMPS, DPPS y DSPS. Los más preferentes son DMPC, DAPC, DSPC y DPPC.

También se pueden utilizar mezclas de fosfolípidos como, por ejemplo, mezclas de DPPE y/o DSPE, DPPC, DSPC y/o DAPC con DSPS, DPPS, DSPA, DPPA, DSPG y DPPG.

Fosfolípidos pegilados

La expresión "fosfolípido(s) pegilado(s)" tal como se utiliza en el presente documento incluye en su significado cualquier residuo de polietilenglicol ("PEG") unido covalentemente a un residuo de fosfolípido como los ilustrados anteriormente.

Los polietilenglicoles se identifican normalmente por su peso molecular promedio ("AMW", por ejemplo un peso molecular promedio en número "Mn"); por ejemplo, como se utiliza en el presente documento, PEG2000 identifica un polietilenglicol con un AMW de alrededor de 2000 g/mol (normalmente +/- 5 %).

Los fosfolípidos(s) pegilado(s) adecuado(s) son aquellos que comprenden un residuo de PEG con un peso molecular promedio de alrededor de 1000 g/mol (es decir, PEG1000) a alrededor de 8000 g/mol (PEG8000), preferentemente de 2000 a 5000 g/mol (PEG5000). Los ejemplos específicos de polímeros de PEG útiles para formar los fosfolípidos pegilados definidos anteriormente incluyen PEG750, PEG1000, PEG2000, PEG3400, PEG4000, PEG5000, PEG6000, PEG7000 y PEG8000. Preferentemente, el PEG está unido covalentemente a un residuo de fosfatidiletanolamina ("PE") que porta una respectiva cadena lipídica por ejemplo miristoilo, palmitoilo o estearoilo.

Son ejemplos de fosfolípidos pegilados adecuados, por ejemplo, DMPE-PEG, DPPE-PEG y DSPE-PEG, que en general están disponibles comercialmente como fosfolípidos pegilados con el PEG que tiene los pesos moleculares promedio indicados anteriormente, por ejemplo como DMPE-PEG2000, DMPE-PEG3400, DMPE-PEG5000, DPPE-PEG2000, DPPE-PEG3400, DPPE-PEG5000, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG3400 o DSPE-PEG5000.

Cuando sea necesario, el fosfolípido pegilado se puede funcionalizar adecuadamente con una fracción reactiva, particularmente una capaz de reaccionar con una correspondiente fracción reactiva o un ligando funcionalizado (por

ejemplo una fracción avidina, neutravidina o estreptavidina). Las fracciones reactivas adecuadas incluyen, por ejemplo, NHS (N-hidroxisuccinimida), amino, sulfhidrilo, maleimida, azida o DBCO (dibenzociclooctina).

Por ejemplo, si uno de los dos componentes reactivos incluye un grupo amino reactivo, se puede hacer reaccionar con el otro componente que contiene una correspondiente fracción reactiva adecuada, 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 imida, que se puede reducir a un enlace de alquilamina). Alternativamente, si uno de los dos componentes reactivos incluye un grupo tiol reactivo, las fracciones reactivas complementarias en el otro componente pueden incluir derivados de haloacetilo, maleimidias (para formar un enlace de tioéter) o un disulfuro mixto que comprende un sulfuro en forma de un grupo 2-piridiltio que, al reaccionar con un tiol derivado del componente que porta tiol, da lugar a la formación de un enlace disulfuro estable entre los dos componentes. Además, si uno de los dos componentes reactivos incluye un grupo carboxílico reactivo, las fracciones adecuadas en el otro componente pueden ser aminas e hidrazidas (para formar funciones amida o N-acilo, N'-alquilhidrazida). Según una realización, un fosfolípido pegilado derivatizado con maleimida (por ejemplo PE-PEG2000-Mal o PE-PEG5000-Mal) se puede hacer reaccionar con un ligando que porta una fracción reactiva de tiol (-SH), introducida en el ligando, por ejemplo, mediante reacción con sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6-(3'-(2-piridiltio)propionamido)hexanoato).

Ligando

El ligando unido a PE-PEG e incorporado en la envoltura de microvesículas es un ligando que forma un "par de unión" específico con otra molécula respectiva. Los ejemplos de ligandos (y respectivos pares de unión) incluyen, por ejemplo, avidina, neutravidina y estreptavidina, que puede formar un par de enlace con biotina. Para la presente invención es preferente estreptavidina.

El ligando se derivatiza adecuadamente para introducir una fracción reactiva capaz de reaccionar covalentemente con una respectiva fracción reactiva en el PE-PEG funcionalizado. Por ejemplo, cuando se utiliza PE-PEG funcionalizado, se introduce una fracción tiol en el ligando para permitir el acoplamiento maleimida/tiol. Cuando se utilizaron lípidos funcionalizados con DBCO, se introdujo una fracción azida en estreptavidina para permitir acoplamiento de química click.

Método de preparación y formulación

Las microvesículas de la invención se pueden preparar ventajosamente según el método de fabricación divulgado en el documento WO2004/069284.

El método de preparación comprende una preparación inicial de un residuo liofilizado que comprende los pasos de:

- a) preparación de una emulsión orgánica acuosa formada por un fosfolípido, un primer fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva y un segundo fosfolípido pegilado;
- b) adición a esta emulsión de un ligando funcionalizado capaz de reaccionar con dicha fracción reactiva;
- c) acoplamiento de dicho fosfolípido pegilado con dicho ligando; y
- d) liofilización de dicha emulsión para obtener un residuo liofilizado.

A continuación, el residuo liofilizado (por ejemplo recogido en un vial de vidrio) se pone en contacto con un gas biocompatible y posteriormente se reconstituye mediante disolución en un líquido soporte fisiológicamente aceptable para obtener la suspensión deseada de microvesículas llenas de gas.

La emulsión orgánica acuosa se puede preparar sometiéndose un medio acuoso y un disolvente inmiscible con agua (por ejemplo alcanos ramificados o lineales, alquenos, cicloalcanos, hidrocarburos aromáticos, éteres de alquilo, cetonas, hidrocarburos halogenados, hidrocarburos perfluorados o mezclas de los mismos; por ejemplo ciclooctano, ciclohexano o cicloheptano) en presencia de al menos un fosfolípido a cualquier técnica apropiada de generación de emulsiones conocida en la técnica como, por ejemplo, homogeneización a alta presión o micromezcla.

Los fosfolípidos adecuados son los indicados anteriormente. Además, la emulsión orgánica acuosa puede comprender adicionalmente un lípido, preferentemente un ácido graso como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico o ácido oleico.

Normalmente, el fosfolípido representa la mayor parte de componentes que forman la envoltura, por ejemplo hasta 98 % mol/mol. En ciertas realizaciones, la cantidad molar de fosfolípido puede oscilar de 60 % a 95 %, preferentemente de 70 % a 90 %. El lípido opcional (en particular ácido graso) puede estar presente en una cantidad molar, por ejemplo, de 10 % a 30 %, más preferentemente de 15 % a 25 %.

El fosfolípido pegilado funcionalizado puede ser cualquiera de los PE-PEG enumerados anteriormente, funcionalizado de manera adecuada como se discutió anteriormente.

Puede estar presente en una cantidad molar de 0,5 % a 8 %, preferentemente 1 % a 6 %.

Del mismo modo, el ligando funcionalizado que se unirá al PE-PEG funcionalizado se puede seleccionar entre los enumerados anteriormente.

Como observó el solicitante, la cantidad molar de ligando funcionalizado añadido en el paso b) es preferentemente inferior a la cantidad molar de fosfolípido pegilado que comprende la fracción reactiva a la que se debe acoplar dicho ligando. De hecho, para el uso específico en el método BACS, es preferente que cantidades limitadas de ligando (ya sea como tal o unido a un fosfolípido pegilado) permanezcan libres en la suspensión con el fin de minimizar la posible competencia de acoplamiento con el anticuerpo objetivo (por ejemplo biotinilado). Como se mencionó anteriormente, en la suspensión según la invención, la cantidad de ligando no asociado a la envoltura estabilizante es inferior a 40 % hasta, por ejemplo, menos de 20 %. Para limitar tal cantidad de ligando "libre", según el proceso de la invención, la cantidad de ligando funcionalizado se añade preferentemente en una relación molar de 1:4 o inferior (por ejemplo hasta 1:40) con respecto a la cantidad de fosfolípido pegilado que porta la correspondiente fracción reactiva. Más preferentemente, dicha relación molar es de 1:5 a 1:25 y aún más preferentemente de 1:7 a 1:20.

Con estas relaciones molares relativas, el rendimiento de acoplamiento del ligando con el PE-PEG es generalmente de al menos 70 % (es decir, menos de 30 % de ligando no está incorporado a la envoltura estabilizante final de las microvesículas), preferentemente de al menos 75 %, más preferentemente 80 % y aún más preferentemente de al menos 85 %.

Las fracciones reactivas sin reaccionar en el PE-PEG se pueden "inactivar" entonces mediante reacción con una correspondiente fracción inactivadora adecuada. Por ejemplo, si la fracción reactiva en el PE-PEG es maleimida (PE-PEG-Mal), se puede inactivar mediante reacción con cisteína. Alternativamente, la fracción reactiva se puede someter a procesos de inactivación naturales, por ejemplo hidrólisis, sin necesidad de añadir una fracción inactivadora específica.

De este modo, el PE-PEG "inactivado" se incorporará a la envoltura estabilizante junto con el PE-PEG al que se ha unido covalentemente al ligando, estando este último ventajosamente presente en la envoltura estabilizante en una cantidad molar de 0,03 a 0,75 %, preferentemente 0,05 %-0,7 %, más preferentemente 0,08-0,6 % y aún más preferentemente 0,1-0,5 %. El PE-PEG "inactivado" (sin reaccionar) puede estar presente en la envoltura estabilizante en una cantidad molar de 0,5 % a 7,5 %, preferentemente de 1 % a 6 %, más preferentemente 1,5 % a 5 %.

Como observó además el solicitante, según la invención es ventajoso tener por encima de la emulsión orgánica acuosa de los pasos a) a c) una mezcla de fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva y de un fosfolípido pegilado adicional sin dicha fracción reactiva.

Como observó el solicitante, la cantidad de PE-PEG y el peso molecular de las cadenas de PEG contenidas en dicho PE-PEG se correlacionan de tal manera que permiten una selección adecuada de los dos, con el fin de proporcionar la suspensión de microvesículas deseada. Dicha correlación se puede expresar ventajosamente por un número identificado en el presente documento como "N_{PEG}" definido de la siguiente manera:

$$N_{\text{PEG}} = MW_1 * \% \text{ en moles}_1 + MW_2 * \% \text{ en moles}_2$$

donde MW₁ y % en moles₁ se refieren respectivamente al peso molecular y al % molar de la cadena de PEG contenida en el fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva, mientras que MW₂ y % en moles₂ se refieren respectivamente al peso molecular y al % molar de la cadena de PEG contenida en el fosfolípido pegilado sin una fracción reactiva.

Por ejemplo, si la composición comprende 2,5 % de PE-PEG2000 funcionalizado y 1% de PE-PEG5000, el número N_{PEG} es: N_{PEG} = 2000*0.025 + 5000*0.01 = 100

Como observó el solicitante, con el fin de obtener emulsiones estables, el número N será preferentemente superior a 90, más preferentemente superior a 95 hasta, por ejemplo, 300, preferentemente 280. Preferentemente, MW₁ es similar a MW₂, siendo ambos más preferentemente alrededor de 2000 (+/- 5%). Preferentemente, % en moles₁ es de 0,01 a 0,05, más preferentemente 0,02 a 0,03. Preferentemente, % en moles₂ es de 0,03 a 0,12, más preferentemente 0,05 a 0,10.

Según una realización de la invención, el fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva es un PE-PEG2000 funcionalizado (por ejemplo DSPE-PEG2000-Mal), mientras que el fosfolípido pegilado es un PE-PEG2000 (por ejemplo DSPE-PE2000). La relación molar relativa entre los dos respectivos PE-PEG es preferentemente de 1:1 a 1:8, preferentemente de 1:1,5 a 1:5 y aún más preferentemente de 1:2 a 1:4.

Según otra realización de la invención, el fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva es un PE-PEG2000 funcionalizado, por ejemplo DSPE-PEG2000-Mal, mientras que el fosfolípido pegilado es un PE-PEG5000, por ejemplo DPPE-. La relación molar relativa entre el PE-PEG2000 funcionalizado y PE-PEG5000 es preferentemente de 5:1 a

1:3, más preferentemente de 4:1 a 1:2 y aún más preferentemente de 3:1 a 1:1. Según una realización adicional, tanto el fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva y el segundo fosfolípido pegilado son un PE-PEG5000. La relación molar relativa entre los dos PE-PEG es preferentemente de 5:1 a 1:2,5, preferentemente de 3:1 a 1:2 y aún más preferentemente de 2,5:1 a 1:1,5.

5 En una realización preferente, la emulsión orgánica acuosa puede contener además un aditivo de liofilización, como un agente con efecto crioprotector y/o lioprotector y/o un agente de carga, por ejemplo un aminoácido como una glicina; un carbohidrato, por ejemplo un azúcar como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa, glucosa, lactosa o una ciclodextrina, o un polisacárido como dextrano, quitosano y sus derivados (por ejemplo: carboximetilquitosano, trimetilquitosano); o un polioxialquilenglicol como polietilenglicol. El aditivo de liofilización, que no interviene sustancialmente en la formación de la envoltura estabilizante de las microvesículas, se añade preferentemente como una disolución acuosa. Puede añadirse antes de la formación de la emulsión, a la emulsión formada o parcialmente antes y parcialmente después de la formación de la misma. Por ejemplo, se puede utilizar un 10 % (p/p) de disolución acuosa de PEG4000. Normalmente, la cantidad de aditivo de liofilización en la emulsión antes de la liofilización es de 15 5 a 20 % en peso (mientras que la cantidad total de componentes que forman la envoltura es normalmente de alrededor de 0,5 % a alrededor de 1 % en peso).

20 Como observó el solicitante, las emulsiones orgánicas acuosas preferentes preparadas como se indicó anteriormente pueden ser estables durante un periodo de tiempo relativamente largo antes de someterse al paso de liofilización, normalmente durante al menos 2-3 horas o más.

25 La estabilidad de la emulsión se puede determinar, por ejemplo, mediante medición de la concentración de microgotas (como número total de microgotas) en la emulsión final después de completar el paso de acoplamiento del paso c) y comparación de la misma con la concentración de microgotas en la emulsión después de 2 ½ horas. Normalmente, el porcentaje de microgotas remanentes será al menos de 80 % con respecto a la cantidad inicial, preferentemente de al menos 90 % y aún más preferentemente al menos 95 %.

30 La emulsión se puede envasar entonces en los respectivos viales de vidrio (por ejemplo DIN4, DIN8 o DIN20R) que están sujetos a un paso de liofilización.

35 Una vez finalizada la liofilización, el espacio de cabeza del vial (que contiene el residuo liofilizado) se satura con un gas fisiológicamente aceptable y el vial se sella (por ejemplo con un tapón de goma). Para llenar las anteriores microvesículas se puede emplear cualquier gas biocompatible, precursor de gas (por ejemplo líquido a temperatura ambiente o mezcla de los mismos) (en lo sucesivo también identificado como "gas que forma las microvesículas").

40 Son preferentes gases fluorados, en particular gases perfluorados. Los compuestos preferentes son gases perfluorados, como SF₆ o perfluorocarbonos (hidrocarburos perfluorados), es decir, hidrocarburos en los que todos los átomos de hidrógeno se han reemplazado por átomos de flúor, que se sabe que forman suspensiones de microvesículas particularmente estables, como se ha divulgado, por ejemplo, en el documento EP 0554 213, que se incorpora al presente documento por referencia.

Los perfluorocarbonos preferentes incluyen, por ejemplo, CF₄, C₂F₆, C₃F₈, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₂, C₆F₁₂ and C₆F₁₄, más preferentemente CF₄, C₂F₆, C₃F₈, C₄F₈ y C₄F₁₀.

45 También puede ser ventajoso utilizar una mezcla de cualquiera de los anteriores gases en cualquier relación. Por ejemplo, la mezcla puede comprender un gas convencional, como nitrógeno, aire o dióxido de carbono y un gas que forma una suspensión estable de microvesículas, como hexafluoruro de azufre o un perfluorocarbono como se indicó anteriormente. Se pueden encontrar ejemplos de mezclas de gases adecuadas, por ejemplo, en el documento WO 94/09829, que se incorpora al presente documento por referencia. Son particularmente preferentes las siguientes combinaciones: una mezcla de gases (A) y (B) en la que el gas (B) es un gasa fluorado, seleccionado entre los 50 ilustrados anteriormente, incluidas las mezclas de los mismos, y (A) se selecciona a partir 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, preferentemente de alrededor de 5 % a 80 %.

55 Son gases particularmente preferentes SF₆, C₃F₈, C₄F₁₀ o mezclas de los mismos, opcionalmente en mezcla con aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono o mezclas de los mismos, por ejemplo una mezcla 35/65 (v/v) de perfluorobutano o perfluoropropano y nitrógeno.

60 A continuación, el residuo liofilizado se puede reconstituir mediante adición de un soporte acuoso en el vial y agitación suave de su contenido, para proporcionar la suspensión deseada de microvesículas llenas de gas. El número, las dimensiones y la distribución de tamaños de las microvesículas obtenidas son sustancialmente comparables con el número, las dimensiones y la distribución de tamaño de las microgotas en la emulsión de preparación.

65 En una realización de la invención, la envoltura estabilizante final de las microvesículas llenas de gas puede contener una mezcla de (i) un fosfolípido; (ii) opcionalmente un ácido graso; (iii) un PE-PEG que comprende un ligando; (iv) un

PE-PEG "inactivado" (derivado del PE-PEG funcionalizado que no reacciona con el ligando); y (v) opcionalmente un PE-PEG adicional (no funcionalizado).

5 Según una realización, los anteriores componentes pueden estar presentes en la envoltura estabilizante en las siguientes cantidades molares:

(i) fosfolípido: 60-98 %, preferentemente 70-85 %

10 (ii) ácido graso: 0-30 %, preferentemente 10-25 %

(iii) PE-PEG que comprende un ligando: 0,03-0,75 %, preferentemente 0,1-0,7 %

(iv) PE-PEG "inactivado": 0,5-7,5 %, preferentemente 1 %-6 %, más preferentemente 1,5-5 %;

15 (v) segundo PE-PEG (no funcionalizado): 0,5-12 %, preferentemente 1 %-10 %.

En una realización preferente, la cantidad molar total de PE-PEG "inactivado" y del segundo PE-PEG (no funcionalizado) es de 2 % a 12 %, preferentemente de 5 % a 10 %.

20 Las microvesículas llenas de gas de la invención, particularmente las obtenidas según el anterior método de preparación, comprenden una cantidad relativamente elevada de ligando en su superficie, a pesar de una cantidad relativamente baja de PE-PEG funcionalizado empleado en la preparación de las mismas. La cantidad de ligando en la superficie de las microvesículas se puede expresar ventajosamente como densidad de ligando por μm^2 de superficie de microvesículas. La densidad de ligando se puede determinar, por ejemplo, mediante medición de la concentración de ligando en la suspensión lavada de microvesículas (por ejemplo mediante fluorescencia, por ejemplo con 4-biotina fluoresceína para microvesículas que contienen estreptavidina) y cálculo de la superficie total de las microvesículas por medición por contador Coulter, como se describe en detalle en los ejemplos.

25 Las microvesículas según la presente invención tienen normalmente una densidad de ligando de al menos 8000 moléculas/ μm^2 , preferentemente de al menos 12000 moléculas/ μm^2 , más preferentemente de al menos 15000 moléculas/ μm^2 y aún más preferentemente de al menos 18000 moléculas/ μm^2 hasta, por ejemplo, 50000 moléculas/ μm^2 .

35 **Métodos de uso**

Las microvesículas llenas de gas de la invención se pueden utilizar ventajosamente en un método de separación de células, normalmente por flotabilidad (también conocido como clasificación celular activada por flotabilidad, "BACS"). El método puede ser útil para separar un tipo deseado de células de otras células en un líquido fisiológico (por ejemplo, sangre o plasma).

40 En particular, el método de separación comprende el etiquetado de una célula deseada a separar con un anticuerpo etiquetado capaz de unirse a un receptor específico (y selectivo) en dicha célula. A continuación, las microvesículas de la invención se añaden a la suspensión de células a separar (incluyendo las que portan el anticuerpo etiquetado); las microvesículas de la invención se asociarán entonces a través del ligando con el residuo de etiquetado unido a la construcción anticuerpo/célula, permitiendo de este modo la separación de las células por flotabilidad (véase, por ejemplo el documento WO 2017/117349). En una realización preferente, el anticuerpo etiquetado es un anticuerpo biotinilado, donde el residuo de biotina es capaz de asociarse a una respectiva fracción, como por ejemplo un residuo de avidina, neutravidina o estreptavidina en microvesículas llenas de gas. Por lo tanto, las microvesículas de la invención se pueden utilizar para la separación de una amplia variedad de células de un líquido fisiológico, siempre que tal célula se pueda etiquetar adecuadamente con un respectivo anticuerpo etiquetado (biotinilado).

50 Son particularmente preferentes formulaciones de microvesículas llenas de gas que comprenden un primer fosfolípido pegilado que es un PE-PEG2000 funcionalizado (por ejemplo DSPE-PEG2000-Mal) y un segundo fosfolípido pegilado es un PE-PEG2000 (por ejemplo DSPE-PEG2000). Preferentemente, el primer fosfolípido pegilado está presente en una cantidad molar de 1 a 5 %, más preferentemente 1,5 % a 4 %; el segundo fosfolípido pegilado está preferentemente en una cantidad molar de 3 % a 12 %, más preferentemente 5 % a 10 %.

Los siguientes ejemplos ayudarán a ilustrar más la invención.

60 **EJEMPLOS**

Materiales

Producto	Proveedor
Estreptavidina	Roche
Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6-(3'-(2-piridiltio)propionamido)hexanoato	Pierce Thermo Scientific
TCEP.HCl (Tricloroetilfosfina)	Pierce Thermo Scientific
Polvo de tampón fosfato	Sigma
Tampón Tris EDTA	Sigma
4-biotina fluoresceína	Sigma Aldrich
DSPC	CordenPharma
Ácido palmítico	Fluka
DPPE-PEG5000	CordenPharma
DSPE-PEG2000-maleimida	Avanti Polar lipids
DSPE-PEG5000-maleimida	NOF
DSPE-PEG2000	CordenPharma
Ciclooctano	Aldrich
PEG 4000	Clariant
NaCl 0,9 %	B.Braun

Métodos**Tamaño y concentración de emulsión:**

5 la distribución de tamaño y la concentración de las microgotas de emulsión se midieron utilizando un contador Coulter Multisizer3 ajustado con una apertura de 30 μm (dilución 20 μL de muestra en 100 mL de disolución de NaCl al 0,9 % - volumen analítico = 100 μL). Se determinaron parámetros como el diámetro promedio en número y en volumen (DN y DV respectivamente en μm), la concentración total de microgotas (Conc.T. en parte/mL), la concentración de microgotas $>2 \mu\text{m}$ (en parte/mL), la superficie total de microgotas (Surf.T. en $\mu\text{m}^2/\text{mL}$), el volumen total de microgotas (MVC en $\mu\text{L}/\text{mL}$).

10 La concentración de microgotas de emulsión se determinó justo después de la dilución y 2h30 después de la dilución (con mezcla suave). La estabilidad de la emulsión se determinó mediante división de la concentración después de 15 2h30 entre la concentración justo después de la dilución.

Tamaño y concentración de microvesículas:

20 la distribución de tamaño y la concentración de las microvesículas (MV) de emulsión se midieron utilizando un contador Coulter Multisizer3 ajustado con una apertura de 30 μm (dilución 50 μL de muestra en 100 mL de disolución de NaCl al 0,9 % - volumen analítico = 100 μL). Se determinaron parámetros como el diámetro promedio en número y en volumen (DN y DV respectivamente en μm), la concentración total de microvesículas (Conc.T. en parte/mL), la concentración de microvesículas $>2 \mu\text{m}$ (en parte/mL), la superficie total de microvesículas (Surf.T. en $\mu\text{m}^2/\text{mL}$), el volumen total de microvesículas (MVC en $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Determinación de la concentración de estreptavidina:

30 El contenido de STV se determinó en la suspensión de microvesículas nativas y en la suspensión de microvesículas lavadas mediante el ensayo de 4-biotina fluoresceína

Brevemente, después de la medición, las microvesículas se colapsaron en un tanque de ultrasonidos (Branson 5200 - 3 \times 2 min) para obtener una disolución clara. A continuación se tomaron muestras de la disolución en porciones de 50 μL en ocho tubos de vidrio de 5 mL. Se calculó el volumen apropiado de PBS y el volumen apropiado de disolución de 4-biotina fluoresceína (2803 pmoles/mL) para que cada muestra tuviera 0,1, 0,2, 0,4, 0,75, 1,5, 2, 2,5 y 3 veces la capacidad teórica de biotina. Se añadió PBS a la disolución de muestra y después la correspondiente disolución de 4-BF.

40 La disolución se mezcló (vortex) y se incubó 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación se tomaron muestras de cada mezcla en una placa de 96 pocillos (100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ y 2 pocillos por condición) y se leyó la fluorescencia utilizando el lector Cytation 5 (λ_{exc} 480nm - λ_{em} 525nm). La fluorescencia de la curva en función de la

concentración de 4-BF se dibujó para los cuatro primeros puntos (4-BF bajo) utilizando un ajuste polinómico de segundo orden y para los cuatro últimos puntos (4-BF alto) utilizando un ajuste lineal - Se determinó la intersección entre las dos curvas y se determinó la concentración de STV utilizando la curva estándar (a partir de disoluciones de estreptavidina libre).

5 Se calculó la densidad de STV en microvesículas utilizando la superficie de MV total determinada mediante medición del contador Coulter (en moléculas/ μm^2).

Determinación del rendimiento de acoplamiento de estreptavidina:

10 El rendimiento de acoplamiento se calculó mediante división de la densidad de estreptavidina determinada en la suspensión de microvesículas lavadas entre la densidad de estreptavidina determinada en la suspensión de microvesículas nativas (ya que un cierto porcentaje de microvesículas se puede eliminar durante el lavado).

15 **Ejemplo 1**

Derivatización de estreptavidina (STV)

20 Se preparó una disolución de estreptavidina mediante disolución de 54 mg de estreptavidina liofilizada (0,85 mg de STV/mg de polvo (de IBA) - 860,76 nmoles) en 1,62 mL de agua destilada y 1,08 mL de tampón A (fosfato 50 mM, disolución salina 150 mM pH 7,4). Se obtuvo una disolución clara (concentración ~20 mg/mL), se disolvió Sulfo-LC-SPDP (2,5 mg) en 250 μL de agua milliQ. Esta disolución (19 $\mu\text{moles/mL}$) se preparó justo antes del experimento.

25 Se añadió una muestra de la disolución de sulfo-LC-SPDP (160 μL - 3 pmoles - 3,5 equivalentes) a la disolución de STV. La disolución obtenida se mezcló (vortex) y se incubó a temperatura ambiente durante 40 min (agitada utilizando vortex cada 5 min).

30 Se equilibraron dos columnas Zeba de 5 mL utilizando tampón B (fosfato 5 mM pH 7,4). Después de la incubación, se purificó la disolución de STV-SPDP en las dos columnas zeba (2 x 1,43 mL). El volumen de la disolución recuperada purificada era ~2,9 mL.

Se disolvió TCEP (5,4 mg) en 250 μL de tampón C (Tris 500 mM, EDTA 50mM pH:7) para obtener una disolución 75 mM.

35 Se añadió una muestra de la disolución de TCEP (103 μL - ~10 equivalentes) a la disolución de STV-SPDP. Tras el mezclado (vortex), se incubó la disolución a temperatura ambiente durante 30 min para desproteger STV-SDPD y obtener el STV tiolado (STV-SH).

40 Se equilibraron dos columnas Zeba de 5 mL utilizando tampón B. Después de la incubación, se purificó la disolución de STV-SH en las dos columnas (2 x 1,5 mL). El volumen de la disolución recuperada era de alrededor de 3 mL, con una concentración de STV-SH de alrededor de 185 nmoles/ml.

La disolución que contenía STV-SH se utilizó para las posteriores reacciones de acoplamiento con PE-PEG-Mal.

45 **Ejemplo 2**

Preparación de microvesículas de STV utilizando DSPE-PEG2000-maleimida

50 Preparación de fase orgánica: se disolvieron 60 mg de combinación de DSPC/ácido palmítico (relación molar 8/2) en 4,8 mL de ciclooctano a 70°C.

Preparación de fase acuosa: 60 mL de PEG4000 al 10 % en agua

55 Antes de la emulsión, se añadieron 6,7 mg de DSPE-PEG2000-maleimida disueltos en 400 μL de tampón fosfato 100 mM pH 6 a la fase acuosa.

Las dos fases se emulsionaron utilizando un mezclador Megatron MT3000 a alta velocidad de rotación durante 4 min. Después se calentó la emulsión a 60°C durante 1 hora con mezcla suave y después se enfrió a temperatura ambiente.

60 La emulsión se dividió en cuatro fracciones de 14 mL en tubos de 15 mL (Falcon). La disolución de STV-SH (preparada en el Ejemplo 1) se añadió a la emulsión en un volumen tal que se obtuvo la cantidad deseada de nmoles de STV-SH por ml de emulsión, como se indica en la Tabla 1. La emulsión se mezcló y se incubó durante 2h30 a temperatura ambiente.

65 Las emulsiones se diluyeron dos veces con disolución de PEG4000 al 10 % en agua. El tamaño y la concentración de la emulsión se midieron utilizando un contador Coulter Multisizer3 (Beckman Coulter). Una parte de la emulsión diluida

se mantuvo 2h30 a temperatura ambiente bajo mezcla suave para comprobar la estabilidad de la emulsión, expresada como relación entre la concentración de microgotas después de 2h30 (C_1) frente a la concentración de microgotas inicial (C_0).

- 5 Se tomaron muestras de la emulsión diluida en viales DIN20R (3 mL/vial). Después se colocaron los viales en el liofilizador precongelado (Telstar Lyobeta 35) y se liofilizaron. Se llenaron los espacios de cabeza de los viales con la mezcla C_4F_{10}/N_2 (35/65 v/v) y se sellaron los viales.

10 La suspensión de microvesículas se obtuvo tras redispersión con 6 mL de disolución salina (0,9 %) y mezcla suave. El tamaño y la concentración de las microvesículas se midieron utilizando un contador Coulter Multisizer3 (Beckman Coulter).

Tabla 1 (PE-PEG2000-Mal 2,5 %; $N_{PEG} = 50$)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10^9 parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C_1/C_0)	MV total (10^8 parte/mL)	Densidad de STV (molec./ μm^2)	Rendimiento de STV (%)
1a	0	2.8	100%	8.8	NA	NA
1b	0.5	2.5	67%	5.5	8231	81
1c	1	1.0	50%	2.7	ND	ND
1d	3	1.6	6%	2.9	ND	ND

15 Como se puede inferir de los anteriores resultados, la estabilidad de la emulsión después de 2h30 descendió drásticamente al aumentar la cantidad de STV en la emulsión.

Ejemplo 3

20 **Preparación de microvesículas de STV utilizando DSPE-PEG2000-maleimida con diversas cantidades de DPPE-PEG5000**

25 Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 2, excepto que se añadieron adicionalmente 2,5 mg, 5,1 mg o 10,3 mg de DPPE-PEG5000 (correspondiente a una cantidad molar de 0,5 %, 1 % o 2 %, respectivamente) disueltos en 250 μ L de agua destilada a la fase acuosa antes de la emulsión.

Las Tablas 2 a 4 muestran los respectivos resultados.

30 **Tabla 2** (PE-PEG2000-Mal 2,5 %+ PE-PEG5000 0,5 %; $N_{PEG} = 75$)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10^9 parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C_1/C_0)	MV total (10^8 parte/mL)	Densidad de STV (molec./ μm^2)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
2a	0	3.4	100%	12.4	NA	NA	NA
2b	0.5	4.0	93%	10.3	5700	86	0.03
2c	1	4.0	60%	8.8	14000	81	0.05
2d	3	4.1	61%	8.1	37500	94	0.19
2e	5	3.7	20%	7.6	32500	74	0.24

Tabla 3 (PE-PEG2000-Mal 2,5 %+ PE-PEG5000 1 %; $N_{PEG} = 100$)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10^9 parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C_1/C_0)	MV total (10^8 parte/mL)	Densidad de STV (molec./ μm^2)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
3a	0	4.1	100%	14.2	NA	NA	
3b	0.5	4.2	98%	11.7	5400	84	0.03

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
3c (n=2)	1	3.9	95%	10.7	10000	86	0.06
3d (n=2)	3	3.9	100%	10.4	25000	76	0.15
3e	5	3.7	98%	9.7	28500	55	0.18

Tabla 4 (PE-PEG2000-Mal 2,5 %+ PE-PEG5000 2 %; N_{PEG}= 150)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
4a	0	4.0	100%	14.4	NA	NA	
4b	0.5	4.1	100%	12.2	5000	84	0.03
4c (n=2)	1	3.9	100%	12.1	7500	74	0.05
4d (n=2)	3	3.9	98%	11.9	22100	67	0.13
4e	5	3.6	100%	12.3	12900	30	0.10

5 Como se puede inferir de los anteriores resultados, la presencia de PE-PEG5000 al 0,5 % aumenta la estabilidad de la emulsión con respecto a formulaciones que contienen solo PE-PEG2000-mal al menos a bajas concentraciones de STV añadido; en presencia de PE-PEG5000 al 1 %, todas las emulsiones son estables en el tiempo al igual que en presencia de PE-PEG5000 al 2 %, aunque en este último caso se observa una ligera disminución de la densidad y del rendimiento de STV.

10

Ejemplo 4

Preparación de microvesículas de STV utilizando DSPE-PEG2000-maleimida con diversas cantidades de DSPE-PEG2000

15

Ejemplo 4a

Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 2, excepto que se añadieron adicionalmente 5,1 mg o 10,6 mg de DSPE-PEG2000 (correspondiente a una relación molar de 1,9 % o 3,8 %) disueltos en 400 μL de agua destilada a la fase acuosa antes de la emulsión.

20

En la siguiente Tabla 5 se presentan resultados.

Tabla 5 :

25

Prep	Emulsión de STV-SH / mL	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
(PE-PEG2000-Mal 2,5 %+ PE-PEG2000 1,9 %; N _{PEG} = 88)							
5a	1	3.3	42	9.2	9200	91	0.06
5b	3	3.3	25	7.8	31900	86	0.17
5c	5	3.4	30	7.4	39700	84	0.28
(PE-PEG2000-Mal 2,5 %+ PE-PEG2000 3,8 %; N _{PEG} = 126)							
5d	1	3.0	100	11.8	9000	87	0.06

Prep	Emulsión de STV-SH / mL	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
(PE-PEG2000-Mal 2,5 %+ PE-PEG2000 1,9 %; N _{PEG} = 88)							
5e	3	2.9	100	11.0	25000	90	0.18
5f	5	2.8	100	11.4	34700	86	0.28

Mientras que para una concentración molar de PE-PEG200 de 1,9 % el rendimiento y la densidad de STV son relativamente buenos, la estabilidad de la emulsión es relativamente baja.

- 5 Mediante aumento de la cantidad molar de PE-PEG2000 (3,8 %), se puede obtener un aumento sustancial en la estabilidad de la emulsión.

Ejemplo 4b

- 10 Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 4a, excepto que se añadieron 16,1 mg, 22 mg o 28,1 mg de DSPE-PEG2000 (correspondiente a una relación molar de 6%, 8 % o 10 %, respectivamente) disueltos en 1 μL de agua destilada a la fase acuosa antes de la emulsión. Todas las composiciones se prepararon mediante adición de 3 nmoles de STV por mL de emulsión.
- 15 En la siguiente Tabla 6 se presentan resultados.

Tabla 6 :

Prep	DSPE-PEG2000 (% en moles)	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
6a	6	2.7	78	11.6	25700	85	0.17
6b	8	3.1	100	13.5	18300	78	0.18
6c	10	3.9	87	14.9	18300	80	0.15

- 20 Como se puede observar en la anterior Tabla, cantidades molares crecientes de DSPE-PEG2000 dan lugar a cantidades superiores de microvesículas (MV total). Además, con cantidades crecientes de DSPE-PEG2000, el rendimiento de acoplamiento de STV sigue siendo relativamente alto.

25 N_{PEG} para las tres preparaciones en la Tabla 6 es 170, 210 y 250, respectivamente.

Ejemplo 5

Preparación de microvesículas de STV utilizando DSPE-PEG5000-maleimida

- 30 Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 2, excepto que se añadieron 13,4 mg de DSPE-PEG5000-maleimida (2,5 % en moles, Sunbright DSPE-050MA - NOF) en lugar de DSPE-PEG2000-maleimida.

En la siguiente Tabla 7 se presentan resultados.

- 35 **Tabla 7** (PE-PEG5000-Mal 2,5 %; N_{PEG}= 125)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
7a	1	3.0	100%	8.7	8400	78	0.05
7b	3	3.1	100%	6.1	27600	77	0.17
7c	5	3.1	100%	5.8	45400	86	0.28

Como se puede inferir de los anteriores resultados, la sola presencia de PE-PEG5000-mal permite obtener una buena estabilidad de la emulsión, así como rendimientos de STV y densidad de STV aceptables. Sin embargo, se observa una cantidad relativamente inferior en el número total de burbujas (que determina incidentalmente un aumento en la densidad de STV).

5

Ejemplo 6

Preparación de microvesículas de STV utilizando DSPE-PEG5000-maleimida y DPPE-PE5000 o DSPE-PEG2000

Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 5, excepto que se añadieron adicionalmente 5,1 mg de DPPE-PEG5000 o de DSPE-PEG2000 (correspondiente a una cantidad molar de 1 % o 2 %, respectivamente) disueltos en 250 µL de agua destilada a la fase acuosa antes de la emulsión.

En la siguiente Tabla 8 se ilustran resultados.

15

Tabla 8 (PE-PEG5000-Mal 2,5 %+ PE-PEG5000 1 %; N_{PEG}= 175)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /µm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
8a	1	3.6	100%	11.3	6800	72	0.05
8b	3	3.5	100%	8.9	20500	68	0.13
8c	5	3.5	94%	8.2	36200	75	0.25

20

Tabla 9 (PE-PEG5000-Mal 2,5 %+ PE-PEG2000 2 %; N_{PEG}= 165)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /µm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
9a	1	3.5	100%	10.3	7800	87	0.06
9b	3	3.4	100%	8.3	23500	81	0.16
9c (n=2)	5	3.5	96%	6.6	35450	80	0.26

Como se puede inferir de los anteriores resultados, mientras que una mayor cantidad de STV-SH aumenta generalmente la densidad de STV de las microvesículas, sin embargo, cantidades excesivas pueden afectar negativamente otros parámetros, como la cantidad total de microvesículas.

25

Ejemplo 7

Preparación de microvesículas de STV utilizando DSPE-PEG2000-maleimida

Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 2 con la diferencia de que se utilizaron 13,6 mg de DSPE-PEG2000-Mal (5 % molar).

Tabla 10 (PE-PEG2000-Mal 5 %; N_{PEG}= 100)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /µm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
10a	1	3.4	52%	7.0	8208	91	0.06
10b	3	3.3	17%	5.1	36205	100	0.20
10c	5	3.6	26%	6.3	41300	87	0.28

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
Los anteriores resultados muestran que, si bien se obtienen rendimientos y densidad de STV relativamente buenos, incluso una cantidad relativamente elevada de solo el PE-PEG2000-mal puede dar lugar a emulsiones con estabilidad relativamente baja.							

Ejemplo 8**Preparación de microvesículas de STV utilizando DSPE-PEG2000-maleimida y DPPE-PE5000 o DSPE-PEG2000**

5 Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 7, con la diferencia de que se añadieron adicionalmente 2,5 mg de DPPE-PEG5000 (0,5 % molar) o 3,8 mg de DSPE-PEG2000 (1,5 % molar) disueltos en 300 μL de agua destilada a la fase acuosa antes de la emulsión.

10 **Tabla 11** (PE-PEG2000-Mal 5 %+ PE-PEG5000 0,5 %; N_{PEG}= 125)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
11a	1	3.7	100	12.8	6918	99	0.06
11b	3	3.7	100	11.9	23398	98	0.19
11c	5	3.6	100	10.8	38723	99	0.32

Tabla 12 (PE-PEG2000-Mal 5 %+ PE-PEG2000 1,5 %; N_{PEG}= 130)

Prep	STV-SH / mL de emulsión	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
12a	1	3.1	100	11.7	9005	100	0.06
12b	3	3.0	99	10.9	28317	100	0.19
12c	5	3.0	100	9.6	43812	96	0.32

15

Ejemplo 9**Preparación de microvesículas de STV utilizando cantidades variables de DSPE-PEG2000-maleimida y 0,5 % de DPPE-PE5000**

20 Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 4a utilizando diversas cantidades molares de DSPE-PEG2000-maleimida y DPPE-PEG 0,5 % en moles. Tras el tratamiento de las emulsiones, se añadieron 3 nmoles de STV-SH/mL a cada emulsión. En la Tabla 8 se presentan resultados.

25 **Tabla 13** (PE-PEG2000-Mal 0,5, 1,0, 2,5 %+ PE-PEG5000 0,5 %; N_{PEG}= 35, 45 y 75)

Prep	PE-PEG2000-Mal (% en moles)	Tamaño MV DN (μm)	MV total (× 10 ⁸ MB/mL)	Densidad de STV (molec./μm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
13a (n=1)	0.5	2.1	6.9	17721	60	0.12
13b (n=3)	1	2.1	7.2	19555	76	0.16
13c (n=11)	2.5	2.1	7.5	22353	86	0.17

Los anteriores resultados muestran que mediante el uso de una misma cantidad inicial de STV-SH, la formulación con 2,5 % de DSPE-PEG2000-maleimida permitió obtener un mayor rendimiento de acoplamiento de STV.

Ejemplo 10

Influencia de la estabilidad de la emulsión en la suspensión final de microvesículas

Se prepararon formulaciones que comprendían DSPE-PEG2000-maleimida (relación molar 2,5 %) y con diversas cantidades de DPPE-PEG5000 (relación molar 0, 0,5, 1 y 2 %) como se describió anteriormente, con 3 nmoles de STV/mL de emulsión.

Tras el acoplamiento y la dilución de la emulsión, se tomaron muestras de la primera mitad de la emulsión en viales y se liofilizó. Se dejó reposar la segunda mitad de la emulsión 2h30 bajo mezcla suave, después se tomaron muestras y se liofilizó (para imitar el posible momento de muestreo a escala industrial o piloto).

Tras la redispersión se compararon las características de las microvesículas. En la siguiente Tabla 14 se ilustran resultados.

Tabla 14 - Microvesículas de distribución inmediata en viales

Prep.	PEPEG5000 (relación molar)	Muestreo de emulsión	Tamaño MV DN (μm)	MV total ($\times 10^8$ MB/mL)	MB > $2\mu\text{m}$ ($\times 10^8$ MB/mL)
14a1	0	t=0	1.48	2.9	0.5
14a2		Después de 2h30	1.67	0.8	0.2
14b1	0.5	t=0	1.81	8.1	2.3
14b2		Después de 2h30	1.41	6.0	0.7
14c1	1	t=0	1.67	10.5	2.5
14c2		Después de 2h30	1.60	11.2	2.5
14d1	2	t=0	1.59	11.7	2.4
14d2		Después de 2h30	1.55	12.0	2.4

Como se puede inferir de los anteriores resultados, con mayores cantidades molares de PE-PEG5000 (Ejemplos 14c y 14d) se puede obtener una mejor estabilización de la emulsión. Las características de las microvesículas obtenidas a partir de un residuo liofilizado después de 2h30 de la formación de la emulsión eran de hecho similares a las obtenidas tras la liofilización inmediata de la emulsión.

Ejemplo 11

Formulaciones utilizando 1 % de DPPE-PEG5000 en comparación con formulaciones utilizando 8 % de DSPE-PEG2000

Se prepararon microvesículas según el Ejemplo 2, con la diferencia de que se añadieron adicionalmente 5 mg de DPPE-PEG5000 (1 % molar, disueltos en 300) o 22 mg de DSPE-PEG2000 (8 % molar o 1 ml de agua destilada), respectivamente, a la fase acuosa antes de la emulsión; se añadieron 3 nmoles de STV-SH/mL de emulsión a cada emulsión. Se repitió ocho veces cada preparación (n=8). Los resultados se ilustran en la siguiente Tabla 15 (los valores presentados y la media de las ocho preparaciones de cada formulación), mostrando que las dos formulaciones tienen características comparables.

Tabla 15 (PE-PEG2000-Mal 2,5 %+ PE-PEG5000 01 % o PE-PEG2000 8 %)

Prep.	PEPEG (% en moles)	Conc. de emulsión (10^9 parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C_1/C_0)	MV total (10^8 parte/mL)	Densidad de STV (molec. / μm^2)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
15a (n=8)	1	3.7 \pm 0.3	99 \pm 6	9.5 \pm 0.9	27200 \pm 4000	84 \pm 7	0.20 \pm 0.03

Prep.	PEPEG (% en moles)	Conc. de emulsión (10 ⁹ parte/mL)	Estabilidad de emulsión (conc C ₁ /C ₀)	MV total (10 ⁸ parte/mL)	Densidad de STV (molec. /µm ²)	Rendimiento de STV (%)	% en moles de PEPEG-STV
15b (n=8)	8	3.0 ±0.2	95 ±8	12.1 ±1.5	20500 ±2000	80± 7	0.17 ±0.02

Ejemplo 12

Pruebas de recuperación celular

5

Protocolo de prueba

En primer lugar se cultivaron y se expandieron células CCRF-CEM (de ATTC) según el protocolo del proveedor. Justo antes de la prueba, se resuspendieron las células en tampón BSA/EDTA (1 % de BSA y EDTA 2mM en DPBS, sin Ca/Mg) a 5×10⁶ células/mL.

10

La suspensión celular (1 mL, alrededor de 5×10⁶ células) se transfirió a un Eppendorf de baja unión de 2 mL y se añadieron 160 µL de anticuerpo CD45 antihumano de ratón biotinilado (# 555481 - BD Pharmigen) a las células. Se incubó la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio, después se lavaron las células mediante centrifugación (400 g/5 min); se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de tampón BSA/EDTA (mezclando 5 min en un mezclador rotatorio).

15

Después se añadió la suspensión de microvesículas (0,5 ml) a la suspensión celular y se incubó la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. A continuación se centrifugó la mezcla (400 g /5 min) y se recuperó el sobrenadante (complejos célula/microburbujas) mediante pipeteo manual en el menisco de líquido.

20

Después se colapsaron las microvesículas llenas de gas (mediante aplicación de una presión positiva) y se contaron las células en la fracción de sobrenadante y en la fracción infranadante utilizando un hemacitómetro.

La cantidad de recuperación celular se determinó de la siguiente manera: Células sobrenadante / (Células sobrenadante + Células infranadante, expresado como %. También se determinó el balance celular: (Células sobrenadante + Células infranadante) / células iniciales. La prueba se validó solo si el balance celular estaba entre 90 y 110 %.

25

Resultados

30

La efectividad de las suspensiones de microburbujas preparadas en el Ejemplo 11 se evaluó utilizando el protocolo de prueba de recuperación celular descrito anteriormente. Cada una de las ocho preparaciones de cada formulación, 15a o 15b, se probó dos veces (n=2).

35

En la siguiente Tabla 16 se proporcionan resultados.

Tabla 16 : Prueba de recuperación celular

Prep	Recuperación celular (%)
15a (n=8)	85 ±5 %
15b (n=8)	97 ±2%

40

Como se puede inferir del anterior resultado, las preparaciones que comprenden una combinación de PE-PEG2000-Mal y de PE-PEG2000 proporcionan una recuperación acrecentada de células con respecto a preparaciones que comprenden PE-PEG2000-Mal y PE-PEG5000.

Se obtienen resultados similares mediante uso de las preparaciones 6a y 6c (con PE-PEG2000-Mal al 2,5 % y PE-PEG2000 al 6 % o al 10 %, respectivamente).

45

REIVINDICACIONES

1. Una suspensión de microvesículas llenas de gas que comprenden un gas fisiológicamente aceptable con una envoltura estabilizante, que comprende:
- 5 a) un fosfolípido
 b) de 1 % a 8 % en moles de un primer fosfolípido pegilado que comprende una fracción reactiva, estando unida al menos una parte de dicho fosfolípido pegilado a un ligando a través de dicha fracción reactiva; y
 c) de 1 % a 12 % en moles de un segundo fosfolípido pegilado;
 comprendiendo dicha suspensión menos de 40 % en moles de dicho ligando, ya sea en forma libre o unido a dicho
 10 fosfolípido pegilado, con respecto a la cantidad molar de fosfolípido pegilado que comprende dicho ligando en la envoltura.
2. La suspensión según la reivindicación 1 que comprende menos de 33 % en moles de dicho ligando.
- 15 3. La suspensión según la reivindicación 1 o 2, en donde la parte del primer fosfolípido pegilado que comprende un ligando está presente en la envoltura estabilizante en una cantidad molar de 0,03 a 0,75 %.
4. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la parte del primer fosfolípido pegilado no unida al ligando está presente en una cantidad molar de 0,5 % a 7,5 % en dicha envoltura.
- 20 5. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho primer o dicho segundo fosfolípido pegilado es un fosfolípido enlazado covalentemente a un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 1000 a 8000 g/mol.
- 25 6. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho ligando se selecciona a partir del grupo formado por avidina, neutravidina y estreptavidina.
7. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho ligando tiene una densidad en la superficie de al menos 8000 moléculas/ μm^2 .
- 30 8. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho primer o dicho segundo fosfolípido pegilado es un fosfolípido enlazado covalentemente a un polietilenglicol con un peso molecular de 2000 g/mol +/- 5 %.
- 35 9. La suspensión según la reivindicación 8, en donde la cantidad molar de dicho segundo fosfolípido pegilado es de al menos 3,5 %.
10. La suspensión según la reivindicación 8, en donde la cantidad molar de dicho segundo fosfolípido pegilado es de al menos 5 %.
- 40 11. La suspensión según la reivindicación 8, en donde la relación molar relativa entre dicho primer y segundo fosfolípido pegilado es de 1:1 a 1:8.
12. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cantidad molar de fosfolípido es de 60 % a 95 %.
- 45 13. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un lípido.
14. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho primer o segundo fosfolípido pegilado es una fosfatidiletanolamina pegilada.
- 50 15. La suspensión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:donde:
 $N_{\text{PEG}} = MW_1 * \% \text{ en moles}_1 + MW_2 * \% \text{ en moles}_2$ Donde:
 - MW_1 y % en moles₁ se refieren respectivamente al peso molecular y al % molar de la cadena de PEG contenida en
 55 el primer fosfolípido pegilado que comprende la fracción reactiva; y
 - MW_2 y % en moles₂ se refiere respectivamente al peso molecular y al % molar de la cadena de PEG contenida en el segundo fosfolípido pegilado, en donde N_{PEG} es superior a 90.
16. La suspensión según la reivindicación 15, en donde MW_1 y MW_2 son 2000 g/mol +/- 5 %.
- 60 17. Uso de la suspensión como se definió en cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la separación de células.