

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 453**

51 Int. Cl.:
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03782209 .5**
- 96 Fecha de presentación: **18.11.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1562638**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Agente de contraste para los ganglios linfáticos**

30 Prioridad:
18.11.2002 EP 02025600

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2012

73 Titular/es:
**TILL UWE
JAKOB-KAISER-RING 33
99087 ERFURT, DE**

72 Inventor/es:
Uwe, Till

74 Agente/Representante:
Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás

ES 2 380 453 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

Agente de contraste para los ganglios linfáticos

5 La invención se refiere a un agente de contraste a base de colorantes para la visualización de ganglios linfáticos, en particular para la visualización de ganglios linfáticos centinela. Tales agentes de contraste sirven de gran ayuda, por ejemplo, a un cirujano durante la operación de un tumor, para la identificación y posterior extirpación de un ganglio linfático. Además, la invención se refiere a procedimientos para la preparación de dichos agentes de contraste y a su uso para diagnóstico en la medicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los tumores malignos más frecuentes en humanos diseminan sus tumores secundarios en primer lugar en la correspondiente zona de drenaje linfático. De esta manera se producen metástasis en los ganglios linfáticos. Por lo tanto, en la extirpación quirúrgica de tumores, generalmente se extirpan las cadenas ganglionares cercanas al tumor de la manera más completa posible. Seguidamente, los ganglios linfáticos extirpados se analizan con respecto a la presencia de metástasis en el laboratorio de patología. Del resultado depende el tratamiento posterior. Además de los requerimientos quirúrgicos y del gran número de pruebas histomorfológicas, este procedimiento puede suponer, fundamentalmente después de la operación, un perjuicio considerable para la salud de los pacientes, por ejemplo por impedimento del drenaje linfático, la formación de cicatrices, daños en los nervios, etc.

15 Según el concepto que se denomina del ganglio linfático centinela, en la formación de tumores secundarios, en primer lugar se ve afectado el ganglio que se encuentra situado el primero en la zona de drenaje del tumor (Büchels HK, Vogt H, Wagner T, Steinfeld D, Sagasser J, Sentinel-Lymphonodektomie beim Mammakarzinom, Der Nuklearmediziner 1999, 22, 261-267). Al limitarse a la extirpación de este ganglio (o de estos ganglios en caso de varias zonas de drenaje) y a la comprobación de la ausencia de metástasis en este ganglio mediante un, así denominado, corte rápido durante la operación, dicha operación puede finalizarse en este estadio. De este modo, los requerimientos quirúrgicos e histomorfológicos y el perjuicio para los pacientes serían mucho menores. Este "principio del ganglio linfático centinela" está ampliamente establecido en la actualidad para la extirpación quirúrgica de melanomas y se encuentra en la fase de ensayo clínico para muchos otros tipos de tumores (Vogt H, Wengenmair H, Kopp J, Dorn R, Gröber S, Heidenreich P, Der Sentinel-Lymphknoten (SLN): prä- und intraoperative nuklearmedizinische Diagnostik, Der Nuklearmediziner 1999, 22, 233-242; Balch CM, Lange JR, Lymphatic Mapping and Sentinel Node Lymphadenectomy for Cancer: An Overview, Annals of Surgical Oncology 2001, 8(9S), 1-4; Zervos EE, Burak WE, Lymphatic Mapping in Solid Neoplasms: State of the Art, Cancer Control 2002, 8(3), 189-202).

20 En la actualidad se emplean fundamentalmente dos principios metodológicos para la obtención de los ganglios centinela:

25 En uno de ellos se marcan radiactivamente partículas coloidales que se hallan en disolución con tecnecio-99m y se inyectan antes de la operación en la proximidad inmediata del tumor. Las partículas se transportan entonces a través de las vías linfáticas y se almacenan en el ganglio o los ganglios linfáticos centinela. Su detección se realiza normalmente en dos etapas: a) el día anterior a la operación mediante detección de la radiactividad por medio de gammagrafía de cuerpo entero y b) durante la operación con sondas gamma construidas especialmente para ello como detectores de radiactividad. Sin embargo, las desventajas de este procedimiento son considerables (véase Heidenreich P, Vogt H, Bachter D, Büchels H, Steinfeld D, Wawroschek F, Wengenmair H, Wagner T, Das Konzept des Wächterlymphknotens, Dt. Ärzteblatt 2001, 98, A534-540):

- 30 • Requiere la disponibilidad de un departamento de medicina nuclear.
- Es extraordinariamente costoso desde el punto de vista técnico. Además de la gammagrafía de cuerpo entero son necesarias sondas gamma construidas especialmente, que deben ser distintas en función de la zona de la operación.
- 35 • Conlleva la exposición a radiación del equipo quirúrgico, los pacientes y los patólogos y requiere tomar las precauciones correspondientes.
- En ocasiones no es posible la localización inequívoca del ganglio linfático centinela durante la operación por limitaciones de espacio o cuando el ganglio linfático centinela se encuentra muy próximo al punto de inyección, en el que se retiene la mayor parte de la radiactividad que de este modo irradia en exceso el ganglio linfático.

40 A pesar de estas desventajas, en ausencia de alternativas mejores, este procedimiento se usa actualmente en muchos hospitales.

45 En el otro procedimiento, para la visualización de los ganglios linfáticos se inyectan colorantes azules biocompatibles en el entorno inmediato del tumor poco antes de la operación. De este modo se tiñen las vías linfáticas y los ganglios linfáticos. Pero este procedimiento también tiene sus desventajas (Bachter D, Starz H, Volkmar C, Vogt H, Büchels H, Balda BR, Die Sentinel-Lymphonodektomie beim malignen Melanom, Der Nuklearmediziner 1999, 22, 245-252):

- 50 • Aunque los colorantes que se emplean actualmente tiñen los nódulos centinela al principio, no son retenidos completamente por estos, sino que los atraviesan. Por lo tanto, también tiñen después otros ganglios linfáticos más alejados, de modo que el ganglio centinela no siempre puede determinarse inequívocamente. A consecuencia de ello, el cirujano se ve obligado a extirpar numerosos ganglios linfáticos de manera innecesaria, lo que supone un posoperatorio más oneroso para el paciente.
- 55 • Los colorantes pasan a la sangre y se eliminan a través de la bilis y la orina. El paciente presenta una coloración azul que puede durar algunos días.

Las desventajas de los dos procedimientos pueden reducirse en parte por la combinación de ambas técnicas, de modo que, p. ej., una orientación aproximada por la sonda gamma puede mejorarse mediante la tinción de los ganglios linfáticos (Zervos EE, Burak WE, Lymphatic Mapping in Solid Neoplasms: State of the Art, Cancer Control 2002, (8) 3, 189-202). Con una combinación tal se han conseguido los mejores resultados hasta el momento (Allan R, Sentinel node localization: do or dye alone? Br J Radiol 2001, 74, 475-477). Sin embargo, los requerimientos relativos a aparatos y preparaciones son entonces muy elevados.

El documento WO 00/35490 describe agentes de contraste a base de un conjugado de una macromolécula, como p. ej., dextrano, y un colorante, como p. ej., un colorante de triazina, para uso en el diagnóstico de ganglios linfáticos.

El documento US 6.205.352 describe una composición no radiactiva para la identificación de nódulos linfáticos centinela a simple vista que se compone de partículas, como p. ej., microesferas o liposomas, que portan un colorante.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Partiendo de este estado de la técnica, el objetivo en que se basa la invención es poner a disposición una composición para un procedimiento de visualización de ganglios linfáticos que no presente las desventajas de los procedimientos conocidos anteriormente discutidos. En particular, deberá ponerse a disposición un procedimiento igualmente fiable y menos costoso que el procedimiento radiológico de diagnóstico de ganglios linfáticos centinela, que es el más empleado hasta ahora.

Además, según la invención deberá ponerse a disposición una composición que pueda emplearse para un procedimiento tal.

Este objetivo se consigue según la invención mediante la puesta a disposición del uso de un agente de contraste no radiomarcado que contiene partículas de dextrano fisiológicamente tolerables y farmacéuticamente inocuas, que presentan un peso molecular de 1-5 millones y que en el 80% (respecto al número de partículas) o más presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 30 a 300 nm y que tienen un color que puede distinguirse a simple vista del color del tejido humano, para la visualización del ganglio o los ganglios linfáticos centinela de un paciente con tumores.

La invención pone también a disposición un kit que comprende un primer recipiente con el agente de contraste no radiomarcado que comprende como componente fundamental partículas de dextrano fisiológicamente tolerables y farmacéuticamente inocuas, que presentan un peso molecular de 1-5 millones y que en el 80% o más presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 30 a 300 nm y que tienen un color que puede distinguirse a simple vista del color del tejido humano, y un segundo recipiente que comprende una disolución de cloruro de estaño(II), así como un agente de contraste radiomarcado que puede obtenerse del kit según la invención después de mezclar los componentes del kit por neutralización y reacción de la mezcla así obtenida con ^{99m}Tc-pertecnetato.

Preferentemente, las partículas están teñidas con un colorante farmacéuticamente aceptable que tiene al menos un máximo de absorción o de emisión de longitud de onda en el intervalo de la luz visible o en el UV, que con la iluminación correspondiente permite su distinción del tejido humano a simple vista. Con preferencia especial, las partículas teñidas o el colorante usado para su tinción tienen un máximo de absorción en el intervalo de 550 a 680 nm o un máximo de emisión en el intervalo de 380 a 780 nm después de una excitación en el intervalo UV/visible.

PARTÍCULAS

Las partículas de dextrano usadas según la invención presentan, en el 80% o más, preferentemente en más del 90%, con preferencia especial en el 95% o más, respecto al número de partículas, un tamaño de partícula en el intervalo de 30 a 300 nm. Las partículas en este intervalo de tamaños se transportan de hecho a través de los canales linfáticos, pero quedan retenidas en los ganglios linfáticos.

Las partículas usadas según la invención pueden ser partículas (aproximadamente) globulares o no globulares.

Se recomienda el ajuste y la determinación del tamaño de las partículas por filtración fraccionada a través de un filtro de membrana. Si se usan filtros del tipo MF de la empresa Millipore se consideran, p. ej., aquellos con tamaños de poro de 25, 50, 100, 220, 300, 450, 650, 800 y 1.200 nm. En el caso de partículas de hidratos de carbono, como p. ej. partículas de dextrano, el tamaño de las partículas se obtiene por cromatografía en gel como el denominado diámetro de Stokes.

Además, las partículas usadas según la invención deben ser fisiológicamente tolerables por el paciente y farmacéuticamente inocuas, ya que se administran *in vivo*. Los criterios para la tolerancia fisiológica y la inocuidad farmacéutica resultan de las exigencias de las autoridades competentes en materia de medicamentos; para los fines de esta invención puede suponerse que un agente de contraste o bien los componentes que este contiene es o son fisiológicamente tolerables y farmacéuticamente inocuos si han sido autorizados por la EMEA o por una autoridad sanitaria nacional (p. ej., FDA en EE. UU. o BfArM en Alemania) para el diagnóstico de ganglios linfáticos *in vivo*. La tolerancia fisiológica y la inocuidad farmacéutica incluyen que el agente de contraste se encuentra en una forma estéril, apirógena y que no contiene virus. Además, las partículas no deben ser inmunógenas ni dar lugar a metabolitos tóxicos.

Algunos ejemplos de partículas que cumplen estas exigencias son conocidos por el experto y se emplean ya en parte en otras aplicaciones *in vivo*. Son especialmente adecuados para tales partículas los dextranos, almidones, derivados de celulosa sustituidos o sin sustituir, p. ej., goma de acacia, quitosano, pectina, carragenano o alginato, siempre que sean biocompatibles y puedan obtenerse o prepararse con los tamaños de partícula deseados.

Al preparar las partículas según la invención, el tamaño de partícula puede controlarse y ajustarse mediante un tratamiento con ultrasonidos, una precipitación fraccionada un procedimiento de tamizado molecular, técnicas de

filtración o centrifugación.

5 Son adecuadas las partículas de dextrano del tamaño correspondiente. El producto primario se sintetiza por la cepa B512 del lactobacilo *Leuconostoc mesenteroides* y por lo tanto se obtiene biológicamente a partir de su medio de cultivo. Se compone de moléculas de D-glucopiranosas unidas con enlaces α -(1→6) y ramificadas a través de enlaces α -(1→3) (J. W. van Cleve, W. C. Schäfer, C. E. Rist, The structure of NRRLB-512 dextran. Methylation studies, J. Amer. Chem. Soc. 78 (1956) 4435-4438 y S. Lindberg, S. Svenson, Structural studies on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512. Acta Chem. Scand. 22 (1968) 1907-1912). El dextrano aislado del medio de cultivo es una mezcla de pesos moleculares muy diversos. Las cadenas de gran longitud pueden acortarse mediante hidrólisis parcial y los tamaños de partícula deseados pueden aislarse mediante fraccionamiento repetido con mezclas de etanol y agua (B. Ingelman, M. S. Halling, Some physicochemical experiments on fractions of dextran. Ark. Kemi 1 (1949) 61-80).

10 Según la invención se usan fracciones de dextrano con pesos moleculares de 1-5 millones. Se dispone de dextrano T-2000 (fabricante: Amersham Biosciences). El peso molecular medio de este producto es de aproximadamente 2 millones. Tiene una estructura desde fibrosa hasta de ovillo extendido y un diámetro de Stokes, determinado por cromatografía en gel, de aproximadamente 54 nm (Amersham Biosciences, User Report of Dextran T-2000).

COLORANTE

15 El colorante para uso en el agente de contraste según la invención deberá ser farmacéuticamente aceptable y autorizado como sustancia para la administración a humanos *in vivo*. Su función es marcar con color el ganglio linfático centinela para el cirujano sin que este tenga que recurrir a costosas tecnologías, p. ej., sondas gamma, para la identificación de dicho ganglio linfático centinela. Más bien, el cirujano deberá identificar el o los ganglios linfáticos centinela sin más a simple vista. De manera correspondiente, el colorante deberá tener al menos un máximo de absorción o de emisión de longitud de onda en el intervalo de la luz visible o en el UV que con la iluminación correspondiente (con luz normal o luz UV) permita su distinción del tejido humano a simple vista. Preferentemente, el colorante tiene un máximo de absorción en el intervalo de 550 a 680 nm y/o un máximo de emisión en el intervalo de 380 a 780 nm después de una excitación en el intervalo UV/visible. Entre los colorantes con un máximo de emisión en el intervalo de 380 a 780 nm después de la excitación en el intervalo UV/visible, se prefieren entre otros los colorantes fluorescentes, en particular aquellos que emiten en el intervalo visible después de una excitación en el intervalo UV y por tanto pueden usarse sin filtros. Se prefieren especialmente colorantes de color azul oscuro o verde intenso. También se consideran los colorantes negros.

20 Para el empleo en los agentes de contraste según la invención son adecuados colorantes de numerosas clases de colorantes. Se prefieren especialmente los colorantes azoicos, bisazoicos, trisazoicos, diarilmetánicos, triarilmetánicos, antraquinónicos, carbonílicos aromáticos policíclicos, colorantes de índigo, ftalocianinas, colorantes nitrosos, colorantes de trifenodioxazina, colorantes de formazán (complejos de formazán y cobre) y azaanulenos.

25 En concreto se prefieren muy especialmente, p. ej., los colorantes azul ácido 40, verde ácido 27, negro de amida, azul cielo de Chicago, azul Cibacron F3G-A, F-R, FN-R, P-3R, azul brillante Cibacron H-GR, negro Cibacron BG, negro Lanazol B (los colorantes Cibacron y Lanazol pueden obtenerse de Ciba Specialty Chemicals Inc.), azul de Evans, fluoresceínas (fluoresceína y carboxifluoresceína y sus derivados, como p. ej., 2',7'-difluoresceína, que pueden usarse como colorantes reactivos en forma de sus isotiocianatos o ésteres de succinimidilo), carmín de índigo, tetrasulfonato de índigo, azul de isosulfano, azul de metileno, azul monastral, azul patente V, azul brillante FCF, verde S (E142), azul brillante Levafix EFA, negro Levafix EB, negro Levafix E-2G, negro Levafix P-36A, negro Levafix PN-L (los colorantes Levafix pueden obtenerse de Bayer), azul Procion MX-R, azul Procion MX-4GD, azul Procion MX-G, azul Procion MX-2GN (los colorantes Procion pueden obtenerse de ICI), colorante 555 (fabricante: Dyomics), negro Sufimix B y negro Sufimix H-BG (pueden obtenerse de Sumitomo Chemical Company), amarillo Lucifer, rodamina y azul de tripano.

30 La tinción de las partículas según la invención por el colorante puede conseguirse por medio de interacciones químicas y/o físicas (quimisorción o fisisorción). Desde el punto de vista de la estabilidad, se prefieren los enlaces químicos covalentes entre las partículas y el colorante que se obtienen por medio de la reacción con un colorante reactivo. Pero también las interacciones físicas, p. ej., interacciones hidrófobas, formación de puentes de hidrógeno, entre otras, pueden ser totalmente suficientes para una tinción satisfactoria de las partículas, siempre que el complejo colorante-partícula conserve la suficiente estabilidad también *in vivo*. En el caso de partículas de hidratos de carbono se prefiere especialmente una unión covalente del colorante. Una medida práctica de la suficiente estabilidad o resistencia de la unión del colorante a las partículas en el sentido de la invención es, por ejemplo, que no se desprenda (libere) de las partículas en el líquido previsto para la administración durante 24 horas a 37°C más del 5% en peso del colorante unido originalmente.

35 En el sentido de la invención, también son partículas teñidas por un colorante las partículas que contienen un cromóforo en la molécula misma y que por tanto presentan un color propio.

40 Para los fines de esta invención, los colorantes bisazoicos adecuados son compuestos aromáticos sustituidos con dos grupos azo que tienen un máximo de absorción en el intervalo visible, en el intervalo de longitudes de onda entre aproximadamente 550 y 680 nm. Por lo general, los colorantes con una longitud de onda de absorción tal son azules o verdes y, por tanto, especialmente de alto contraste para su uso en la visualización de los ganglios linfáticos. Preferentemente, la extinción del colorante a la longitud de onda de absorción máxima deberá ser lo suficientemente alta como para poder identificar bien el colorante en el tejido a simple vista cuando se administra en las cantidades habituales para inyección.

45 Los colorantes bisazoicos son especialmente adecuados para la tinción de partículas.

50 Debido a su utilidad fisiológica (véase p. ej., El-Sayed y col., Re-evaluation of Evans blue dye dilution method of

5 plasma volume measurement, Clin. Lab. Haem. 1995, 17, 189-194), el azul de Evans (sal de tetrasodio de 4,4'-bis(1-amino-8-hidroxi-2,4-disulfo-7-naftilazo)-3,3'-bitolilo) es especialmente adecuado como colorante en el agente de contraste según la invención. El azul de Evans se ha usado ya en forma libre para la visualización de los ganglios linfáticos (véase J.-Y. Bobin y col., Tagging Sentinel Lymph Nodes: a Study of 100 Patients with Breast Cancer, Eur. J. Cancer, edición 35, n° 4, 569-573, 1999). Sin embargo, el uso del azul de Evans para la visualización de los ganglios linfáticos se describió posteriormente como desventajoso, en particular frente al azul patente y, por tanto, este último se ha impuesto en la práctica (véase p. ej., Bachter y col., Die Sentinel-Lymphonodectomie beim malignen Melanom, Der Nuklearmediziner, 22, V245-252, 1999). Sin embargo, hasta ahora tanto el azul patente como el azul de Evans se han usado siempre directamente en forma libre, mientras que su uso para la tinción de partículas y el empleo de tales partículas para la visualización de los ganglios linfáticos no se ha descrito ni propuesto.

10 Entre los colorantes con un máximo de absorción en el intervalo de longitudes de onda de 550 a 680 nm, el colorante Cibacron F-R acoplado a hidratos de carbono, como p. ej., dextrano es especialmente adecuado debido a su color intenso, así como a la estabilidad de la unión.

15 Entre los colorantes fluorescentes es especialmente adecuada la fluoresceína (que reacciona como isotiociano de fluoresceína (FITC)), en particular acoplada a partículas de hidratos de carbono, como p. ej., partículas de dextrano. El uso de un conjugado de dextrano y FITC, p. ej., un conjugado de dextrano T-2000 y FITC, en el que hay de 0,01 a 0,02 mol de FITC unidos por unidad de glucosa, permite una detección especialmente sensible en oscuridad al irradiar con una lámpara de UV, en que los ganglios linfáticos centinela se muestran de color amarillo limón.

PREPARACIÓN DEL AGENTE DE CONTRASTE DEFINITIVO

20 Después de la preparación de las partículas teñidas adecuadas, pueden añadirse a estas otros adyuvantes de formulación (aditivos) y a continuación conservarse para el almacenamiento, p. ej., por esterilización y, dado el caso, liofilización, de modo que, después de su disolución, dado el caso, en disolución salina fisiológica o en otro disolvente adecuado se obtiene un agente de contraste listo para usar.

25 El agente de contraste que se prepara según la invención para la detección de ganglios linfáticos centinela contiene las partículas teñidas según la invención, preferentemente en forma estéril y apirógena. Por razones médicas y relativas a la normativa de autorización, la formulación no deberá contener especialmente antígenos de superficie del virus de la hepatitis B (HbAsg), anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (anti-VIH 1/2) ni tampoco anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (anti-VHC). La formulación puede prepararse en forma de una disolución fisiológicamente aceptable y lista para usar que preferentemente deberá ser isotónica o en forma liofilizada.

30 Por ejemplo, una formulación adecuada puede contener glucosa, un tensioactivo no iónico que impide la aglomeración como p. ej. Pluronic (p. ej. Pluronic F-68), tampón de fosfato (fosfato de sodio) y/o fitato de sodio. Sin embargo, en la variante más sencilla, los agentes de contraste según la invención solamente contienen las partículas teñidas según la invención en un sistema tampón isotónico adecuado, p. ej., tampón de fosfato pH 7,4 o tampón de Tris pH 8,0 o en disolución salina isotónica.

35 El agente de contraste no radiomarcado puede usarse para la preparación de un agente de contraste radiomarcado, la cual, debido a la reducida semivida de los marcadores radioactivos habituales como tecnecio-99m, se realiza en el hospital poco antes de la operación, p. ej., por parte de un radiólogo. Para facilitar la preparación en el hospital, la invención pone a disposición también un kit para la preparación de los correspondientes agentes de contraste radiomarcados a partir de los agentes de contraste no radiomarcados según la invención, que se compone del agente de contraste no radiomarcado según la invención y, separado espacialmente de este, una disolución de estaño(II) en ácido clorhídrico. Los dos componentes del kit pueden haberse rellenado, p. ej., en recipientes separados en cantidades tales que el radiólogo solo tiene que mezclar entre sí las cantidades respectivas y a continuación neutralizar la mezcla antes de hacerla reaccionar con, p. ej., ^{99m}Tc-pertecnetato y así obtener un agente de contraste marcado con ^{99m}Tc.

45 APLICACIÓN DEL AGENTE DE CONTRASTE EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES

La invención se refiere al uso de las partículas teñidas como se describe anteriormente para la preparación de un agente de contraste no radiomarcado para la visualización del ganglio o los ganglios linfáticos centinela en un paciente con tumores. Preferentemente, los agentes de contraste se emplean durante la extirpación quirúrgica de un tumor, en particular de un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer cervical o un cáncer de próstata.

50 Este uso es particularmente ventajoso cuando se conoce la dirección de drenaje de la linfa del tumor. Este es el caso con frecuencia, dependiendo del tipo y la localización del tumor. Los agentes de contraste pueden inyectarse inmediatamente antes de la operación (dependiendo del tipo y de la situación del tumor, generalmente entre 10 min y 5 h antes), de modo que el ganglio o los ganglios linfáticos centinela puedan identificarse a simple vista durante la operación por su tinción con las partículas según la invención. Así se evitan todos los requerimientos técnicos, financieros y de personal de la técnica de radioisótopos. También es posible la administración el día anterior a la operación cuando, p. ej., se administran simultáneamente partículas marcadas con tecnecio-99m para determinar la dirección de drenaje de la linfa por medio de gammagrafía.

55 En este uso se administra a un paciente antes de la operación una composición farmacéutica para usar según la invención con partículas teñidas como agente de contraste por inyección en el tumor o en el entorno inmediato de este. Después, se espera un tiempo suficiente para que las partículas teñidas alcancen con seguridad los ganglios linfáticos centinela. Dependiendo del tipo y la situación del tumor, este tiempo de espera es de 10 min a 2 h. Durante la operación se extirpa entonces el tumor junto con el ganglio o los ganglios linfáticos centinela teñidos. Después, según el estado de los ganglios linfáticos centinela se considera la extirpación quirúrgica de otros ganglios linfáticos adicionales. Si el ganglio linfático centinela no contiene metástasis, no es necesaria la extirpación de más ganglios linfáticos.

65 Por el contrario, cuando no se conocen con seguridad las direcciones de drenaje del tumor, es ventajoso, por

5 ser más seguro, el uso de un agente de contraste marcado radiactivamente que puede obtenerse del kit según la invención que contiene el agente de contraste no radiomarcado. Las direcciones de drenaje se determinan antes de la operación con el radioisótopo por gammagrafía de cuerpo entero. Dado que el ganglio o los ganglios centinela se tiñen simultáneamente con las partículas según la invención, dichos ganglios pueden identificarse fácilmente durante la operación. Por tanto, en esta variante se evita la segunda inyección de colorante libre y el uso de sondas gamma, cuya construcción, ajuste y evaluación por ordenador para la atenuación de la radiación de fondo o el aumento de la resolución son extraordinariamente costosos (véase Heidenreich y col., Das Konzept des Wächterlymphknotens, Dt. Ärzteblatt 2001, 98, A534-540).

La invención se explica por medio de los ejemplos siguientes.

10 EJEMPLOS

Ejemplo 1: (ejemplo de referencia)

Preparación de una composición de partículas de albúmina según la invención, a partir de Albu-Res (Nycomed Amersham Sorin)

15 1. Se suspenden 2,5 mg de albúmina como microcoloide a partir de una botella de Albu-Res en 1 ml de tampón de fosfato (Na_2HPO_4 8,2 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM, pH 7,2).

2. A 0,5 ml de esta suspensión se le añaden 2 mg de azul de Evans (Merck), se mezcla y se deja reposar durante 15 min a temperatura ambiente.

3. Después, la suspensión se carga en una columna (d = 1 cm, h = 2,5 cm) rellena con Sephadex G-50 fino (Pharmacia) y equilibrada con el tampón de fosfato de la composición anteriormente mencionada.

20 4. Elución con el mismo tampón de fosfato y fraccionamiento en fracciones de 1 ml. El complejo de azul de Evans y Albu-Res aparece en el volumen exterior.

5. Las fracciones pico (n° 2 a 5) se reúnen y se concentran a un volumen de 0,4 a 0,5 ml mediante un evaporador centrífugo de vacío.

Ejemplo 2: (ejemplo de referencia)

25 millones Preparación de una composición de partículas de dextrano, a partir de dextrano con un peso molecular de 5-40 millones

1. A 1 g de dextrano (peso molecular de 5-40 millones, fabricante: ICN Biomedicals) se le añaden 20 ml de agua bidestilada y se deja aproximadamente una hora en agitación a temperatura ambiente.

2. Tratamiento de ultrasonidos con refrigeración hasta obtener una suspensión clara.

30 3. Se añaden 100 mg del colorante trisazoico azul Cibacron P-3R (fabricante: Ciba) disuelto en 5 ml de agua bidestilada y se agita a temperatura ambiente durante 15 min.

4. Se añaden 0,5 g de NaCl y se agita durante 30 min.

5. Se añaden 0,5 ml de una disolución de NaOH 5 N, se agita y se deja reposar durante 20 h a temperatura ambiente.

35 6. Se neutraliza con HCl 5 N.

7. Se centrifuga (3.000 x g), se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 25 ml de agua bidestilada.

8. Repetición del paso 7 hasta que el sobrenadante deje de mostrar un color azul apreciable y suspensión del precipitado en 20 ml de disolución salina fisiológica.

40 Ejemplo 3:

Preparación de una composición de partículas de dextrano según la invención, a partir de dextrano con un peso molecular de aproximadamente 2 millones

1. A 1 g de dextrano T-2000 (peso molecular de aproximadamente 2 millones, fabricante: Amersham) se le añaden 20 ml de agua bidestilada y se deja aproximadamente una hora en agitación a temperatura ambiente.

45 2. Se añaden 100 mg del colorante trisazoico azul brillante Cibacron H-GR (fabricante: Ciba) disuelto en 5 ml de agua bidestilada y se agita a temperatura ambiente durante 15 min.

3. Se añaden 0,5 g de NaCl y se agita durante 30 min.

4. Se añaden 0,5 ml de una disolución de NaOH 5 N, se agita y se deja reposar durante 20 h a temperatura ambiente.

50 5. Se neutraliza con HCl 5 N.

6. Filtración a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 25 nm y lavado posterior con

agua bidestilada hasta que el filtrado deja de contener colorante.

7. Se añade disolución salina fisiológica al residuo de filtración hasta completar 20 ml.

Ejemplo 4:

5 Preparación de una composición de partículas de dextrano según la invención, a partir de dextrano con un peso molecular de aproximadamente 2 millones

1. A 200 mg de dextrano T-2000 (peso molecular de aproximadamente 2 millones, fabricante: Amersham) se le añadieron 3 ml de agua bidestilada y se dejó aproximadamente una hora en agitación a temperatura ambiente.
- 10 2. Se añadieron 150 mg del colorante de formazán azul Cibacron F-R (fabricante: Ciba) y se agitó a temperatura ambiente durante 15 min para disolverlo.
3. Se añadieron 80 µl de una disolución de NaOH 6 N.
4. La disolución se sacudió durante 18 h a 40°C con una frecuencia de 120 min⁻¹.
- 15 5. Después del enfriamiento se añadieron 5 ml de etanol (al 99,9%), la mezcla se sometió 10 veces a un movimiento de vaivén y a continuación se agitó durante 30 s en un mezclador vórtex. Después de 15 min de reposo a temperatura ambiente se vertió cuidadosamente el sobrenadante. Después de un nuevo reposo se vertió el resto del sobrenadante.
6. Se añadieron 3 ml de una disolución de NaOH 0,16 N al precipitado y se agitó durante 35 min.
7. Los pasos 5 y 6 se repitieron dos veces y a continuación se volvió a repetir el paso 5.
- 20 8. Se añadieron 1,8 ml de agua bidestilada y se sacudió hasta disolver el precipitado (aproximadamente 50 min, más 5 min de agitación en el mezclador vórtex).
9. Se añadieron 75 µl de una disolución de NaCl al 18%.
10. Se añadieron 100 µl de Tris/HCl (1 M, pH 8).

Ejemplo 5:

El ejemplo 4 se repitió usando el colorante azul Cibacron F3GA en lugar del colorante azul Cibacron F-R.

25 Ejemplo comparativo 1:

El ejemplo 4 se repitió usando dextrano con un peso molecular de aproximadamente 500.000 en lugar del dextrano con un peso molecular de aproximadamente 2 millones.

Ejemplo comparativo 2:

30 El ejemplo 5 se repitió usando dextrano con un peso molecular de aproximadamente 500.000 en lugar del dextrano con un peso molecular de aproximadamente 2 millones.

Ejemplo 6: (ejemplo comparativo)

Validación del agente de contraste según la invención mediante experimentos con animales

35 Este ejemplo sirve para la validación experimental de la utilidad de una combinación dada de partícula y colorante por comparación del marcaje de los ganglios linfáticos obtenido por tinción con el marcaje radiactivo obtenido según un procedimiento radiológico estándar. Aunque en este ejemplo se empleó especialmente la combinación de albúmina (Albu-Res) y el colorante de Evans, pueden validarse experimentalmente de manera totalmente análoga otras combinaciones cualesquiera de colorante y partícula. De este modo, los complejos de dextrano y azul Cibacron según los ejemplos 2 y 3 muestran el mismo patrón de marcaje que el tecnecio-99m o las partículas de Albu-Res marcadas con el colorante de Evans usadas en este ejemplo.

40 Los animales de ensayo son ratas Wistar hembra (edad: tres meses, peso: 220-270 g).

1. La anestesia se inicia con éter. Después, el animal recibe ketamina + Rompun (razón de mezcla 1 + 1; 1 µl/g de peso corporal) como inyección intramuscular. Ketamina: 100 mg/ml (Atarost); Rompun: 2% (Bayer Vital).
- 45 2. En el pulpejo de las patas anterior y posterior derecha, respectivamente, se inyectan por vía subcutánea 0,1 ml de la composición preparada según el ejemplo 1, que se mezcla con la Albu-Res marcada con tecnecio-99m que se emplea clínicamente para la visualización de los ganglios linfáticos centinela en una dosis de 1 MBq. Simultáneamente, en las patas anterior y posterior izquierda de los animales, respectivamente, se inyectan 0,1 ml de la composición mencionada en último lugar, igualmente en una dosis de 1 MBq.
3. Después de un tiempo de distribución de 60 min, el animal se sacrifica con una sobredosis de éter.
- 50 4. Los ganglios linfáticos de los dos lados se diseccionan, se extirpan y se numeran del 1 al 19b de acuerdo con la numeración de la figura J-1 en: Hebel H, Stromberg MW (eds.) Anatomy and Embriology of the Laboratory Rat, BioMed Verlag Wörthsee, 1986, y se ordenan.

5. La tinción azul de los ganglios linfáticos se evalúa a simple vista por el observador (0: no hay tinción; 1: tinción débil; 2: tinción intensa) y la cantidad de radiactividad absorbida se mide en un contador gamma.

5 El resultado de un ensayo representativo se documenta en las tablas 1 y 2 con respecto a la radiactividad (RA), por un lado como valor absoluto (tabla 1) y por otro lado en porcentaje de la radiactividad medida total (tabla 2). De aquí resulta que la radiactividad y la tinción azul se distribuyen según el mismo patrón y, por lo tanto, con el complejo de partículas y colorante se identifican los ganglios linfáticos centinela con la misma seguridad que con el procedimiento radiológico. Esto se cumple sin excepción para todos los ensayos con animales realizados hasta el momento. Los complejos de partículas y colorante preparados según los procedimientos expuestos en los ejemplos 2 a 4 muestran también el mismo patrón de distribución que el complejo de Albu-Res y azul de Evans.

10 Tabla 1

Ensayos con Albu-Res marcada con ^{99m}Tc y azul de Evans

Lado derecho: azul de Evans/Albu-Res + ^{99m}Tc/Albu-Res

Lado izquierdo: solo ^{99m}Tc/Albu-Res

Lado del animal	derecho		izquierdo
	RA (cpm)	Tinción	RA (cpm)
1	68,2	0	127,4
2	23,9	0	31,0
3	8,7	0	20,5
4	-	-	-
5a	1.132.749,4	2	420.716,7
5b	97.785,7	1	108.669,6
5c	48.775,6	1	291.815,6
6a	405.990,1	2	270.372,0
6b	74.718,8	0	1.116,1
6c	5.325,6	0	1.290,7
7	10,0	0	19,4
8	-	-	-
9	55,7	0	58,3
10	38,8	0	29,1
11	-	-	-
12	157,6	0	48,2
13*	335,5	0	335,5
14	11.185,3	0	11.967,2
15	-	-	-
16*	3.190,4	0	3.190,4
17	-	-	-
18	168.591,6	1	76.596,4
19a	256,7	0	387,7
19b	332,6	0	363,8
Suma (cpm)	1.949.600,2		1.187.155,6

GL = ganglio linfático; RA = radiactividad; cpm = cuentas por minuto

15 Los ganglios LK 13 y 16 son mediales y únicos (RA anotada en los dos lados)

Tabla 2

Ensayo con Albu-Res marcada con ^{99m}Tc y azul de Evans

Lado derecho: azul de Evans/Albu-Res + ^{99m}Tc/Albu-Res;

Lado izquierdo: solo ^{99m}Tc/Albu-Res

Lado del animal	derecho		izquierdo
	RA (%)	Tinción	RA (%)
1	0,003%	0	0,011%
2	0,001%	0	0,003%
3	0,000%	0	0,002%
4	-	-	-
5º	58,102%	2	35,439%
5b	5,016%	1	9,154%
5c	2,502%	1	24,581%
6a	20,824%	2	22,775%
6b	3,833%	0	0,094%
6c	0,273%	0	0,109%
7	0,001%	0	0,002%
8	-	-	-
9	0,003%	0	0,005%
10	0,002%	0	0,002%
11	-	-	-
12	0,008%	0	0,004%
13*	0,017%	0	0,028%
14	0,574%	0	1,008%
15	-	-	-
16*	0,164%	0	0,269%
17	-	-	-
18	8,647%	1	6,452%
19a	0,013%	0	0,033%
19b	0,017%	0	0,031%
Suma (cpm)	100%		100%

5

Ejemplo 7:

Comparación de distintos experimentos en animales con conjugados de dextrano y colorante

Los animales de ensayo se prepararon como se describe en el ejemplo 6. A continuación, se administró a los animales el agente de contraste de los ejemplos 4 y 5, así como de los ejemplos comparativos 1 y 2, respectivamente, según el procedimiento del ejemplo 6. Se examinó la tinción de los ganglios linfáticos, el paso a la sangre (tinción del tracto gastrointestinal), así como la proporción del colorante en el filtrado después de la filtración con un filtro de 50 nm. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

10

Dextrano (PM)	Azul Cibacron	Tinción del GL centinela	Tinción de los GL de la segunda cadena	Paso a la sangre	Proporción del colorante en el filtrado (filtro de 50 nm)
0,5 mill.	F3GA	sí	sí	sí	81,2%
0,5 mill.	F-R	sí	sí	no	9,1%
2 mill.	F3GA	sí	no	sí	56,3%
2 mill.	F-R	sí	no	no	13,5%

GL = ganglio linfático

5 Los resultados muestran que, a la vista de la falta de tinción de la segunda cadena de ganglios linfáticos, un conjugado de dextrano y colorante con un peso molecular de 2 millones conduce a un resultado de diagnóstico más inequívoco. Además, mediante el uso del colorante azul Cibacron F-R no solamente se consigue una clara tinción de los ganglios linfáticos centinela sino que también se evita el paso a la sangre del colorante y con ello exposiciones innecesarias del paciente al colorante.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente de contraste no radiomarcado que contiene partículas de dextrano fisiológicamente tolerables y farmacéuticamente inocuas que presentan un peso molecular de 1 a 5 millones y que en el 80% o más, con respecto al número de partículas, presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 30 a 300 nm y que tienen un color que puede distinguirse a simple vista del color del tejido humano para la visualización del ganglio o los ganglios centinela de un paciente de tumores.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque las partículas están teñidas con un colorante farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Uso según la reivindicación 2, caracterizado porque el colorante tiene un máximo de absorción en el intervalo de 550 a 680 nm o un máximo de emisión en el intervalo de 380 a 780 nm después de una excitación en el intervalo UV/visible.
4. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el 90% o más de las partículas presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 30 a 300 nm.
- 15 5. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la tinción de las partículas por el colorante tiene lugar mediante interacciones hidrófobas, iónicas o covalentes o mediante la formación de complejos, de tal modo que las partículas no liberan más del 5% en peso, como máximo, del colorante unido originalmente en el disolvente previsto para la administración en 24 horas a 37°C.
- 20 6. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el colorante se elige entre los colorantes azoicos, bisazoicos, trisazoicos, diarilmetánicos, triarilmetánicos, antraquinónicos, ftalocianinas colorantes carbonílicos aromáticos policíclicos, colorantes de trifenodioxazina, colorantes nitrosos, colorantes de índigo, colorantes de formazán (complejos de formazán y cobre) y azaanulenos.
- 25 7. Uso según la reivindicación 6, caracterizado porque el colorante se elige entre azul ácido 40, verde ácido 27, negro de amida, azul cielo de Chicago, azul Cibacron F3G-A, azul Cibacron F-R, azul Cibacron FN-R, azul Cibacron P-3R, azul brillante Cibacron H-GR, azul de Evans, fluoresceína, carmín de índigo, tetrasulfonato de índigo, azul de isosulfano, azul de metileno, azul monastral, azul patente V, rodamina y azul de tripano.
8. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el colorante es un colorante fluorescente, que al ser irradiado con UV o luz visible, emite una luz en el intervalo de longitudes de onda de 380-780 nm.
- 30 9. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el agente de contraste se encuentra en forma estéril, apirógena y liofilizada.
10. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el agente de contraste se encuentra como suspensión de partículas en un disolvente acuoso farmacéuticamente aceptable, estéril y apirógeno.
- 35 11. Uso según una de las reivindicaciones precedentes para la visualización del ganglio o los ganglios linfáticos centinela en un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer cervical o un cáncer de próstata.
- 40 12. Kit que comprende un primer recipiente con el agente de contraste no radiomarcado que comprende, como componente fundamental, partículas de dextrano fisiológicamente tolerables y farmacéuticamente inocuas que presentan un peso molecular de 1 a 5 millones y que en el 80% o más, con respecto al número de partículas, presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 30 a 300 nm y que tienen un color que puede distinguirse a simple vista del color del tejido humano y un segundo recipiente que contiene una disolución de cloruro de estaño(II).
- 45 13. Agente de contraste radiomarcado que puede obtenerse por mezcla de un agente de contraste no radiomarcado, que comprende como componente fundamental partículas de dextrano fisiológicamente tolerables y farmacéuticamente inocuas que presentan un peso molecular de 1 a 5 millones y que en el 80% o más, con respecto al número de partículas, presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 30 a 300 nm y que tienen un color que puede distinguirse a simple vista del color del tejido humano, con una disolución de cloruro de estaño(II), neutralización y reacción con ^{99m}Tc-pertecnetato.