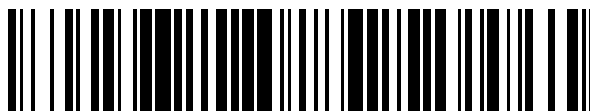


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 094**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05788432 .2**
96 Fecha de presentación: **20.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1768704**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.04.2007**

54 Título: **Visualización de una infección con compuestos que se unen a timidina cinasa**

30 Prioridad:
18.06.2004 US 581222 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.09.2012

73 Titular/es:
**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY
3400 NORTH CHARLES STREET
BALTIMORE, MD 21218, US**

72 Inventor/es:
**POMPER, Martin G.;
BETEGOWDA, Chetan;
FOSS, Catherine;
ZHOU, Shibin;
KINZLER, Kenneth y
VOGELSTEIN, Bert**

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

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).

ES 2 387 094 T3

DESCRIPCIÓN

Visualización de una infección con compuestos que se unen a timidina cinasa

Antecedentes de la invención

La capacidad para diagnosticar y localizar una infección en un sujeto son críticas para el médico. Los métodos actuales para visualizar *in vivo* una infección bacteriana usan tomografía de emisión positrónica con glóbulos blancos radiomarcados o, más recientemente, antibióticos radiomarcados. Estos métodos tienden a ser no específicos, y no pueden distinguir la infección de la inflamación o del cáncer. Por ejemplo, Sarda et al. ensayaron ciprofloxacina marcada con ^{99m}Tc para la visualización mediante imágenes de la infección por *S. aureus* en las articulaciones de la rodilla de conejos. Sus resultados indicaron que este compuesto carece de la especificidad necesaria para aplicaciones clínicas ((2002) J. Nucl. Med 43:239-45). En otro estudio, Fishman et al. determinaron que fluconazol marcado con ^{18}F careció de la especificidad para visualizar efectivamente *Candida* en un modelo de infección de conejo ((1991) J. Pharmacol. Exp. Ther. 529:1351-9).

En consecuencia, existe la necesidad de un método de visualización mediante imágenes no invasivo específico para organismos para detectar la infección, por ejemplo infección bacteriana, vírica o fúngica, en un sujeto.

El documento US 2002/128553 describe inhibidores irreversibles de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-TK) radiomarcados, y su uso como biomarcadores para la radiovisualización médica mediante imágenes, tal como tomografía de emisión positrónica (PET) y tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT), y como radiofármacos para radioterapia.

Los documentos US 5.879.661 y US 6.331.287 describen que el análogo nucleosídico 2'-fluoro-5-metil-1-β-D-arabinofuranosiluracilo (FMAU) tiene una combinación especialmente deseable de propiedades para uso como agente de visualización mediante imágenes, incluyendo en particular catabolismo *in vivo* limitado.

Deng W.-P. et al., "Non-invasive *in vivo* imaging with radiolabelled FIAU for monitoring cancer gene therapy using herpes simplex virus type 1 k thymidine kinase and ganciclovir", EUR. J. NUCL. MED. MOL. IMAGING, vol. 31, no. 1, enero 2004 (2004-01), páginas 99-109, XP001119790, describen un procedimiento de visualización no invasivo mediante imágenes que usa como sustrato enzimático 2'-fluoro-2'-desoxi-5-yodi-1-β-D-arabinofuranosiluracilo (FIAU) regulado, para monitorizar la expresión transgénica del gen de timidina cinasa del virus del herpes simple tipo 1 (HSV1-tk) mediada por un vector retroviral.

Golankiewicz B. et al., "Fluorescent Tricyclic Analogues of Acyclovir and Ganciclovir. A Structure-Antiviral Activity Study", Journal of Medicinal Chemistry, American Chemical Society, Washington, U.S., vol. 44, 2001, páginas 4284-4287, XP001119790, proporcionan una evaluación de una serie de nuevos análogos tricíclicos modificados en la base guanina de derivados de acyclovir y ganciclovir del sistema de 3,9-dihidro-9-oxo-5H-imidazo[1,2-a]purina en busca de actividad frente al virus del herpes simple tipo 1 y 2. Se obtuvieron varios análogos fluorescentes que mostraron una potencia y selectividad similares a las de los compuestos progenitores.

Goslinski T. et al., "Synthesis and Biological Activity of Strongly Fluorescent Tricyclic Analogues of Acyclovir and Ganciclovir", J. Med. Chem., vol. 45, no. 1, 2002, páginas 5052-5057, describen análogos tricíclicos fuertemente fluorescentes de acyclovir y ganciclovir, y una evaluación para determinar su actividad frente al virus del herpes simple tipo 1 y tipo 2 en cultivo celulares.

Saito Y. et al., "Diagnostic Imaging of Herpes Simplex Virus Encephalitis Using a Radiolabelled Antiviral Drug: Autoradiographic Assessment in an Animal Model", Ann. Neurol. 15:548-558, 1984, describen un nuevo enfoque para el diagnóstico de encefalitis por herpes simple usando un fármaco antiviral radiomarcado, 2'-fluoro-5-metil-1-β-D-arabinosiluracilo marcado con carbono 14 (^{14}C]FMAU), como una sonda para visualizar selectivamente mediante imágenes la infección cerebral en un modelo de rata mediante autorradiografía cuantitativa.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un uso en un método de diagnóstico de una infección bacteriana en un sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un uso de visualización diagnóstica mediante imágenes de terapia bacteriolítica.

Sumario de la invención

El compuesto FIAU es un análogo nucleosídico. En una realización específica, el análogo nucleosídico está radiomarcado, por ejemplo con flúor o yodo. En ciertas realizaciones, el análogo nucleosídico emite partículas gamma. Los compuestos ejemplares usados en los métodos incluyen, por ejemplo, 2'-fluoro-2'-desoxi-1-beta-D-arabinofuranosil-5-yodo-uracilo (^{125}I]FIAU).

En una realización relacionada, el análogo nucleosídico es fluorescente.

En ciertas realizaciones, la infección bacteriana está provocada por bacterias del género seleccionado del grupo que consiste en *Escherichia*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Haemophilus*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Pasteruella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Vibrio*, y *Yersinia*.

5 En otro aspecto, la invención proporciona 2'-fluoro-2'-desoxi-1-beta-D-arabinofuranosil-5-yodouracilo (FIAU) adecuado para la visualización mediante imágenes, en el que el método se selecciona del grupo que consiste en gammagrafía plana y tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT), para uso en visualización de terapia bacteriolítica mediante imágenes.

10 El compuesto FIAU es un análogo nucleosídico. En una realización específica, el análogo nucleosídico está radiomarcado, por ejemplo con flúor o yodo. En ciertas realizaciones, el análogo nucleosídico emite partículas gamma. Un compuesto ejemplar usado en los métodos incluye, por ejemplo, 2'-fluoro-2'-desoxi-1-beta-D-arabinofuranosil-5-yodo-uracilo ([125I]-FIAU).

En una realización relacionada, el análogo nucleosídico es fluorescente.

En otra realización relacionada, la invención permite la diferenciación de infección bacteriana e inflamación o cáncer.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el uso de compuestos adecuadamente funcionalizados que se unen a un polipéptido, por ejemplo una timidina cinasa, expresado por un organismo infeccioso, permite la visualización de la infección mediante imágenes. Esta invención se refiere, al menos en parte, al diagnóstico y localización de una infección, por ejemplo infecciones provocadas por bacterias, virus, u hongos. Por ejemplo, esta presente invención permite la visualización de focos infecciosos, la localización de
20 tumores que alojan bacterias anaerobias, el diagnóstico de la infección, la monitorización de la terapia antibacteriana, el estudio del tráfico bacteriano para terapias emergentes bacterianas del cáncer, y para el tratamiento de infección por medios no invasivos.

25 El término "tratado", "tratar" o "tratamiento" incluye la reducción o alivio de al menos un síntoma asociado o provocado por el estado, trastorno o enfermedad que se esté tratando. En ciertas realizaciones, el tratamiento comprende la inducción de un estado inhibido por Pin1, seguido de la activación del compuesto modulador de Pin1, que a su vez disminuiría o aliviaría al menos un síntoma asociado o provocado por el estado, trastorno o enfermedad asociado a Pin1 que se este tratando. Por ejemplo, el tratamiento puede ser la disminución de uno o varios síntomas de un trastorno o la erradicación completa de un trastorno.

30 El término "sujeto" está destinado a incluir mamíferos, por ejemplo seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas, y animales no humanos transgénicos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano, por ejemplo un ser humano que sufre, tiene riesgo de sufrir, o es potencialmente capaz de sufrir una infección o cáncer.

35 El término "cáncer" incluye neoplasias caracterizadas por crecimiento celular desregulado o incontrolado, por ejemplo carcinomas, sarcomas, leucemias, y linfomas. El término "cáncer" incluye tumores malignos primarios, por ejemplo aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto distintos del sitio del tumor original, y tumores malignos secundarios, por ejemplo aquellos que surgen de metástasis, la migración de células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original.

40 La expresión "cantidad eficaz" de un compuesto es la cantidad necesaria o suficiente para proporcionar una señal legible cuando se visualiza mediante imágenes usando las técnicas descritas aquí, por ejemplo gammagrafía plana y tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT). La cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el tamaño y peso del sujeto, el tipo de enfermedad, o el compuesto particular. Por ejemplo, la elección del compuesto puede afectar a lo que constituye una "cantidad eficaz". Alguien de pericia normal en la técnica sería capaz de estudiar los factores contenidos aquí y realizar la determinación con respecto a la cantidad eficaz del compuesto sin experimentación innecesaria.

45 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica, e incluye un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, adecuado para administrar compuestos usados en los métodos descritos aquí a sujetos, por ejemplo mamíferos. Los vehículos incluyen carga, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante líquidos o sólidos, implicados en el transporte o traslado del agente sujeto desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el
50 sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao o ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de haba de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes,
55

tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; disolución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de tampones de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Compuestos de la invención

5 Los métodos descritos aquí hacen uso de compuestos que se unen a polipéptidos de timidina cinasa en un organismo y producen una señal detectable que se puede usar para obtener una imagen de un sujeto y, de ese modo, determinar la presencia y localización del organismo. Los compuestos usados en los métodos de la invención se unen a timidina cinasa con mayor afinidad que su unión a una cinasa, por ejemplo una timidina cinasa, en el sujeto al que se administran. Las timidina cinasas son particularmente muy adecuadas para los métodos de la invención. Las timidina cinasas bacterianas tienen una secuencia de consenso en el dominio catalítico de cinasa que no está presente en el dominio catalítico de cinasa de las timidina cinasas de mamíferos (véanse los Ejemplos). En consecuencia, los compuestos con afinidad elevada por timidina cinasas bacterianas muestran una actividad enormemente reducida por timidina cinasas de mamíferos.

15 La invención utiliza compuestos que se sintetizan fácilmente y son detectables para un aparato de visualización mediante imágenes, por ejemplo un instrumento de PET o SPECT. Los compuestos son análogos nucleosídicos que se unen a una timidina cinasa. El análisis bioinformático de las 53 bacterias patógenas cuyos genomas se han secuenciado reveló que cada especie tiene una timidina cinasa (Bettegowda et al. (2005) PNAS 102:1145-50).

En realizaciones específicas, los análogos nucleosídicos están marcados con un radioisótopo, por ejemplo un radioisótopo de yodo o flúor. En otra realización, los análogos nucleosídicos pueden ser fluorescentes.

20 Los compuestos radiomarcados preferidos de la invención son análogos nucleosídicos que se sintetizan fácilmente y de catabolismo *in vivo* limitado. Los compuestos tales como los descritos en las patentes US 5.879.661 y 6.331.287 se pueden usar con los métodos de la invención. Otros compuestos ejemplares útiles en los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, 2'-fluoro-2'-desoxi-1-beta-D-arabinofuranosil-5-yodo-uracilo ([125I]-FIAU).

25 Los compuestos fluorescentes ejemplares que se pueden usar en los métodos de la invención se han descrito recientemente por Golankiewicz et al. ((200)) J. Med. Chem. 44:4284-7) y Goslinski et al. ((2002) J. Med.Chem. 45:5052-7). Los análogos tricíclicos fluorescentes de acyclovir y ganciclovir descritos por Goslinski et al., particularmente GCV3, se pueden usar en los métodos mencionados anteriormente.

Visualización mediante imágenes

30 Generalmente, las técnicas de visualización mediante imágenes implican administrar un compuesto a un sujeto que se puede detectar externamente al sujeto. Las imágenes se generan en virtud de diferencias en la distribución espacial de los agentes de formación de imágenes que se acumulan en diversas localizaciones en el sujeto. Los métodos de la presente invención, las técnicas de visualización mediante imágenes, se basan en los compuestos que son unidos preferentemente por el organismo, por ejemplo el organismo infeccioso. La distribución espacial del agente de formación de imágenes acumulado en un sujeto, por ejemplo en una región infectada, se puede medir usando cualquier medio adecuado, por ejemplo gammagrafía plana y tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT). Como alternativa, en los métodos de la invención se pueden usar técnicas de visualización mediante imágenes que detectan la fluorescencia.

Los isótopos que se desintegran mediante captura electrónica y/o emisión γ se usan en SPECT, e incluyen, por ejemplo, ^{123}I y ^{124}I .

40 Específicamente, la visualización mediante imágenes se lleva a cabo barriendo todo el paciente, o una región particular del paciente, usando el sistema de detección, y detectando la señal, por ejemplo la señal del radioisótopo. La señal detectada se convierte entonces en una imagen. Las imágenes resultantes se deberían leer por un observador experimentado, tal como, por ejemplo, un médico. El proceso anterior se denomina aquí como "visualización mediante imágenes" del paciente. Generalmente, la visualización mediante imágenes se lleva a cabo alrededor de 1 minuto a alrededor de 48 horas tras la administración del compuesto usado en los métodos de la invención. El tiempo preciso de la visualización mediante imágenes dependerá de factores tales como la velocidad de aclaramiento del compuesto administrado, como será fácilmente manifiesto para los expertos en la técnica. Preferiblemente, la visualización mediante imágenes se lleva a cabo entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 4 horas tras la administración.

50 Una vez que se ha obtenido una imagen, el experto en la técnica será capaz de determinar la localización del compuesto. Usando esta información el experto puede determinar, por ejemplo, si está presente una infección, la extensión de la infección, o la eficacia del tratamiento que está llevando a cabo el sujeto. Las imágenes obtenidos a diferentes puntos de tiempo, por ejemplo 12, 24, 36, 48 o más horas, separadas entre sí, son particularmente útiles a la hora de determinar la eficacia del tratamiento, por ejemplo tratamiento antivírico, antibacteriano o antifúngico.

55 A diferencia de los métodos usados actualmente, los métodos de visualización mediante imágenes descritos aquí permiten al médico distinguir la infección de la inflamación y del cáncer.

Dosificación y formulación

Los compuestos para uso en los métodos de la presente invención se pueden administrar oralmente usando cualquier forma de dosificación farmacéuticamente aceptable conocida en la técnica para tal administración. El compuesto se puede suministrar en formas de dosificación sólidas, tales como polvos secos, gránulos, comprimidos o cápsulas, o en formas de dosificación líquidas, tales como jarabes o suspensiones acuosas. El compuesto se puede administrar solo, pero generalmente se administra con un vehículo farmacéutico. Un tratado valioso con respecto a las formas de dosificación es Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing.

Los compuestos para uso en los métodos de la presente invención se pueden administrar en formas de dosificación oral tales como comprimidos, cápsulas (cada una de las cuales incluye formulaciones de liberación sostenida o de liberación en el tiempo), pastillas, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Igualmente, también se pueden administrar en forma intravenosa (bolo o infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, usando todas ellas formas de dosificación bien conocidas por los de pericia normal en la técnica.

Los compuestos para uso en los métodos de la invención se pueden administrar por cualquier medio que produzca contacto del compuesto con el sitio de acción del compuesto en el cuerpo de un hospedante, tal como un ser humano o un mamífero. Se pueden administrar solos o con un vehículo farmacéutico seleccionado en base a la vía escogida de administración y la práctica farmacéutica estándar.

El régimen de dosificación para los compuestos determinados a partir de la presente invención variará, por supuesto, dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración; la especie, edad, sexo, salud, estado médico, y peso del receptor; la naturaleza y grado de los síntomas; el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento; la vía de administración, la función renal y hepática del paciente, y el efecto deseado. Un médico o veterinario normalmente experto puede determinar fácilmente una cantidad eficaz del compuesto a administrar a un sujeto.

Los compuestos para uso en los métodos de la presente invención se pueden administrar en forma intranasal vía uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o vía vías transdérmicas, usando aquellas formas de parches transdérmicos para la piel bien conocidos por los de pericia normal en la técnica.

En los métodos para uso de la presente invención, los compuestos descritos aquí se pueden administrar en mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (denominados colectivamente aquí como materiales vehículo), seleccionados adecuadamente con respecto a la forma pretendida de administración, esto es, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y consistentes con prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente farmacéutico activo se puede combinar con un vehículo inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similar; para administración oral en forma líquida, los componentes farmacéuticos orales se pueden combinar con cualquier vehículo inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua, y similar. Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes, y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como arábica, tragacanto, o alginato sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro de sodio, y similares. Los agentes disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma de xantana, y similares.

Los compuestos para uso en los métodos de la presente invención también se pueden administrar en forma de sistemas de suministro liposómicos, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes, y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina, o fosfatidilcolinas.

Los compuestos para uso en los métodos de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles como vehículos farmacéuticos seleccionables. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol, o polióxido de etileno-polilisina sustituido con restos de palmitoilo. Además, los compuestos determinados a partir de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo políácido láctico, políácido glicólico, copolímeros de políácido láctico y políácido glicólico, poliépsilon-caprolactona, políácido hidroxibutírico, poliortoésteres, poliactales, polidihidropiranos, policianoacilatos, y copolímeros de bloques reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Las cápsulas de gelatina pueden contener el ingrediente activo y vehículos en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, y similares. Los diluyentes similares se pueden usar para obtener comprimidos prensados. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua de medicación durante un periodo de horas. Los

comprimidos prensados pueden estar revestidos de azúcar o pueden estar revestidos de una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger al comprimido de la atmosfera, o pueden estar revestidos entéricamente para la desintegración selectiva en el tubo digestivo. Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden contener color y sabor para aumentar la aceptación del paciente. En general, el agua, un aceite adecuado, disolución salina, dextrosa acuosa (glucosa), y disoluciones de azúcares relacionadas, y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles, son vehículos adecuados para las disoluciones parenterales. Las disoluciones para la administración parenteral contienen preferiblemente una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes estabilizantes adecuados, y, si es necesario, sustancias tamponantes. Los agentes antioxidantes tales como bisulfito sódico, sulfito sódico, o ácido ascórbico, ya sea solos o combinados, son agentes estabilizantes adecuados. También se usan ácido cítrico y sus sales, y EDTA sódico. Además, las disoluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de bezalconio, metil- o propilparabeno, y clorobutanol.

Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia estándar en este campo.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Ensayos de susceptibilidad bacteriana in vitro. 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo (FIAU) (número de catálogo de Moravek M251) y penciclovir (número de catálogo de Moravek M972) se adquirieron de Moravek Biochemicals (Brea, CA). La zidovudina se adquirió de Glaxo Wellcome. Los ensayos de susceptibilidad bacteriana se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos (VWR Scientific), con diluciones en serie de fármaco colocadas en cada pocillo. Cada pocillo se inoculó con *Escherichia coli* (Yale University E. coli Genetic Stock Center, New Haven, CT) y se hizo crecer en caldo Luria (Invitrogen) a 37°C. Los mutantes de TK de *E. coli* se generaron seleccionando colonias espontáneamente resistentes en placas que contienen zidovudina 1 mg/ml. Se seleccionaron diez clones resistentes y se cribaron en busca de supresiones en el gen de TK usando los cebadores de PCR SZ46-eTKKO20F (5'-TGATGAAAAGTAGAACAGTCG-3') y SZ49-eTK-KO789R (5'-ATCAAGACGCAGCACCATG-3'). Se encontró que un clon resistente contiene una supresión en el gen de TK, y se usó para experimentos subsiguientes. Como control para determinar la integridad del ADN de este clon, se amplificó su gen 16S rRNA usando los cebadores SZ-16S-Ecoli993F (5'-ACATCCACGGAAGTTT-TCAG-3') y SZ 16S-Ecoli454R (5'-CCGAAGGTTAAGC-TACCTAC-3').

Inoculación de tumor y administración de esporas. Todos los experimentos con animales se supervisaron y aprobaron por el Animal Welfare Committee de la Universidad John Hopkins, y cumplían con los estándares de la universidad. Para los estudios de implantación de tumor, se usaron ratones atímicos *nu/nu* o BALB/c de 6 a 8 semanas, adquiridos de Harlan Bioproducts for Science (Indianapolis). Se inyectaron s.c. cinco millones de células en el flanco derecho de cada ratón. El volumen tumoral se calculó como longitud X anchura² X 0,5, y los ratones se trataron con esporas de *Clostridium novyi-NT* cuando los tumores ocuparon ~250 mm³. Las esporas de *C. novyi-NT* se prepararon como se describió (15), y a los ratones se les inyectó i.v. 300 millones de esporas suspendidas en 250 μl de PBS.

Tabla 1. Cepas bacterianas visualizadas mediante imagen tras la inyección i.m.

Organismo	Significancia clínica
<i>E. coli</i>	Diarrea de adulto e infantil, infección de las vías urinarias, neumonía, meningitis, y absceso
<i>E. faecalis</i> 49532	Infección hospitalaria, incluyendo enterococos resistentes a vancomicina, infección de las vías urinarias, endocarditis, absceso, y meningitis
<i>S. pneumoniae</i> 49619	Neumonía, meningitis, sinusitis, osteomielitis, y septicemia
<i>S. aureus</i> 29213 y 25293	Celulitis, infección por dispositivo médico interno permanente, úlcera diabética, heridas posquirúrgicas, osteomielitis, endocarditis, meningitis, mastitis, flebitis, neumonía, flemones, forúnculos, e impétigo
<i>S. epidermidis</i> F362	Endocarditis, celulitis, infección de las vías urinarias, e infección por dispositivo médico interno permanente

Preparación de [¹²⁵I]FIAU. Brevemente, se disolvió 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranósido)-uracilo (300 μg, 1,22 mmoles, Moravek) en 170 μl de HNO₃ 2 M. A esta disolución se añadieron 1,5 mCi (1 Ci = 37 GBq) de [I-¹²⁵] Nal-(ICN), y los contenidos se calentaron a 130°C durante 45 minutos. La reacción se paralizó con 150 μl de fase móvil de HPLC ((20:79,9:0,1% de MeCN:H₂O:triethylamina). El [I-¹²⁵]FIAU resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa usando dos pasadas sobre una columna semipreparativa Phenomenex Luna C₁₈ (10 μm, 4,6 x 250 mm,

Phenomenex, Torrance, CA) usando la fase móvil isocrática mencionada anteriormente, a un caudal de 2 ml/min. El producto se concentró a presión reducida y se formuló en disolución salina fisiológica al 0,9% antes de la filtración estéril a través de un filtro de jeringuilla de 0,22 μm . Las formulaciones se mantuvieron a 1 mCi/ml para minimizar el volumen de inyección. El rendimiento radioquímico final fue $\approx 50\%$, la pureza radioquímica fue $>99\%$, y la radioactividad específica fue >2.000 Ci/mmol.

Infecciones experimentales. Para crear infecciones experimentales, se usaron cepas de *E. coli* o aislados clínicos del Laboratorio de Microbiología del Hospital John Hopkins, incluyendo *Staphylococcus aureus* 29213 y 25923, *Streptococcus pneumoniae* 49619, *Enterococcus faecalis* 49532, y *Staphylococcus epidermidis* F362. Las bacterias se hicieron crecer hasta fase logarítmica en caldo de Mueller Hinton con cationes (Remel, Lenexa, KS) o caldo de BBL Todd Hewitt Broth BBL (Becton Dickinson). Las infecciones localizadas se generaron inyectando $\approx 1 \times 10^9$ *E. coli* y $\approx 1 \times 10^8$ de las otras cepas bacterianas en muslos de ratón. Los exámenes morfológicos de las lesiones infecciosas en los muslos de los ratones inyectados con la cepa de *E. coli* deficiente en TK (TK-) mostraron que fueron tan intensas como aquellas que resultan de *E. coli* de tipo salvaje (WT). Para cuantificar el número mínimo de bacterias requerido para generar señales con la visualización mediante imágenes, se inyectó a los ratones en el muslo con cantidades diversas de *S. aureus* 25923. Una hora más tarde, los ratones se sacrificaron, los músculos se recogieron y se homogeneizaron, y los extractos se extendieron sobre placas de agar sangre (Becton Dickinson) para el recuento de colonias. Se encontró que la eficiencia de la siembra en placas de *S. aureus* 25923, que se hizo crecer en medio líquido, fue $>95\%$.

Visualización mediante imágenes in vivo. A los ratones se les inyectaron 225 μCi de [^{125}I]FIAU vía la vena de la cola, y después se visualizaron mediante imágenes en diversos puntos de tiempo. Antes de la visualización mediante imágenes, los ratones se anestesiaron vía administración s.c. de acepromazina y ketamina. Cada barrido duró ≈ 10 min con una cámara de tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT)/tomografía computerizada (CT) para pequeños animales dedicada (Gamma Medica X-SPECT, Northridge, CA) en modo de adquisición plana usando un colimador de orificios paralelos de baja energía y alta resolución (LEHR). Para cada cepa bacteriana usada, se inyectaron y visualizaron al menos dos ratones. Para obtener las imágenes de SPECT/CT, a los animales se les barrió primero durante ≈ 40 min usando una cámara de SPECT para pequeños animales en modo de adquisición tomográfica, usando dos colimadores de orificios paralelos de LEHR. A los animales se les sometió entonces a CT usando marcadores fiduciaros apropiados que permitieron el corrección.

Biodistribución. Los experimentos de visualización mediante imágenes mostraron que se podrían obtener consistentemente relaciones de señal a ruido elevadas en focos infecciosos 24 h después de la administración de [^{125}I]FIAU. En consecuencia, este punto de tiempo se escogió para análisis detallados. Se llevaron a cabo estudios de biodistribución en ratones a los que se les inyectaron $\approx 1 \times 10^8$ *S. aureus* 25923 en un muslo. Seis horas más tarde, a los ratones se les inyectó con 2 μCi de [^{125}I]FIAU, y, después de otras 24 h, los ratones se sacrificaron, se recogieron sus órganos y se determinó la radiactividad.

Susceptibilidad de *E. coli* a análogos nucleosídicos. Para determinar si TK bacteriana endógena podría proporcionar una enzima informadora adecuada para la visualización mediante imágenes, se examinó *in vitro* la susceptibilidad de *E. coli* a una variedad de análogos nucleosídicos habituales. La inhibición del crecimiento indicó que el análogo nucleosídico fue un sustrato para la TK de *E. coli* y de ese modo serviría como un informador de visualización mediante imágenes cuando se marca radiactivamente. *E. coli* demostró ser resistente a genciclovir y penciclovir, pero es bastante sensible a FIAU y a zidovudina.

Para determinar si el gen de TK fue el responsable de esta sensibilidad, se creó un derivado de *E. coli* en el que se suprimió el gen de TK. Para demostrar la ausencia del gen de TK en este derivado, se usó PCR. La cepa de TK fue moderadamente resistente a zidovudina y muy resistente a FIAU. Debido a que FIAU se puede radiomarcarse usando reactivos comercialmente disponibles y se ha usado con éxito para visualizar mediante imágenes células tumorales transfectadas con HSV1-TK, se eligió para ensayar su potencial para visualizar infecciones bacterianas mediante imágenes.

Visualización mediante imágenes in vivo de infecciones por *E. coli*. [^{125}I]FIAU se sintetizó mediante métodos estándar, y se inyectó i.v. en animales 6 h después de las inoculaciones intramusculares de bacterias en los muslos de ratones. El escintigrama plano de cuerpo completo demostró la captación de [^{125}I]FIAU en los muslos de ratones que poseen bacterias de *E. coli* de tipo salvaje (WT). Las señales de las lesiones infecciosas se pudieron ver tan pronto como 2 h después de la inyección de [^{125}I]FIAU, y fueron óptimas ≈ 16 h después de la inyección. Las infecciones de los mismos ratones inoculados con TK de *E. coli* en los muslos opuestos no mostraron captación discernible de [^{125}I]FIAU.

Análisis *in silico* de TK bacteriana. Se llevó a cabo una evaluación *in silico* de genes de TK en todas las 53 bacterias patógenas cuyos genomas se habían secuenciado y se habían puesto a disposición del público. Esta evaluación reveló que cada una de estas especies bacterianas poseía genes de TK. Además, la homología entre estos genes de TK fue llamativa, con un consenso claro entre el dominio catalítico de cinasa. Cada una de las 53 bacterias contenían al menos 25 restos que fueron idénticos a los del consenso. Por el contrario, esta secuencia de consenso no se encontró en las TKs de mamíferos, dando cuenta probablemente de las capacidades diferenciales de las

enzimas de mamíferos para fosforilar sustratos tales como FIAU.

Visualización mediante imágenes de infecciones provocadas por bacterias patógenas. A la luz de esta conservación elevada de secuencias, se esperó que se pudiese usar [125 I]FIAU como un trazador para bacterias patógenas en general. Para ensayar esta idea, se seleccionaron cuatro cepas derivadas de pacientes identificadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Johns Hopkins. En la Tabla 1 se dan las identidades y propiedades clínicas de las cepas seleccionadas. Los focos infecciosos debidos a *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, y *S. pneumoniae* se pudieron visualizar todos ellos fácilmente mediante imágenes con [125 I]FIAU. Se pudieron observar señales robustas tan pronto como 4 h después de la administración de [125 I]FIAU. Los estudios del transcurso del tiempo demostraron que [125 I] permaneció en los tejidos infecciosos durante largos periodos de tiempo, probablemente debido a que [125 I]FIAU se incorporó en el ADN de las bacterias. Contrariamente al mantenimiento de esta señal bacteriana, la señal de fondo en tejidos no infectados disminuyó gradualmente, probablemente debido al metabolismo continuado y la excreción de [125 I]FIAU. Esto dio como resultado relaciones muy elevadas de señal a ruido 48 h después de la administración del trazador.

Para las medidas de distribución cuantitativas, se infectaron muslos de ratón con *S. aureus* 25923 y se administró [125 I]FIAU 6 h más tarde. Los tejidos se recogieron después de otras 24 h, y se midió la radioactividad. El músculo infectado contenía niveles mucho mayores de [125 I]FIAU que los otros tejidos, superando la relación de radioactividad en muslos infectados a muslos no infectados (contralaterales) 14:1.

Para determinar el número mínimo de bacterias que se pudieron visualizar mediante imágenes con este enfoque, se inyectaron diversos números de *S. aureus* 25923 en muslos de ratón. Una hora más tarde, el tejido del muslo se cortó, se homogeneizó y se extendió sobre placas de agar sangre. Se escogió el punto de tiempo de 1 h debido a que éste fue el punto de tiempo más temprano en el que las inyecciones de [125 I]FIAU produjeron consistentemente imágenes escintigráficas discernibles de los focos infecciosos. Tan pocas como 2×10^6 unidades formadoras de colonias por gramo de tejido muscular produjeron señales discernibles.

Visualización de infecciones intratumorales mediante imágenes. Se llevó a cabo la visualización de focos infecciosos que se crearon mediante un procedimiento distinto de la inyección i.m. Se ha demostrado que las esporas de bacterias anaerobias, cuando se administran sistémicamente a ratones, germinan solamente en tejidos tumorales. *C. novyi-NT* es un derivado de *C. novyi* que está desprovisto de su gen toxínico sistémico principal, y por lo tanto se puede suministrar de forma segura a animales. Cuando se inyecta i.v. en ratones que poseen tumores, <1% de las esporas se localizan en los tumores, secuestrándose el resto en el bazo y en el hígado. Las pocas esporas localizadas en el tumor germinan rápidamente, logrando una densidad de $\approx 10^8$ por gramo de tejido en 24 h.

Se trataron ratones BALB/c, que poseen tumores de colon de ratón CT-26, con una única inyección i.v. de *C. novyi-NT*, y se administró [125 I]FIAU 24 h más tarde. Las imágenes en serie mostraron que los tumores se pudieron visualizar tan pronto como 16 h después de la inyección del trazador, con una captación máxima observada 24-48 h después de la inyección de [125 I]FIAU. No se observó captación en tumores que no habían sido tratados con *C. novyi-NT*. Se obtuvieron resultados similares en ratones atímicos que poseen xenoinjertos de cáncer de colon HCT116 y HT-29.

Debido a que la visualización mediante imágenes con una cámara γ plana está limitada en su capacidad para revelar detalles anatómicos, también se llevó a cabo la visualización mediante SPECT/CT. Como se observa en conejos que poseen tumores, tratados con esporas de *C. novyi-NT*, también se pudieron visualizar con CT áreas de gas producidas por las bacterias en tumores CT-26, proporcionando pruebas definitivas de la infección. El corregistro de imágenes mediante de CT con las imágenes de SPECT correspondientes demostró que la germinación bacteriana y la captación del trazador estaban limitadas a la región tumoral. Los ratones no tratados no mostraron signos de gas o de captación de trazador en sus tumores.

Visualización de terapia bacteriolítica mediante imágenes

El siguiente ejemplo expone la visualización mediante imágenes de bacterias secuestradas en el núcleo hipóxico de un tumor.

Una característica distintiva de casi todos los cánceres sólidos es la presencia de hipoxia significativa y necrosis. La bacteria anaerobia manipulada mediante ingeniería *Clostridium novyi-NT* puede seleccionar selectivamente y destruir tumores experimentales. A fin de seguir a *C. novyi-NT* in vivo tras la inyección en ratones, se usó 2'-fluoro-2'-desoxy-5-yodouracilo- β -D-arabinofuranósido marcado con yodo-125 (I-125 FIAU).

Se llevaron a cabo ensayos de susceptibilidad *in vitro* sobre *C. novyi-NT* usando placas de 96 pocillos que contienen diluciones en serie de dos veces de FIAU (Moravek Biochemicals) in medio de clostridios reforzado (Difco). Aproximadamente, se inocularon 10^5 - 10^6 bacterias en cada pocillo, y se incubó a 37°C toda la noche en una cámara anaerobia. El crecimiento de *C. novyi-NT* se midió usando una OD₆₀₀. A fin de ensayar el mecanismo de acción de FIAU sobre las bacterias, se suprimió el gen de timidina cinasa (TK) en *E. coli*. Se llevó a cabo un ensayo de susceptibilidad a FIAU *in vitro* comparando *E. coli* de tipo salvaje con la *E. coli* deficiente en TK mutante. Se usaron placas de 96 pocillos que contienen diluciones en serie de dos veces de FIAU en Caldo Lauria. Aproximadamente,

se inocularon 10^5 - 10^6 bacterias en cada pocillo, y se incubó a 37°C toda la noche. El crecimiento se midió usando OD₆₀₀.

Para los estudios *in vivo*, se marcó FIAU con I-125. El transcurso de tiempo óptimo para la visualización de ratones que poseen xenoinjertos de cáncer de colon HTC-116 se determinó empíricamente variando el tiempo de inyección de FIAU en relación con *C. novyi-NT*. Se llevaron a cabo estudios de biodistribución en doce ratones nu/nu atímicos que poseen xenoinjertos HT116 ~350-400 mm³, seis de los cuales se inyectaron con 300 millones de esporas de *C. novyi-NT* 24 h antes de 2 uCi de I-125 FIAU. Ocho horas después de la inyección de I-125 FIAU, los doce ratones se eutanasiaron mediante dislocación cervical, y el cerebro, pulmones, corazón, sangre, intestino delgado y grueso, hígado, riñones, músculo y tumor se recogieron y se pesaron. La actividad en cada tejido se midió usando un contador gamma automatizado (LKB Wallace 1282 Compugamma CS Universal Gamma Counter). El porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g) se calculó mediante comparación con muestras de una dilución estándar de la dosis inicial. Al menos se visualizaron tres ratones, conteniendo cada uno tumores HCT116, xenoinjerto de cáncer biliar HuCCT1, o de colon de ratón CT26, usando una cámara de SPECT para pequeños animales gamma Medica X-SPECT dedicada, después inyectarlos con esporas de *Clostridium novyi-NT* y 150-200 uCi de I-125 FIAU.

Clostridium novyi-NT tuvo una concentración inhibidora mínima al 50 (MIC₅₀) de ~20 ug/ml de FIAU. *E. coli* de tipo salvaje tuvo una MIC₅₀ de ~10 ug/ml, mientras que la *E. coli* deficiente en TK no fue inhibida en ninguna concentración de FIAU ensayada. Se determinó que la germinación de *C. novyi-NT* se pudo visualizar óptimamente en las siguientes condiciones: inyéctense 300 millones de esporas de *C. novyi-NT*, y 24 h más tarde inyéctense 1250-200 uCi de FIAU y visualícese 8 h más tarde.

Los estudios de biodistribución revelaron una relación de tumor:músculo de 7:1. Todos los tipos tumorales sensibles a terapia bacteriolítica fueron visualizados usando I-125 FIAU.

Los ensayos de susceptibilidad *in vitro* sugieren que *Clostridium C. novyi-NT* se podría visualizar potencialmente usando I-125 FIAU. El mecanismo putativo de acumulación de FIAU en las bacterias es vía fosforilación de FIAU y su integración subsiguiente en el ADN bacteriano. Los datos de biodistribución y de visualización sugieren que I-125 FIAU es un método fácil y robusto para visualizar terapia bacteriolítica en ratones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. 2'-fluoro-2'-desoxi-1-beta-D-arabinofuranosil-5-yodouracilo (FIAU) adecuado para visualización mediante imágenes, en el que el método de visualización mediante imágenes se selecciona del grupo que consiste en gammagrafía plana y tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT), para uso en un método de diagnóstico de una infección bacteriana en un sujeto.
2. FIAU para uso en el método de la reivindicación 1, en el que el FIAU es ^{125}I -FIAU.
- 10 3. 2'-fluoro-2'-desoxi-1-beta-D-arabinofuranosil-5-yodouracilo (FIAU) adecuado para visualización mediante imágenes, en el que el método de visualización mediante imágenes se selecciona del grupo que consiste en gammagrafía plana y tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT), para uso en un método de visualización diagnóstica mediante imágenes de terapia bacteriolítica.