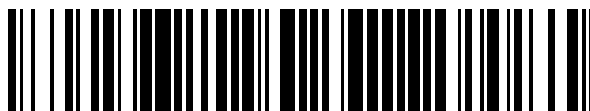


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 307**

51 Int. Cl.:  
**A61K 49/04** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/025** (2006.01)  
**A61K 49/18** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08718366 .1**  
96 Fecha de presentación: **31.03.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2152369**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.2010**

54 Título: **Uso de compuestos fluorados para fines diagnósticos con la ayuda de procesos de formación de imágenes**

30 Prioridad:  
**29.03.2007 DE 102007015598**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.12.2012**

73 Titular/es:  
**CROZET MEDICAL GMBH (100.0%)**  
**Meliesallee 13**  
**40597 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es:  
**SCHRADER, ULRICH y**  
**FLÖGEL, ULRICH**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 393 307 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

Uso de compuestos fluorados para fines diagnósticos con la ayuda de procesos de formación de imágenes

5 La presente invención tiene por objeto el empleo de compuestos fluorados para la detección diagnóstica de estados patológicos inflamatorios, con la ayuda de formación de imágenes RM y TEP.

10 Las enfermedades inflamatorias son de lejos la causa más importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Así como para las enfermedades inflamatorias agudas (debidas principalmente a agentes patógenos) ya existen muchas posibilidades diagnósticas y terapéuticas eficaces, el diagnóstico de enfermedades inflamatorias crónicas es casi siempre difícil y la terapia se limita a medidas sintomáticas. Los métodos no invasivos por formación de imágenes, como la ecocardiografía, la tomografía computarizada y la resonancia de spin nuclear, proporcionan informaciones anatómicas detalladas y por tanto son medios valiosos para valorar el funcionamiento de los órganos. Sin embargo, hasta ahora, resulta notoriamente imposible detectar procesos inflamatorios con gran resolución local, empleando  
15 alguno de dichos métodos

Arens y otros describen en Nature Biotechnology, vol. 23 nº 8, agosto 2005, p. 983-987 un método para detectar células inmunoterapéuticas. Se trata de intentar detectar *in vivo* células de importancia inmunoterapéutica mediante la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (IMR) de perfluoro-15-corona-5-éter. Se usaron células dendríticas cargadas *ex vivo* con perfluoro-15-corona-5-éter. A continuación se examinó *in vivo* su permanencia después de inyectarlas en tejido murino o en ratones por vía intravenosa. Investigaciones análogas han sido también objeto de las patentes WO 2005/072780 y WO 03/075747. G. M. Lanza y otros describen en Medica Mundi 47/1, abril 2003, p. 34-39 el uso de nanopartículas paramagnéticas para la captación de células. Ahí las nanopartículas paramagnéticas se emplean para extinguir señales en la imagen de resonancia magnética H<sup>1</sup>. Como sondas se usan  
20 vehículos cargados con F<sup>19</sup>.

La patente DE 694 33 723 T2 se refiere a un método para la administración *in vitro* de sustancias biológicas y a las composiciones empleadas para ello. En este caso las sustancias biológicas se administran en combinación con una envoltura polimérica.  
30

La patente WO-A-2005/072780 se refiere a la marcación *ex vivo* con perfluorocarbonos de células aisladas. Se revela que las células aisladas y marcadas *ex vivo* con perfluorocarbonos son adecuadas, tras la inyección, para el estudio de migraciones celulares en el organismo.

35 La patente DE-A-41 27 442 se refiere a una técnica para preparar liposomas con perfluorocarbonos, destinados al transporte de oxígeno, es decir como sucedáneo de la sangre.

Maeda, Noriyuki, y otros revelan en Biol. Pharm., Bull. 29, 9, 2006, p. 1936 - 1940, unas flúor<sup>18</sup>-desoxiglucosas encapsuladas en liposomas que, en combinación con la TEP, sirven para investigar *in vivo* la fijación de liposomas en tejido tumoral.  
40

Oku, Naoto, y otros (Biochimica et Biophysics Acta 1280 (1996), 149 – 154) se refieren al empleo de liposomas cargados con glucosa marcada con F<sup>18</sup>, para la investigación del "tráfico liposomal". Los estudios se llevaron a cabo mediante diagnóstico por TEP.  
45

La patente US 5114703 se refiere a la detección diagnóstica del cáncer con un método de formación de imágenes.

50 El objeto de la presente invención era proporcionar un método para representar estados patológicos específicos, por ejemplo procesos inflamatorios, con la ayuda de técnicas de formación de imágenes y reconocer así las zonas afectadas.

El problema técnico objeto de la presente invención se resuelve con el uso de compuestos fluorados, según las reivindicaciones, para la detección diagnóstica de procesos inflamatorios mediante un método de formación de imágenes. Los procesos inflamatorios se escogen del grupo formado por procesos patológicos en la zona periférica de infartos, como infarto de miocardio, apoplejía, tumores; inflamación de órganos, como miocarditis, encefalitis, meningitis (inflamación de las membranas del encéfalo y de la médula espinal); esclerosis múltiple; inflamaciones del tracto gastrointestinal, como la enfermedad de Crohn; inflamaciones vasculares, como la arterioesclerosis, sobre todo de las llamadas "placas vulnerables"; detección de abscesos y artritis. Asimismo se pueden representar nodos linfáticos y sus alteraciones patológicas, especialmente en el caso de procesos del sistema linfático – como ciertos tipos de cáncer - que afectan directamente los nodos linfáticos, sobre todo la enfermedad de Hodgkin, los linfomas no Hodgkin, las metástasis tumorales, p.ej. en el cáncer de mama. Como método de formación de imágenes entra en consideración la medición por resonancia magnética nuclear del isótopo F<sup>19</sup>. El análisis de las correspondientes mediciones y su conversión en una imagen ya es un asunto conocido del especialista, p.ej. a través de Haacke ME, Brown WR, Thompson MR, Venkasetan R: Magnetic Resonance Imaging – Physical Principles and Sequence Design [*Formación de imágenes por resonancia magnética – principios físicos y diseño secuencial*], Wiley, Nueva York, 1999; Yu JX, Kodibagkar VD, Cui W, Mason RP. 19F: a versatile reporter for noninvasive physiology and  
65

pharmacology using magnetic resonance [un indicador versátil para fisiología y farmacología no invasiva mediante el uso de resonancia magnética]; Curr Med Chem. 12: 819-48, 2005 ;Wernick MN, Aarsvold JN Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT, Academic Press, Londres, 2004.

5 El procedimiento de administración intravenosa de un contraste de perfluorocarbono para mejorar la determinación ecocardiográfica del volumen y el factor de eyección ventricular izquierdo publicado por W. Gregory Hundley y otros en el Journal of the American College of Cardiology (JACC, vol. 32, nº 5, (1981): 1426-32) no está incluido en el objeto de la presente invención.

10 La presente invención se basa en el conocimiento de que los compuestos perfluorados, como los fluorocarbonos, son absorbidos por los monocitos/macrófagos y como resultado tiene lugar una marcación de estas células, que se puede aprovechar con fines diagnósticos en métodos de formación de imágenes. Sorprendentemente se encontró un potencial diagnóstico para la visualización de procesos inflamatorios y nodos linfáticos.

15 Los compuestos fluorados se encuentran en un vehículo. Como vehículo entran en consideración los liposomas.

Los liposomas pueden ser concretamente de tipo unilaminar, que el especialista puede preparar y cargar con compuestos fluorados, utilizando métodos ya conocidos. En este caso es necesario aplicar liposomas de un tamaño adecuado para su absorción por células inmunocompetentes (especialmente por macrófagos), comprendido entre 20 100-200 nm. También cabe considerar otras estructuras liposómicas aparte de las unilaminares antes citadas. Los liposomas y su preparación son objeto de diversas publicaciones y bien conocidos del especialista (Mozafari MR, Liposomes: an overview of manufacturing techniques. Cell Mol Biol Lett 10 (2005) 711-9; Basu SC, Basu M, Methods in Molecular Biology: Liposomes Methods and Protocols Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002).

25 Los compuestos fluorados están seleccionados del grupo constituido por los compuestos orgánicos perfluorados, en concreto el bromuro de perfluorooctilo. La presencia del isótopo  $F^{19}$  en los compuestos fluorados tiene la ventaja de que permite el uso de aparatos conocidos y existentes en la clínica, en concreto de espectroscopia de resonancia magnética nuclear con isótopos  $F^{19}$ .

30 El empleo de compuestos fluorados según la presente invención, concretamente aplicados en el vehículo, permite detectar los siguientes estados patológicos:

- 1) representación de nodos linfáticos y su aumento de tamaño patológico
  - a) tipos de cáncer que afectan directamente los nodos linfáticos: enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin;
  - 35 b) metástasis tumorales, p.ej. en el cáncer de mama;
  - c) infecciones virales y bacterianas, p.ej. sífilis, tuberculosis;
- 2) reacciones inflamatorias en la zona periférica de
  - a) infartos, p.ej. infarto de miocardio, apoplejía;
  - 40 b) tumores;
- 3) inflamación de órganos: miocarditis, encefalitis, meningitis (inflamación de las membranas del encéfalo y de la médula espinal);
- 4) esclerosis múltiple;
- 5) inflamación del tracto gastrointestinal, p.ej. enfermedad de Crohn;
- 6) inflamación vascular, p.ej. arterioesclerosis, sobre todo las llamadas "placas vulnerables";
- 45 7) detección de abscesos;
- 8) detección de artritis.

La presente invención se explica seguidamente con mayor detalle mediante ejemplos:

50 La detección de procesos inflamatorios locales por formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) solo se ha logrado hasta la fecha con el uso de partículas de óxido de hierro superparamagnético (OHSP), aprovechando la gran afinidad de estas partículas por el sistema monocitos-macrófagos. Como las partículas de OHSP extinguen la señal de RM, los datos son difíciles de interpretar en algunos casos, porque no pueden diferenciarse con claridad en otros aparatos. Por lo tanto este trabajo tenía el objetivo de establecer un método de RM que permitiera representar por primera vez los procesos inflamatorios mediante un contraste positivo. Como medio de contraste se emplearon perfluorocarbonos (PFC) emulsionados, que son bioquímicamente inertes y al igual que los OHSP son fagocitados por el sistema monocitos-macrófagos.

60 Para provocar procesos inflamatorios agudos se utilizaron dos modelos de lesión distintos (infarto de miocardio e infarto cerebral) en el ratón. El infarto de miocardio se provocó ligando la arteria coronaria izquierda (ACI). En otra serie experimental aparte se empleó el modelo de fototrombosis para inducir una isquemia local en el cerebro. Tras dichas intervenciones se inyectaron en diferentes momentos 100-500  $\mu$ l de una emulsión al 10% del perfluoro-15-corona-5-éter (15C5) en la vena caudal del ratón. Como alternativa, para la detección histológica de los PFC se usó en algunos ensayos una rodamina marcada con emulsión de 15C5.

65 A continuación, empleando un resonador  $H^1/F^{19}$  (diámetro interior 30 mm) a una intensidad de campo de 9,4 tesla

- (espectrómetro Bruker DRX) se grabaron imágenes de RM de  $H^1$  y  $F^{19}$  anatómicamente coincidentes (campo visual  $3,3 \text{ cm}^2$  (corazón) y  $2,2 \text{ cm}^2$  (cerebro),  $H^1$ : Cine-FLASH (corazón, activado por ECG y respiración) o RARE (cerebro, factor RARE 16), espesor de capa 1 mm, matriz 256-256,  $F^{19}$ : RARE (factor RARE 64), espesor de capa 2 mm, matriz 128-128). El registro combinado de imágenes de  $H^1$  y  $F^{19}$  permitió detectar en el corazón una infiltración de PFC en la zona periférica del infarto. La fig. 1 muestra imágenes de RM de  $H^1$  y  $F^{19}$  anatómicamente coincidentes del tórax de un ratón, cuatro días después de haber provocado un infarto de miocardio (fig. 1). La superposición demuestra claramente el enriquecimiento de la señal de flúor en la zona del infarto y en la herida de la operación.
- Las fotografías histológicas de campo claro y fluorescencia de rodamina de cortes criostáticos ( $8 \mu\text{m}$ ) del corazón de ratones cuatro días después de haber provocado un infarto de miocardio (fig. 2) confirman los resultados *in vivo*. La superposición muestra la localización de los perfluorocarbonos marcados con rodamina en la zona periférica del infarto.
- La colocalización de macrófagos y PFC se pudo detectar por tinción con CD11b. La fig. 3 muestra secciones de fotografías histológicas de campo claro y fluorescencia de rodamina de cortes criostáticos ( $8 \mu\text{m}$ ) de un corazón de ratón, cuatro días después de haber provocado un infarto de miocardio. La comparación de la fluorescencia indica claramente la colocalización de la marcación con rodamina (PFC) y las células positivas con D11b (monocitos/macrófagos).
- Se observaron resultados análogos a los del corazón después de un infarto cerebral por fototrombosis. Sin embargo en este caso no se observó la señal de  $F^{19}$  en la zona periférica del infarto (fig. 4) hasta pasados 6-7 días, lo cual coincide con la infiltración retardada de los macrófagos en este modelo, ya conocida de otros estudios. También en este caso se observaron señales adicionales en la herida de la operación y en los nodos linfáticos (ver más adelante y en la fig. 5). La fig. 4 muestra asimismo claramente el desplazamiento de los PFC con la penumbra del área del infarto, la cual se va encogiendo al transcurrir algunos días.
- Independientemente de las lesiones inducidas se pudo detectar en cada caso una acumulación de los PFC en los nodos linfáticos. Esto está representado en la fig. 5, tomando como ejemplo los correspondientes nodos linfáticos en las zonas de la caja torácica superior y de la cabeza del ratón. Se aprecia claramente que los perfluorocarbonos se acumulan en los nodos linfáticos situados en estas áreas.
- Estos resultados fueron confirmados en otros modelos patológicos. Las figuras 6-9 demuestran que la formación de imágenes por RM de  $F^{19}$  tras la inyección de emulsiones de PFC también se puede usar para representar trastornos inflamatorios renales, para detectar esclerosis múltiple y miocarditis, así como para visualizar trastornos inflamatorios vasculares. A continuación se describe brevemente cada una de las figuras:
- La fig. 6 muestra imágenes RM de  $H^1 + F^{19}$  anatómicamente coincidentes de la zona abdominal de un ratón, 4 días después de la inducción de una glomerulonefritis. La superposición demuestra que la señal de flúor se acumula en la corteza renal. Además, según lo esperado, se encuentran señales en el bazo (sistema retículoendotelial).
- En la fig. 7 están representadas unas imágenes RM de  $H^1 + F^{19}$  morfológicamente correspondientes, 7 días después de la inducción de una encefalomiелitis autoinmune experimental (modelo animal para la esclerosis múltiple), que demuestran una acumulación de los perfluorocarbonos en la médula espinal y ósea. Además, según lo esperado, se encuentran señales en el hígado (sistema retículoendotelial).
- La fig. 8 muestra imágenes RM de  $H^1 + F^{19}$  anatómicamente coincidentes que, a los 14 de haber provocado una miocarditis por inyección de troponina I, demuestran una acumulación de la señal de flúor en el ventrículo izquierdo inflamado.
- En la fig. 9 se han reproducido unas imágenes RM de  $H^1 + F^{19}$  anatómicamente correspondientes, 7 días después de la denudación de la arteria carótida derecha (arteria del cuello, modelo de restenosis). Se puede distinguir con claridad la señal de perfluorocarbono alrededor del lumen reducido en el vaso dañado por la mayor formación de neointima.
- En otros ensayos se demostró que variando el perfluorocarbono empleado se puede lograr la eliminación de esta sustancia al cabo de pocos días. La fig. 10 muestra la intensidad de la señal de flúor en el ratón, tras la inyección de  $500 \mu\text{l}$  de una emulsión de perfluorodecalina al 40%. Al cabo de unos 10 días el perfluorocarbono ha desaparecido casi totalmente del cuerpo.
- Estos resultados indican que, tras ser fagocitados por el sistema monocitos-macrófagos, los PFC emulsionados, aplicados por vía intravenosa, se acumulan en áreas inflamatorias del infarto, así como en nodos linfáticos, y se pueden detectar por IMR con gran resolución local. Por tanto los PFC constituyen un contraste "positivo" para los procesos inflamatorios y el sistema linfático que presenta un elevado grado de especificidad por falta de un trasfondo natural de  $F^{19}$ . Como se sabe que los PFC no son tóxicos, este método también sería adecuado para aplicarlo a las personas.

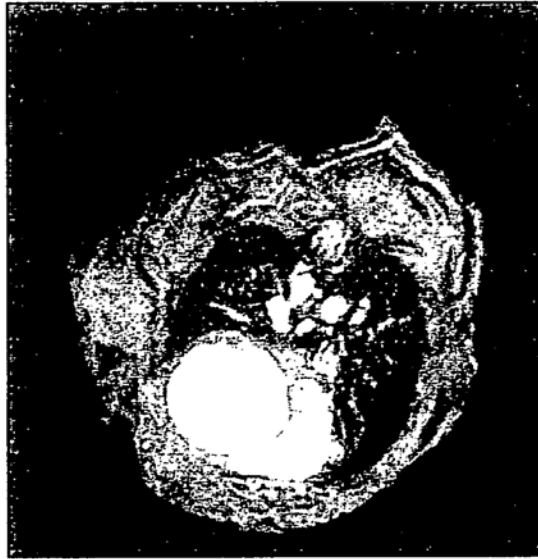
**REIVINDICACIONES**

- 5       **1.**      Uso de un bromuro de perfluorooctilo que contiene al menos un isótopo  $F^{19}$ , en un vehículo, para elaborar un medicamento destinado a la detección diagnóstica mediante un método de formación de imágenes de procesos inflamatorios escogidos del grupo constituido por reacciones inflamatorias en la zona periférica de infartos, como infarto de miocardio, apoplejía; inflamación de órganos, como miocarditis, encefalitis, meningitis (inflamación de las membranas del encéfalo y de la médula espinal); esclerosis múltiple; inflamaciones del tracto gastrointestinal, como la enfermedad de Crohn; inflamaciones vasculares, como la arterioesclerosis, sobre todo de las llamadas "placas vulnerables"; detección de abscesos y artritis, de manera que el método de formación de imágenes se basa en la medición de la resonancia magnética nuclear del isótopo  $F^{19}$  y el vehículo es un liposoma de tamaño comprendido entre 100 y 200 nm.
- 10
- 2.**      Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el vehículo es un liposoma unilaminar.
- 15
- 3.**      Uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el vehículo presenta unas estructuras que permiten una marcación específica de dianas elegidas.
- 4.**      Uso según la reivindicación 3, caracterizado porque las estructuras son moléculas que permiten la fijación de las vesículas a epítomos de antígenos, receptores u otras proteínas, la fijación a ácidos nucleicos y/o membranas de células, tejidos o tipos de órganos escogidos.
- 20
- 5.**      Uso según la reivindicación 3 o 4, caracterizado porque las células, tejidos o tipos de órganos escogidos se hallan en un estado patológico.

25

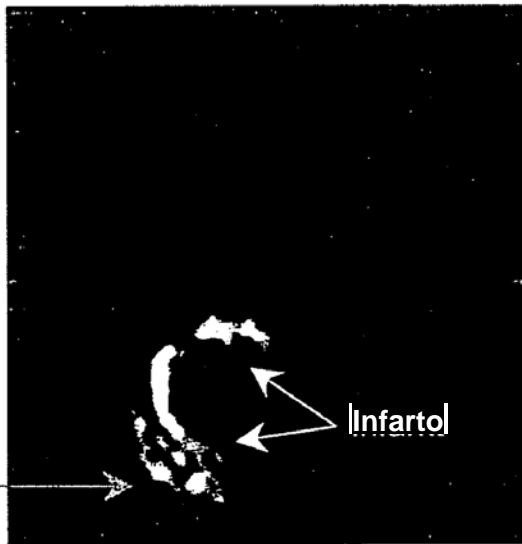
Infarto de miocardio

$^1\text{H}$



$^{19}\text{F}$

Herida de la  
operación



$^1\text{H} + ^{19}\text{F}$



Fig. 1

Infarto de miocardio  
Histología

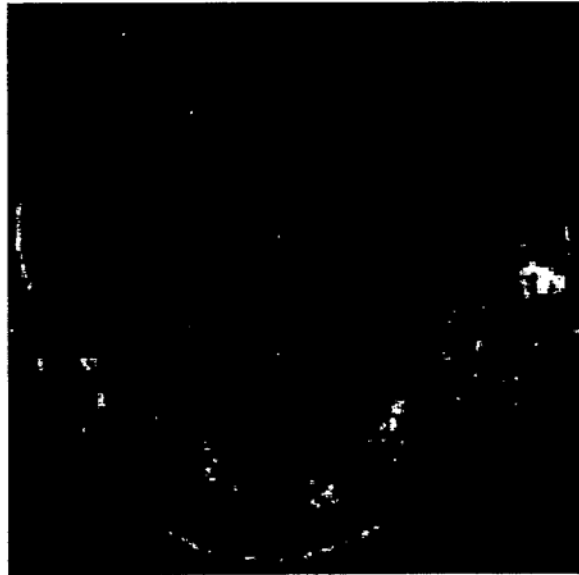
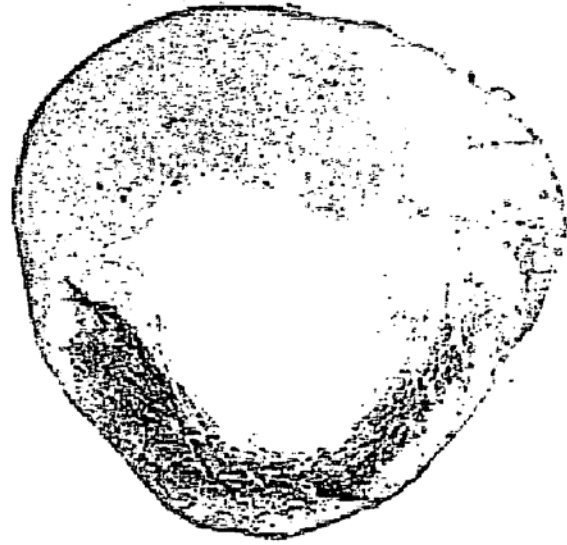
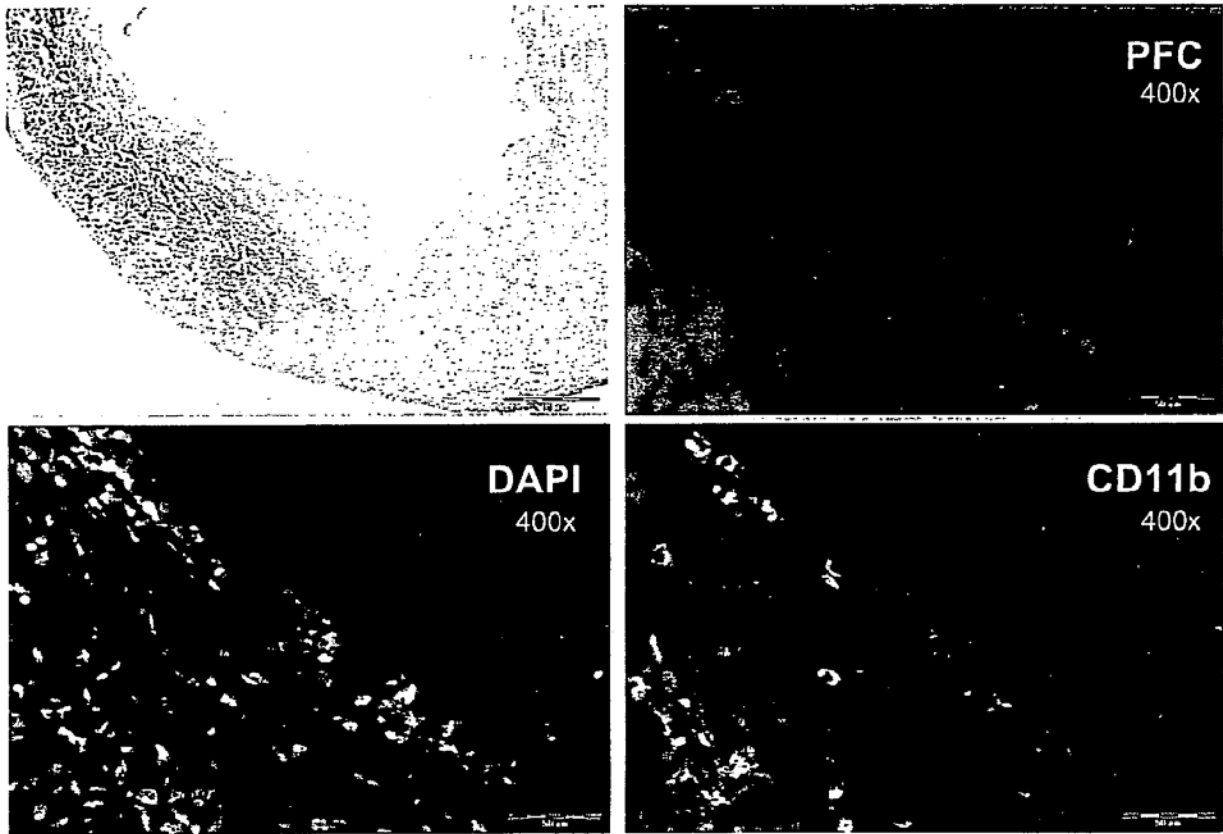


Fig. 2

**Infarto de miocardio  
Histología**



**Fig. 3**



Infarto cerebral

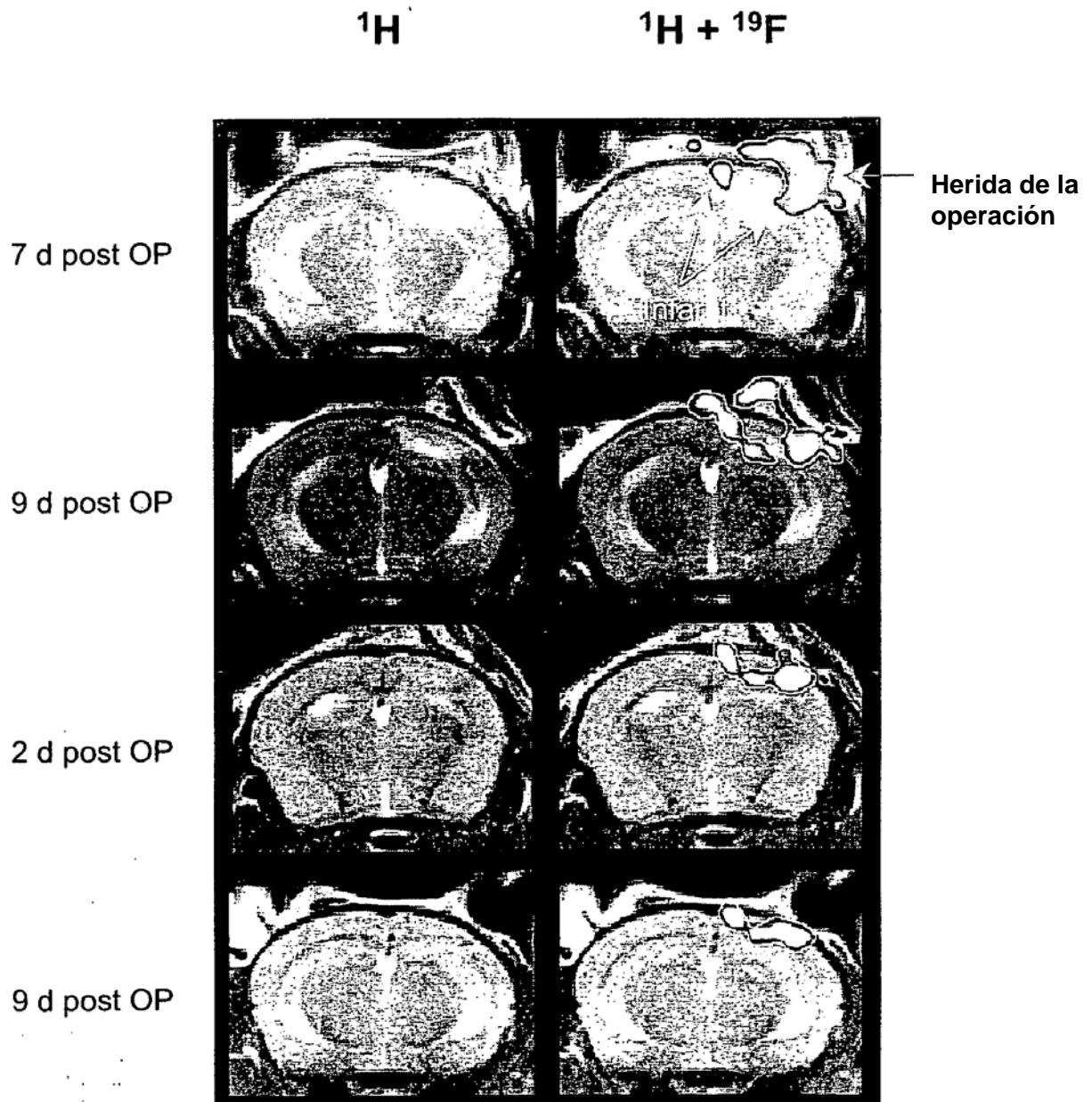
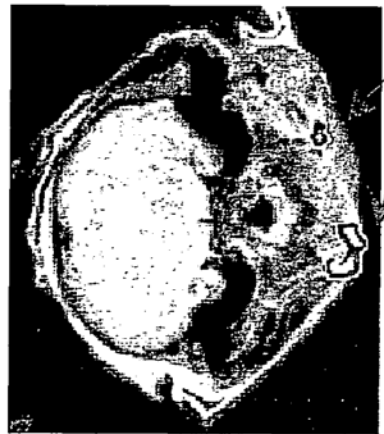
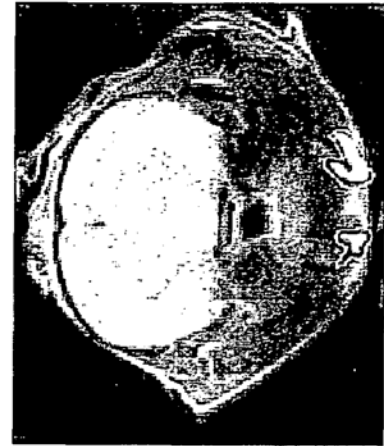
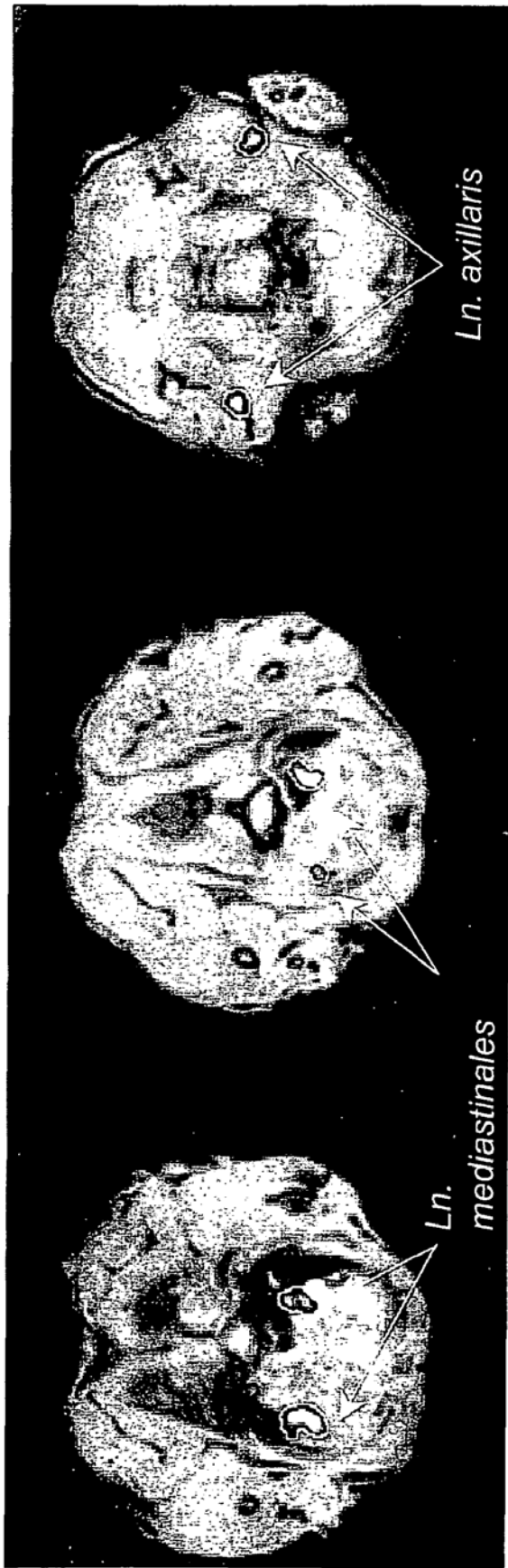


Fig. 4

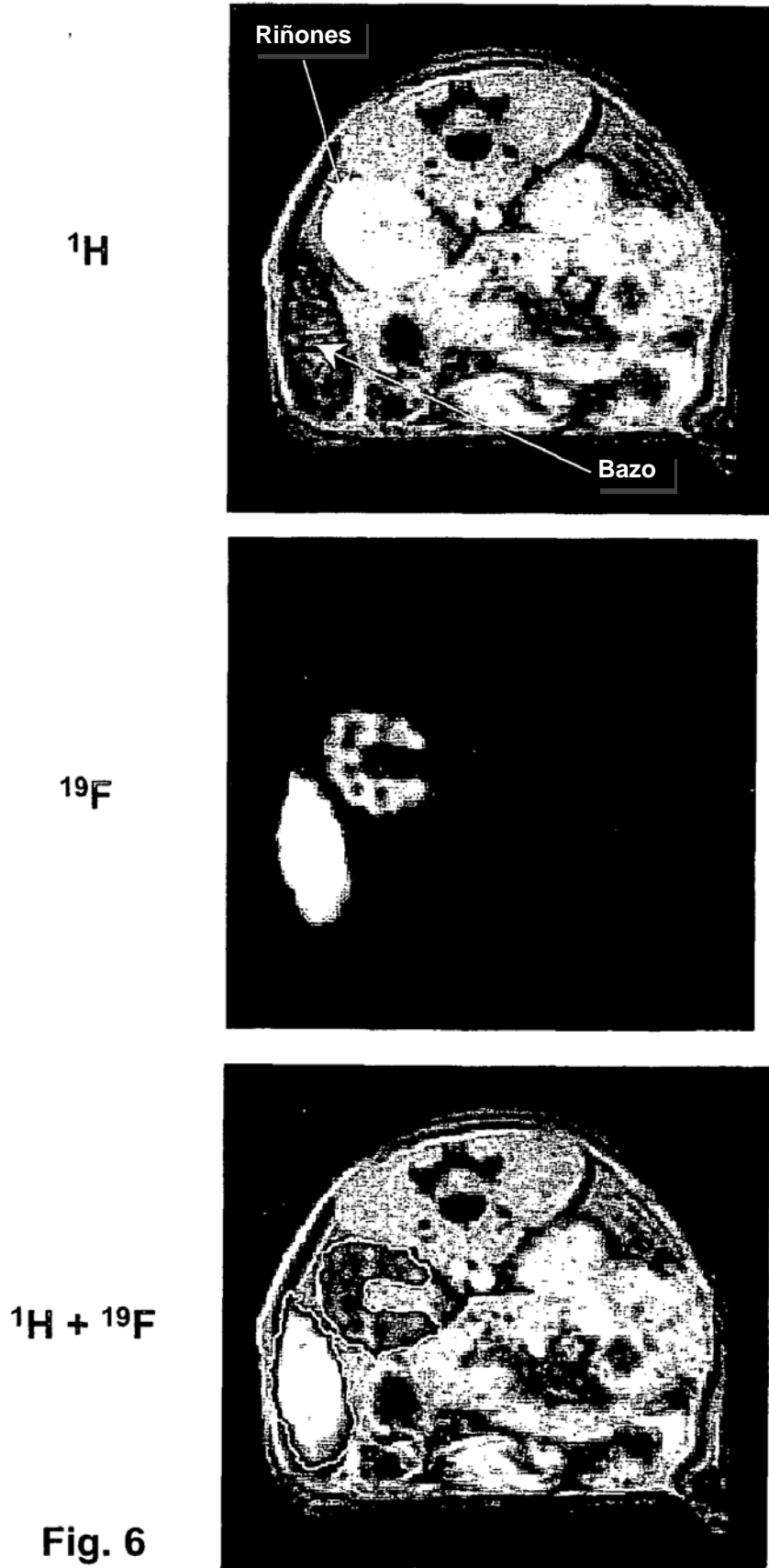
Nodos linfáticos



*Ln. cervicalis*

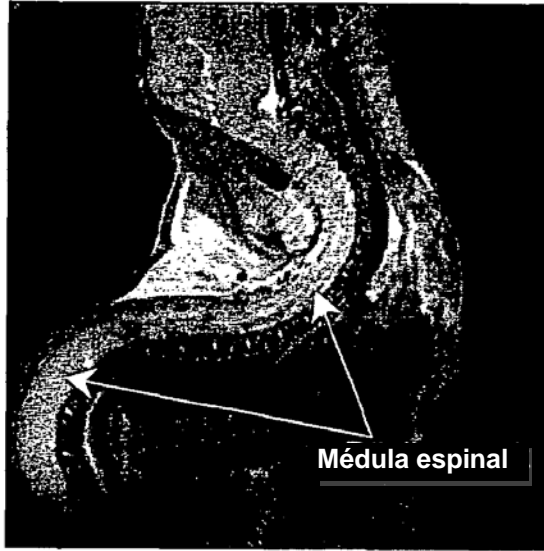
Fig. 5

Glomerulonefritis

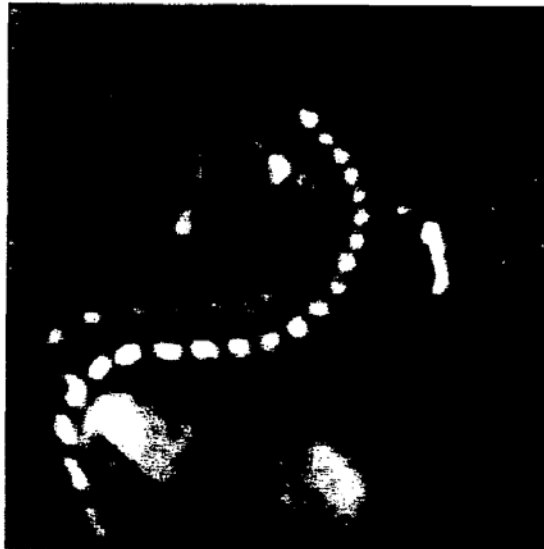


Encéphalomyélite autoimmune expérimentale

$^1\text{H}$



$^{19}\text{F}$



$^1\text{H} + ^{19}\text{F}$

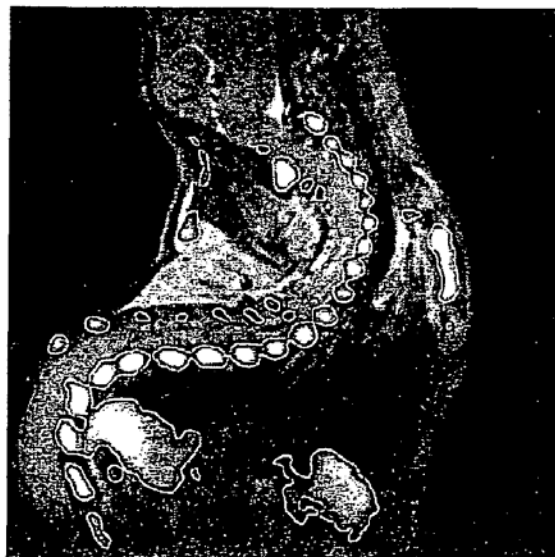
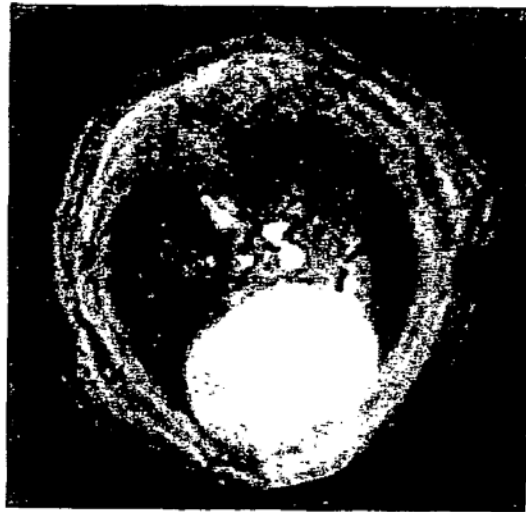


Fig. 7

**Miocarditis**

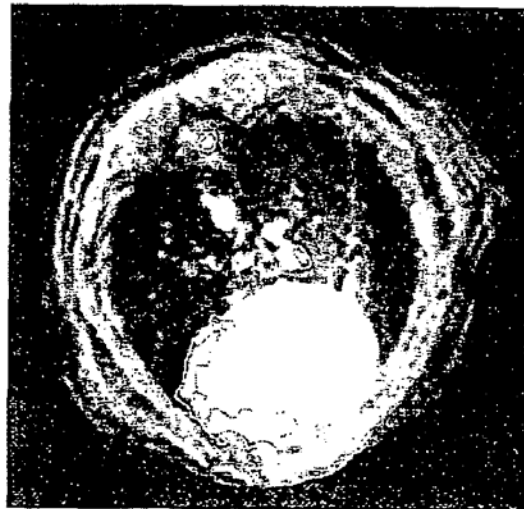
$^1\text{H}$



$^{19}\text{F}$



$^1\text{H} + ^{19}\text{F}$



**Fig. 8**

Lesión vascular – Arteria carótida

$^1\text{H}$



Lesión vascular  
→ Lumen disminuido

$^{19}\text{F}$

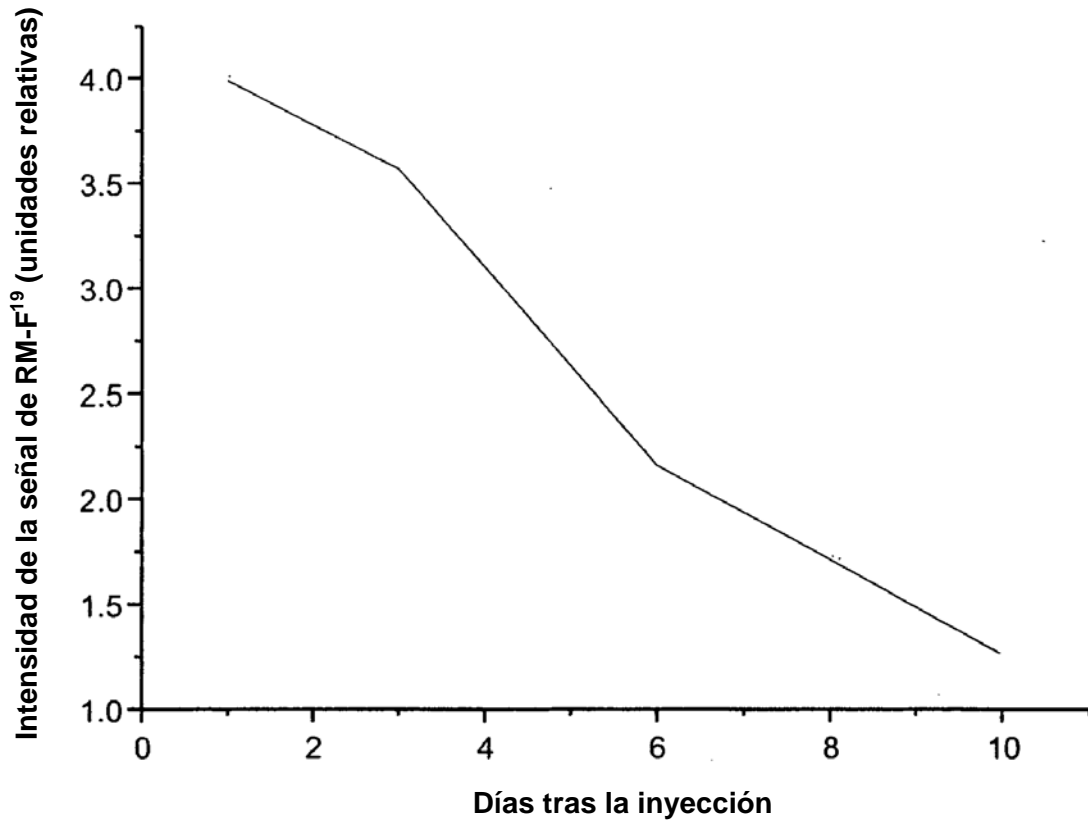


$^1\text{H} + ^{19}\text{F}$



Fig. 9

**Cinética de eliminación – Perfluorodecalina**  
**Descenso de la señal de F<sup>19</sup> en el bazo y en el hígado**



**Fig. 10**