

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 911**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/18** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2003 E 03741661 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 1519757**

54 Título: **Suspensión de barrido que comprende una partícula cuyo diámetro alcanza al menos 1 micrómetro**

30 Prioridad:

**02.07.2002 EP 02077626**

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

**01.03.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM UTRECHT  
(50.0%)**

**HEIDELBERGLAAN 100**

**3584 CX UTRECHT, NL y**

**UNIVERSITEIT UTRECHT HOLDING B.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NIJSEN, JOHANNES FRANCISCUS WILHELMUS;**

**VAN HET SCHIP, ALFRED DIRK y**

**ZONNENBERG, BERNARD ANTONI**

74 Agente/Representante:

**MOLINERO ZOFIO, Félix**

**ES 2 396 911 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

Suspensión de barrido que comprende una partícula cuyo diámetro alcanza al menos 1 micrómetro.

[0001] La invención entra dentro del campo de la medicina. Más específicamente, la invención entra dentro del campo de los diagnósticos y la radioterapia.

5 [0002] Contar con diagnósticos fiables y detallados es a menudo un requisito previo para el tratamiento eficaz de una enfermedad. Especialmente los trastornos que muestran patrones significativamente diferentes en cada paciente individual requieren diagnósticos precisos realizados con sumo cuidado. Tales trastornos comprenden, por ejemplo enfermedades relacionadas con tumores. Cuando se descubre que un paciente tiene un tumor, es importante contar con  
10 datos fiables del estado en el que se encuentra la enfermedad. Por ejemplo, se deberá establecerse el crecimiento y la posición del tumor, y se deberá determinar si hay metástasis en otras partes del cuerpo, etc. Además, contar con buena información en la elección de un medicamento que actúe sobre un tumor puede incrementar la eficacia del tratamiento.

15 [0003] Se conocen muchas técnicas de diagnóstico por imágenes, tal que la resonancia magnética (RM), la cual proporciona información del estado interno de un individuo. A menudo se usa un agente de contraste para poder obtener una imagen médica diagnóstica. Por ejemplo, se utilizan a menudo partículas de ferrita y complejos de gadolinio-DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético en agentes de contraste para el barrido de la IMAGEN DE RM. De esta forma se puede obtener un buen diagnóstico de los trastornos internos, como la presencia de (un) tumor (es).

20 [0004] Después del diagnóstico, el inicio de un tratamiento casi siempre conlleva la administración de una composición farmacéutica a un paciente. También casi siempre es importante controlar el estado de un paciente durante el tratamiento. Por ejemplo se puede monitorizar el curso de un tratamiento y la selección de un fármaco, así como los posibles efectos secundarios que pudieran indicar la necesidad de terminar o interrumpir temporalmente, un determinado tratamiento.

25 [0005] A veces, se prefiere un tratamiento local en únicamente una parte específica del cuerpo. Por ejemplo, a veces puede contrarrestarse el crecimiento de un tumor con radioterapia interna comprendiendo la administración de partículas radiactivas a un individuo. Si dichas partículas radiactivas se acumulan dentro y/o alrededor del tumor, entonces es posible el tratamiento local específico. Sin embargo, para evitar la gastritis inducida por la radiación y/o  
30 neumonitis por radiación, especialmente en el caso de los tumores de hígado, los pacientes con derivación significativa gastroduodenal y a los pulmones deberán ser excluidos de la terapia. Por lo tanto, la distribución exacta de las partículas radiactivas se determina en primer lugar mediante la administración de una dosis trazadora que comprende a dichas partículas radiactivas. Ello comporta una extra exposición a la radiactividad, tanto para el paciente como para el personal médico, el cual no es deseable. Además, algunos tipos de partículas radiactivas, tales como el itrio radioactivo, difícilmente se pueden detectar con una cámara gamma. En el caso de utilizar tales partículas itrio en la terapia, se administraran antes del tratamiento otras partículas radiactivas (por ejemplo: partículas de albúmina marcadas con tecnecio), que puedan ser detectados con una cámara gamma y que se espera seleccionen y se distribuyan  
35 aproximadamente de manera similar a dichas partículas de itrio las cuales fueron administradas antes del tratamiento. Por lo tanto una distribución de dichas otras partículas radiactivas será determinada Debido a que dicha distribución de dichas otras partículas radiactivas se considera aproximadamente similar a una distribución de itrio, se puede estimar aproximadamente si se producirá una derivación significativa de itrio gastroduodenal y / o los pulmones.

40 [0006] Por tanto, es muy complicado determinar cómo se deben utilizar dichas partículas, y como va a ser el patrón de distribución. Estos problemas no se pueden resolver con las actuales técnicas de diagnóstico por imágenes no radiactivas, ya que por ejemplo la distribución de los agentes de contraste en la resonancia magnética RM no es la misma que la distribución de los compuestos terapéuticos radioactivos.

45 [0007] Después de que el compuesto terapéutico radiactivo se ha vuelto no (o apenas) radiactivo, no se podrá continuar con el seguimiento de su distribución. Lo cual es una desventaja ya que sería deseable monitorizar cómo dicho compuesto es eliminado por el cuerpo. La información sobre la bio-distribución de dicho compuesto es indicativa del curso de una enfermedad y / o tratamiento, y sobre el estado de un paciente.

50 [0008] La invención utiliza una suspensión de barrido que comprende una partícula la cual es capaz de, al menos en parte perturbar un campo magnético, en donde dicha partícula comprende un diámetro de al menos 1  $\mu\text{m}$ . Dicha partícula puede ser detectada mediante un método de exploración no-radiactivo como la RM. Preferiblemente, dicha suspensión de barrido comprende una suspensión de barrido de RM. Más preferiblemente, dicha partícula comprende holmio.

55 [0009] Los métodos para generar una suspensión de barrido, tal como una suspensión de barrido para RM, son conocidos en la técnica y no requieren aquí de descripción adicional. Se puede obtener una imagen médica diagnóstica con una suspensión de barrido utilizada por la invención. Así, la invención utiliza una suspensión de barrido que comprende una partícula la cual es capaz, al menos en parte, de alterar un campo magnético para capturar una imagen médica, en la que dicha partícula comprende un diámetro de al menos 1  $\mu\text{m}$ . preferiblemente dicha imagen médica comprende una imagen médica de RM. En esta solicitud, el significado de la palabra suspensión debe entenderse por al menos incluir dispersiones.

[0010] Una suspensión de barrido utilizada por la invención es muy adecuada para detectar un tumor. Esta puede realizarse, por ejemplo determinando el comportamiento en el fluir de una partícula de la invención, con un uso de acuerdo a la invención. La presencia de un tumor a menudo comporta una zona de angiogénesis, ya que un tumor necesita normalmente mucho aporte de oxígeno y nutrientes para una tasa de metabolismo alta. Por lo tanto alrededor de dicho tumor se generan nuevos vasos sanguíneos. Así, una zona de angiogénesis puede ser indicativa de la presencia de un tumor. Se puede detectar dicho tumor sin la necesidad de utilizar material radioactivo. Alternativamente se pueden usar partículas de baja radiactividad. Después de haberse detectado un tumor, dicho tumor puede tratarse con una composición terapéutica que comprende el mismo tipo de partículas que dicha suspensión de barrido. En dicha composición terapéutica, sin embargo, dichas partículas se vuelven (más) radiactivas. A pesar de la diferencia de radiactividad, las partículas de dicha composición de diagnóstico y las partículas de dicha composición terapéutica son químicamente las mismas. Por lo tanto, la distribución de las partículas radiactivas de dicha composición terapéutica puede predecirse bien SI SE determina la distribución de las partículas de una suspensión de barrido de la invención. Preferentemente, los tamaños de las partículas serán lo suficientemente grandes como para evitar una distribución igualitaria a través de todo el cuerpo. En una realización, dicha composición terapéutica comprende una partícula de la invención que contiene al menos un compuesto terapéuticamente activo, por ejemplo capaz de tratar de un tumor.

[0011] La invención por lo tanto, proporciona partículas radiactivas paramagnéticas al menos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, capaces al menos en parte, de perturbar un campo magnético para usarlo en un método para el tratamiento de un tumor en un individuo, en el que la dosificación de dichas partículas paramagnéticas se deriva de una imagen medica obtenida con una suspensión de barrido que comprende partículas capaces al menos en parte de perturbar el campo magnético con un diámetro de al menos 1  $\mu\text{m}$ , y con la misma estructura química que dichas partículas paramagnéticas, basada en la distribución de dichas partículas con la misma estructura química dentro de dicho individuo, y en donde dichas partículas DE uso en el método para el tratamiento de dicho tumor son mas radiactivas que aquellas partículas para la obtención de dicha imagen de barrido. Preferiblemente, dicho tumor comprende una metástasis en el hígado. En una realización preferente, dicha suspensión de barrido comprende una suspensión de barrido de imágenes de RM.

[0012] En otra realización preferente, dicha partícula tiene un diámetro lo suficientemente grande como para permitir que dicha partícula se quede dentro de un tumor. Dicha partícula es muy adecuada para detectar un tumor. Más preferiblemente, dicha partícula es al menos en parte capaz de fluir a través de los vasos no tumorales. Esta partícula puede insertarse en un vaso tumoral con menos probabilidad de que lo haga en los vasos normales. Esto es posible debido a que los vasos tumorales en su mayoría son algo más pequeños e irregulares que los vasos normales. De esta forma, el tejido tumoral puede distinguirse bastante bien del tejido normal, ya que en el tejido tumoral habrá una mayor concentración de partículas de la invención. Dicha partícula de la invención tiene, preferiblemente, un diámetro aproximado de 1-10  $\mu\text{m}$ . más preferiblemente, dicha partícula tiene un diámetro aproximado de 2-8  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente tiene alrededor de 3-5  $\mu\text{m}$ .

[0013] Para distinguir el tejido tumoral de uno no tumoral, se prefiere administrar en primer lugar una suspensión de barrido para uso de acuerdo a las partículas de la invención, las cuales son capaces al menos en parte de perturbar un campo magnético, de pequeño diámetro, por ejemplo alrededor de 3  $\mu\text{m}$ . Después se puede determinar si dichas partículas se han insertado en el interior de los vasos tumorales. Si aun no se han insertado dentro de dichos vasos tumorales (el tamaño de los vasos tumorales pueden variar en cierta medida) se puede administrar una segunda dosis de suspensión de barrido que comprende partículas de la invención de diámetro algo mayor, por ejemplo de alrededor de 4  $\mu\text{m}$ . Si todavía estas partículas no logran insertarse en dichos vasos tumorales, se puede administrar una suspensión de barrido que comprende partículas de la invención de un diámetro aún mayor, etc. De esta forma se puede determinar el diámetro mínimo que permite a una partícula de la invención insertarse dentro de un determinado tumor siendo capaz todavía de fluir a través de los vasos no tumorales. Dicho diámetro mínimo puede variar entre los distintos tumores, y entre pacientes diferentes. Dicho diámetro mínimo suele ser de entre 3-5  $\mu\text{m}$ . De esta forma se puede detectar un tumor con una suspensión de barrido de la invención comprendiendo partículas de la invención que se introducen dentro de los vasos tumorales siendo capaces todavía de fluir a través de los vasos no tumorales.

[0014] Preferiblemente, dicha partícula tiene un diámetro aproximado de 3-5  $\mu\text{m}$ . Como ya se ha indicado brevemente, un método de la invención puede comprender administrar a un individuo, diferentes suspensiones de barrido, que contienen partículas de la invención de diferente tamaño. Preferiblemente, cada diferente suspensión de barrido se administra por separado, existiendo un intervalo de tiempo entre la administración de cada suspensión. Alternativamente, se pueden administrar simultáneamente diferentes suspensiones de barrido, o en poco tiempo después una de la otra.

[0015] En otra realización preferida, una partícula de uso de acuerdo a la invención tiene un diámetro aproximado de 15-200  $\mu\text{m}$ , más específicamente de 15-100  $\mu\text{m}$ , aún más específicamente 20-100  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 20 a 50 o 80-100  $\mu\text{m}$ . Una partícula de este tamaño es muy adecuada para fines radioterapéuticos. Dicha partícula tiene un diámetro lo suficientemente grande como para permitir que dicha partícula se aloje dentro de las arteriolas. Por lo tanto, dicha partícula es adecuada para embolizar un vaso sanguíneo, preferiblemente para embolizar una arteriola. A un tumor se le puede privar de sangre, y por lo tanto se le puede privar de oxígeno y de nutrientes, alojando en al menos un vaso sanguíneo cerca de dicho tumor una partícula de la invención. Esto es posible debido a que un tumor recibe mayor flujo sanguíneo en comparación con el que recibe un tejido normal. Por lo tanto en comparación con el tejido normal, se alojará en y alrededor de un tumor una mayor cantidad de partículas de la invención. Por ejemplo, los tumores en el hígado reciben LA sangre en su mayor parte de la arteria hepática mientras que el tejido normal del

5 hígado recibe LA sangre principalmente de la vena portal. Esto supone la existencia de una mayor cantidad de partículas de la invención en y alrededor del tumor después de la administración de dichas partículas en la arteria hepática, dichas partículas pueden por ejemplo administrarse a la arteria hepática por medio de un catéter es también particularmente apropiado para tratar un tumor presente en la garganta y/o en la cabeza de un individuo embolizando un vaso sanguíneo con una partícula utilizada por la invención .es posible en la embolización de tumores, por ejemplo del cáncer de hueso y tumores debidos a la esclerosis tuberosa usar partículas relativamente grandes, por ejemplo entre 50-200  $\mu\text{m}$  . En el último los tumores renales benignos son muy grandes y muy dolorosas y pueden provocar la ruptura de vasos sanguíneos y la muerte de un paciente. El uso de partículas de dicho tamaño de acuerdo a la embolización de los vasos sanguíneos de la invención ligada a dicho tumor puede suponer un retraso en el crecimiento del tumor evitando la exposición excesiva a la radiación para los pacientes y el personal.

10 [0016] Una suspensión que contiene una partícula que es capaz, al menos en parte de perturbar un campo magnético, en el que dicha partícula tiene un diámetro al menos de 1  $\mu\text{m}$ , puede usarse como tal, como una composición de diagnóstico. Alternativamente, dicha suspensión puede usarse para preparar una composición de diagnóstico. Preferiblemente, dicha suspensión es esencialmente no radiactiva. Otra alícuota de dicha suspensión se puede hacer (más) radiactiva. Dicha otra alícuota es muy útil en radioterapia. Así, dicha suspensión radiactiva para uso de acuerdo a la invención puede usarse entonces como una composición terapéutica. Además, una composición que contiene a dicha suspensión radiactiva para el uso de acuerdo a la invención puede ser utilizada como una composición terapéutica. En una realización, una composición terapéutica radiactiva de la invención contiene una partícula para el uso de acuerdo a la invención, la cual contiene al menos un compuesto terapéuticamente activo, por ejemplo, capaz de tratar un tumor. Dicha composición terapéutica es por ejemplo capaz de tratar un tumor simultáneamente por medio de radioterapia y con la acción terapéutica de dicho compuesto. Dicha composición terapéutica es capaz de tratar un tumor mediante una acción terapéutica de dicho compuesto. Por supuesto, se puede proporcionar una partícula utilizada por la invención en cualquier compuesto terapéutico.

15 [0017] Dicha composición de diagnóstico y dicha composición terapéutica son adecuadas para la preparación de un kit de partes.

20 [0018] La invención puede utilizar un kit de partes que comprende una composición de diagnóstico y una composición terapéutica, dicha composición de diagnóstico y dicha composición terapéutica que comprenden partículas de la invención esencialmente con la misma estructura química, dicha composición terapéutica es más radiactiva que dicha composición de diagnóstico. Preferiblemente, dicha composición de diagnóstico es esencialmente no radiactiva. En una realización, dichas partículas comprenden holmio. Dicha composición de diagnóstico puede utilizarse para determinar una distribución de dichas partículas dentro de un individuo. Esto puede, por ejemplo, determinarse mediante resonancia magnética. Por lo tanto, ya no es necesaria ninguna dosis de trazador radioactivo. Esto es bueno para el paciente y para el personal médico. No se precisan medidas especiales de precaución contra (demasiada) la exposición a la radiación radiactiva. Mas aun, al utilizar una dosis de trazador radioactivo, debe determinarse un patrón de distribución en un poco tiempo, antes de que la radiactividad haya decaído. Sin embargo, si una composición de diagnóstico para su uso de acuerdo a la invención es esencialmente no radiactiva, un patrón de distribución de dichas partículas no tiene que porque determinarse en un limitado espacio de tiempo. Ahora, se puede determinar dicha distribución durante todo el tiempo en el cual, dichas partículas están presentes dentro de un individuo. Por lo tanto, ahora hay más tiempo disponible para determinar un patrón de distribución.

25 [0019] Posteriormente, puede decidirse si dicho individuo es capaz de someterse a terapia radiactiva con dicha composición terapéutica. Esto dependerá, por ejemplo en función del grado de derivación de dichas partículas en los pulmones y en el tracto gastrointestinal. Además, la cantidad óptima de composición terapéutica radiactiva a administrar a dicho individuo se puede determinar, interpretando el patrón de distribución obtenido en dicha composición de diagnóstico. Puede determinarse cuántas partículas se acumulan en un tumor, si se distribuyen en el interior de dicho tumor, etc. Debido a que dichas (más radiactivos) partículas de dicha composición terapéutica son químicamente las mismas que dichas partículas de dicha composición de diagnóstico, en dicho individuo, la distribución de dicha composición terapéutica será la misma que la distribución de dicha composición de diagnóstico.

30 [0020] Una partícula radiactiva para uso de acuerdo a la invención puede generarse de forma directa usando un componente radiactivo, tal que holmio radiactivo. Preferiblemente, sin embargo, una partícula no radiactiva para uso de acuerdo a la invención primero se genera y después seguidamente se procede a irradiar dicha partícula. Esto evita el uso de altas dosis de componentes radiactivos así como tener necesariamente instalaciones especialmente equipadas (caras), etcétera. Por ejemplo, después de haberse obtenido una imagen medica con una composición de diagnóstico para uso de acuerdo a la invención, se puede estimar la dosis óptima de radioterapia para el uso de acuerdo a una partícula de la invención. Es posible proporcionar tal dosis de partículas no radiactivas para uso de acuerdo a la invención. Dichas partículas pueden ser irradiadas posteriormente. Los inventores estando presentes, utilizaron las instalaciones de neutrones de alto flujo en Petten, en Holanda. La irradiación (flujo de neutrones  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ ) se llevó a cabo durante al menos 0,5 horas, preferiblemente alrededor de 1 hora. Por supuesto, otras instalaciones y otros tiempos de irradiación puede también usarse, siempre que las partículas de uso de acuerdo a la invención mantengan esencialmente su estructura durante la irradiación. El término "mantengan esencialmente su estructura " significa aquí que dichas partículas mantienen su contenido, forma y / o densidad al menos en un 50%, más preferiblemente en un 75%, más preferiblemente en un 90%, más preferiblemente en un 95%. Preferiblemente, dicha partícula contiene una composición capaz de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación durante al menos 0,5 horas con un

flujo de neutrones de  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ . S-1. Más preferiblemente, dicha composición es capaz de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación durante aproximadamente 0.5-2 horas con un flujo de neutrones de  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ . S-1. Más preferiblemente, dicha composición es capaz de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación durante aproximadamente 1 hora con un flujo de neutrones de  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ . S-1.

5 [0021] Preferiblemente, dicha composición esencialmente no contiene agua, ya sea combinada y/o sin combinar, ya que la presencia de agua parece tener un efecto destructivo durante la irradiación.

[0022] Preferiblemente, dicha partícula es biodegradable, lo que permite su degradación en el cuerpo animal tras su utilización, por ejemplo para la imagen de RM y / o la (radio) terapia

10 [0023] Puede hacerse un seguimiento de la distribución de dicha composición terapéutica usando un método de diagnóstico por imágenes, tal que la RM.

[0024] En una realización, una partícula para su uso de acuerdo a la invención comprende una microesfera. Preferiblemente, dicha microesfera comprende holmio. En otra realización preferente, dicha partícula comprende poli (L)-ácido láctico. Como se muestra en la referencia [14], que se incorpora aquí por referencia, las microesferas de poli (L)-ácido láctico son capaces de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación durante aproximadamente 1 hora por lo menos con un flujo de neutrones de  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ . S-1

[0025] Una partícula para su uso de acuerdo a la invención que comprende holmio libera preferiblemente menos del 10%, más preferiblemente menos de 5%, más preferiblemente menos de 1% de holmio después y / o durante la irradiación, ya que los resultados sobre el holmio liberado en una imagen diagnóstica pueden no ser completamente indicativos de la distribución de dichas partículas para uso de acuerdo a la invención. Además, el holmio radiactivo puede dañar (partes de) los tejidos que dichas partículas no pueden alcanzar. En aún otra realización preferente, se proporciona una suspensión de barrido para uso de acuerdo a la invención, en donde dicha composición comprende holmio químicamente unido a un compuesto capaz de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación de 1 hora con un flujo de neutrones de  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ . S-1. La unión química de holmio es beneficiosa al menos al evitar en parte la liberación de holmio. Las cargas de holmio irradiado de las microesferas de poli-(L)-ácido láctico son capaces de retener > 99,3% de la actividad  $^{166}\text{Ho}$  después de su incubación durante 288 h, a  $37^\circ \text{C}$ , en solución PBS y de homogeneizado de hígado de cerdo [14]. El holmio está ligado químicamente a dichas microesferas [34]. Una partícula para su uso de acuerdo a la invención, una suspensión de barrido para el uso de acuerdo a la invención, y / o un kit de partes para el uso de acuerdo a la invención preferiblemente por lo tanto comprenden dichas microesferas.

[0026] En una realización biodegradable, las microesferas (PLLA-MS) de poli (L ácido -láctico) se fabricaron en un vaso de precipitado con cuatro deflectores, El complejo holmio acetilacetato (Ho-AcAc) (10 g) y PLLA (6 g) se añadieron a 186 g de cloroformo que se agitó continuamente. Se disolvió PVA (20 gramos) en 1000 g de agua a  $40^\circ \text{C}$ , se agitó continuamente y tras enfriarse se vertió en el vaso de precipitados de vidrio. Las soluciones y el vaso de precipitados se mantuvieron a  $25^\circ \text{C}$ . La solución de cloroformo se añadió a la solución de PVA y se agitó continuamente (500 rpm) hasta evaporarse completamente el cloroformo. Para eliminar los residuos de PVA y Ho-AcAc no incorporada, las microesferas formadas se lavaron secuencialmente con agua, 0,1 N HCl y agua. Las microesferas fueron clasificadas y recogidas de acuerdo al tamaño de los tamices de acero inoxidable de 20 y 50 micrómetros (tamiz 20 micrómetros, S / Steel, NEN 2560, Endecotts, Londres, tamiz 50 micrómetros, S / Steel, ASIM E 11-87; BV Metaal gaasweverij, Twente, Países Bajos) se roció con agua, y se secó con nitrógeno. La caracterización de microesferas irradiado y no irradiadas se llevó a cabo mediante un Microscopio electrónico de barrido o (SEM), el análisis del tamaño de las partículas por láser y gamma-espectrometría de  $^{166}\text{Ho}$ , después de la activación de neutrones de  $^{165}\text{Ho}$  incorporado en PLLA-MS. Para determinar el peso molecular PLLA, se disolvieron las microesferas en cloroformo y se analizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) utilizando una columna de cromatografía de penetración en gel (Shodex KD 800) de Show a Benco, Japón. Las muestras se irradiaron individualmente durante 1 día, con el fin de crear condiciones comparables del reactor lo más estrechamente posible. Se vio que para producir dosis terapéuticas de  $^{166}\text{Ho}$ -PLLA-MS eran necesarias condiciones de irradiación bien definidas, al tiempo que se mantenían la integridad y la idoneidad para la terapia.  $^{165}\text{Ho}$ -PLLA-MS no irradiado mostro una superficie lisa, de apariencia esférica. Después de irradiar en la instalación de PRS (flujo neutrónico  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) durante 1 h en frascos de polietileno, se observaron cambios menores en la superficie con SEM, dando lugar a pequeños fragmentos de PLLA. Esto provocó un mayor número de partículas, <20 micrómetros. Aunque se mantuvo la integridad estructural global en términos de forma y tamaño, las microesferas mostraron una tendencia mínima a la agregación, ellas pudieron sin embargo, ser fácilmente suspendidas en PBS siendo adecuadas para la terapia intra-arterial.

[0027] El presente inventor ha desarrollado microesferas poli (ácido L -láctico) de holmio cargado también denominadas en este documento " microesferas de holmio", que pueden ser detectadas por RM. Estas microesferas se pueden utilizar para generar una composición de diagnóstico esencialmente no radiactivo. Con esta composición de diagnóstico, se puede determinar el comportamiento en el flujo de una partícula de la invención, un sitio de angiogénesis, la presencia de uno o más tumores, y/o la distribución de dicha composición en el interior y alrededor de un tumor. Además, se puede estimar si se produce una derivación significativa al gastroduodeno y los pulmones. Tras conocerse la distribución de dicha composición en el interior de un paciente, otra muestra de microesferas poli (ácido L -láctico) de holmio cargado puede volverse radiactiva, por ejemplo por medio de la activación de neutrones. Estas microesferas de holmio radiactivo pueden ser usadas para generar una composición terapéutica. La distribución de dicha composición

5 terapéutica en el interior de dicho paciente será la misma que la distribución de dicha composición de diagnóstico no-(o escasamente) radiactiva, porque dichas microesferas son químicamente las mismas. Así, a partir de la información recibida de la RM sobre la distribución de la composición de diagnóstico se puede determinar la cantidad óptima de composición terapéutica. Alternativamente, la microesfera administrada que es esencialmente no radiactiva puede volverse radioactiva in vivo. Esto puede realizarse por ejemplo mediante la activación de neutrones. Sin embargo, es posible que la cantidad administrada de composición de diagnóstico no sea la cantidad óptima para el paciente en cuestión, ya que pacientes distintos pueden mostrar diferentes patrones de distribución. Por lo tanto, preferiblemente se administrara una cantidad óptima de una composición terapéutica radiactiva después de haberse determinado la distribución de dicha composición de diagnóstico no radioactivo. También es posible, en la intervención de RM, hacer un seguimiento de la administración y la dosificación de microesferas.

[0028] En términos de la invención, un individuo significa un animal, preferiblemente un ser humano.

15 [0029] Una partícula de uso de acuerdo a la invención quiere decir aquí una partícula paramagnética que es capaz al menos en parte de perturbar un campo magnético, en el que dicha partícula alcanza un diámetro al menos de 1  $\mu\text{m}$ . Dicha partícula es paramagnética, compuesta por ejemplo de holmio, gadolinio y/o disprosio. Una partícula de uso de acuerdo a la invención tiene una susceptibilidad diferente a un campo magnético al compararlo con el medio ambiente. Una partícula de uso de acuerdo a la invención, por ejemplo, comprende una molécula unida a un elemento capaz al menos en parte, de alterar un campo magnético. Dicha molécula puede formar una cueva en la que este presente dicho elemento. Por ejemplo, dicha partícula comprende una microesfera. Sin embargo, cualquier partícula que comprende dicho elemento cae dentro del alcance de una partícula de la invención. Una partícula que contiene sólo dicho elemento también cae dentro del alcance de una partícula de uso de acuerdo a la invención. Preferentemente, dicho elemento comprende holmio. Una suspensión de uso de acuerdo a la invención significa aquí una suspensión que comprende una partícula de uso según la invención.

25 [0030] Una composición o una partícula que es más radiactiva que otra composición o partícula significa aquí que es mayor la cantidad de radiactividad por mol. Esta cantidad de radiactividad se expresa normalmente en becquerel. Esencialmente no radiactivo significa aquí que la radiactividad es esencialmente la misma que los valores normales de fondo generalmente presentes.

30 [0031] En términos de la invención, químicamente la misma significa que la fórmula química es esencialmente la misma, o que una partícula comprende una forma esencialmente similar, mientras comprende esencialmente el mismo tipo de sub-partícula (s). Tal sub-partícula, por ejemplo, comprende una partícula de la invención. Sin embargo, los elementos o compuestos que son químicamente los mismos pueden comprender diferentes isótopos. Un cierto isótopo de un elemento se considera que tiene esencialmente las mismas propiedades químicas al compararlas con otro isótopo del mismo compuesto.

35 [0032] La expresión "una partícula con un diámetro de 1  $\mu\text{m}$ " significa aquí un lote de dichas partículas que comprende partículas con un valor medio aproximado de 1  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, si dicha carga comprende microesferas, el tamaño de cada microesfera individual puede variar aproximadamente de 0,5 a 2  $\mu\text{m}$ . Lo mismo se aplica a otros tamaños de diámetros descritos en esta solicitud.

[0033] "Tratamiento de un tumor" significa aquí que dicho tumor es contrarrestado. Esto puede resultar en una disminución del crecimiento de dicho tumor. En algunos casos, el crecimiento puede detenerse. Se puede matar dicho tumor, aunque este no es necesariamente el caso.

40 [0034] Preferiblemente, dicha partícula comprende holmio. Más preferiblemente, dicha partícula tiene un diámetro al menos de 1  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, la cantidad óptima de dicha composición terapéutica se determina a partir de la distribución de dicha partícula de dicha suspensión de barrido.

[0035] Las partículas paramagnéticas radioactivas de uso de acuerdo a la invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de un tumor de hígado, por ejemplo una metástasis de hígado.

45 [0036] Las metástasis de hígado ocurren con frecuencia durante la progresión de diversos tumores sólidos, especialmente los cánceres colorectales, y son la causa del 25-50% de todas las muertes de cáncer. La supervivencia media de los pacientes con metástasis de hígado oscila entre los 2-12 meses dependiendo del volumen de las metástasis y la histología del tumor original. La resección quirúrgica es actualmente la única alternativa que ofrece a los pacientes con metástasis de hígado una probabilidad sustancial de curación. Sin embargo, esta es una opción para sólo el 10-20% de los pacientes.

[0037] La radioterapia con haces externos para el tratamiento de tumores hepáticos está limitada por la tolerancia del parénquima hepático, que puede tolerar dosis de hasta sólo 30 Gy de irradiación para todo el hígado; esta modalidad de tratamiento es por lo tanto ineficaz. El tratamiento de tumores malignos del hígado mejora con partículas radiactivas paramagnéticas de uso en la invención.

55 [0038] Un modo particularmente útil de terapia es el uso de partículas radiactivas inyectadas intra-arterialmente para su uso de acuerdo a la invención, de un tamaño suficiente para alojarse en las terminaciones arteriolas. La base de dicha terapia se haya en que los tumores son generalmente ricos en vasculatura y en que las metástasis de hígado son casi

5 exclusivamente dependientes del suministro de sangre arterial. Esto contrasta con el hígado normal, que recibe la mayor parte de su flujo de la vena porta. Esta selectividad también se puede incrementar utilizando drogas vasoactivas que provocan vasoconstricción de las arteriolas del hígado normales, pero a las que son insensibles los vasos tumorales que carecen de músculo liso. Por supuesto, en otro tipo de tumores una partícula de la invención también puede alojarse en un vaso sanguíneo para su tratamiento.

10 [0039] La invención proporciona partículas radiactivas paramagnéticas para el uso de acuerdo a las reivindicaciones. Dicho medicamento es capaz, al menos en parte, de tratar un tumor, más preferiblemente una metástasis de hígado. Dicha partícula alcanza un diámetro al menos de 1  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente alrededor de 3-5  $\mu\text{m}$ , permitiendo a dicha partícula quedarse dentro de un vaso sanguíneo. Debido a que una partícula de la invención se utiliza para la obtención de una imagen médica diagnóstica, así como en la radioterapia, se proporciona un método o uso de la invención, preferiblemente siempre que dicha partícula comprende una composición capaz de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación al menos 0,5 horas, preferiblemente durante aproximadamente 1 hora, con un flujo de neutrones de  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Más preferiblemente, dicha partícula comprende una microesfera, lo más preferiblemente microesferas de un poli (ácido L-láctico). En aún otra realización preferente dicha composición comprende holmio químicamente unido a un compuesto capaz de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación de 1 hora con un flujo de neutrones  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Como se explicó anteriormente, la unión química mejora la estabilidad de dicha partícula y al menos en parte evita la liberación de holmio desde dicha partícula

20 [0040] En una realización, se prepara una cantidad de partículas antes de obtener dicha imagen de diagnóstico, en donde una primera parte de dicha cantidad de partículas se utiliza para la preparación de dicha suspensión de barrido y una segunda parte de dicha cantidad de partículas se utiliza para la preparación de dicha suspensión terapéutica. Utilizando la misma fuente de partículas de uso de acuerdo a la invención tanto dicha suspensión de barrido como dicha suspensión terapéutica son beneficiosas, especialmente cuando la dosis de dichas partículas en dicha suspensión terapéutica se determina a partir de la imagen de diagnóstico que se obtiene, ya que se evitan variables en los patrones de distribución de diferentes lotes de partículas.

25 [0041] En una realización, se proporcionan partículas radioactivas paramagnéticas de uso en la invención en donde dicha partícula comprende una microesfera, por ejemplo una microesfera de poli (ácido L-láctico).

30 [0042] Preferiblemente, dicha partícula comprende holmio. Por ejemplo, microesferas (Ho-PLLA-MS) de poli (ácido L-láctico) cargadas con holmio radiactivo de neutrones activados, que emiten rayos gamma, los cuales pueden ser utilizados para obtener imágenes con una cámara gamma y partículas beta para el tratamiento de un paciente. Los estudios en animales mostraron que estas microesferas pueden ser dirigidas al tumor y de fácil visualización con una cámara gamma. Dado que el holmio es paramagnético también pueden ser vistas por los métodos de diagnóstico no radiactivos tales como la RM. Por lo tanto, es posible visualizar la imagen de microesferas con carga de holmio no radiactivo. La visualización de imágenes de microesferas con carga de holmio no radiactivo antes del tratamiento con microesferas radioactivas supone una reducción de la radiación tanto para el paciente como para el personal médico. En ese caso, no hay que tomar medidas especiales contra (demasiada) la exposición a la radiación ionizante, como se ha explicado anteriormente. Además, ahora se dispone de más tiempo para determinar un patrón de distribución. Ahora dicha distribución se puede determinar durante todo el tiempo en que dichas partículas están presentes dentro de un individuo, mientras que una dosis de trazador radiactivo debe detectarse antes de que la radiactividad haya decaído.

[0043] Además, la distribución de las microesferas cargadas con holmio puede ser también seguida en el tiempo.

40 [0044] Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención. Ellos no limitan el alcance de la invención de ningún modo.

#### Ejemplos

45 [0045] El propósito de este estudio fue investigar si era posible medir la biodistribución de microesferas cargadas con holmio con imágenes RM. Las mediciones se realizaron en ficticios, en los hígados de conejo ex vivo y en conejos. Las imágenes de RM de los conejos se compararon con gammagrafías.

#### Métodos y materiales

50 [0046] Preparación de las Microesferas. Las microesferas cargadas con holmio se prepararon como se ha descrito anteriormente [14]. Brevemente, acetilacetato de holmio [20] se incorpora en el poli (ácido L-láctico) por evaporación del disolvente, resultando en microesferas de 20-50  $\mu\text{m}$  después de tamizado. La activación de los neutrones de las microesferas se realizó por irradiación durante 1 h. en la instalación de PRS del reactor nuclear de alto flujo en Petten, Países Bajos. Antes de proceder a la administración durante los experimentos vivo y ex vivo, las microesferas fueron sonicadas durante 10 min en un limpiador ultrasónico y suspendidas en Gelo-Fusine® (Vifor Medical SA, Suiza).

55 [0047] Ficticios. Para la preparación de gel de agar del polvo agar seco en matriz de (20 g; LIFE TECHNOLOGIES Gibco BRL, Paisley, Escocia) se mezcló con agua fría desionizada (1000 g) con manganeso (II) cloruro tetrahidratado (900 mg; Merck, Darm- Stadt, Alemania). El de manganeso-cloruro se utilizó para simular las propiedades del hígado en la resonancia magnética nuclear RMN. Las microesferas de poli (ácido L-láctico) cargados con holmio o itrio (Ho-PLLA-

MS o Y-PLLA MS-) se suspendieron en la solución de agar mientras se agitaban. Las microesferas suspendidas y la suspensión de agar se calentaron hasta los 100 ° C durante 10 minutos dando como resultado geles fluidos transparentes. Los geles se añaden en proporciones diferentes entre sí que resultó en un aumento de la concentración de Ho-PLLA-MS e Y-MS-PLLA. Los geles mixtos se sonicaron durante el enfriamiento.

5 [0048] Una vez enfriado hasta la temperatura ambiente, el gel es ópticamente transparente en el que se pueden observar las microesferas homogéneamente distribuidas. En una perfusión ficticia se examinó la región abdominal, en la detección de la derivación A-V a través del hígado. Se eligió un tubo con un diámetro interior de 12 mm como modelo a escala de la vena cava inferior humana, la cual tiene un diámetro de alrededor de 24 mm. El tubo se colocó en un recipiente de plexiglás, se llenó con agua de manganeso dopado como un fondo, imitando el tejido muscular. Se conectó al ficticio una bomba de flujo de presión de aire impulsado generando un flujo constante de 17 ml/s, consiguiéndose una velocidad de flujo de 15 cm / s, que es una velocidad esperada para una vena de una persona humana media. El fluido circulante y de fondo consistían de agua con cloruro de manganeso (19,2 mg / l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O). La solución de manganeso se utilizó para aproximarse a los tiempos de relajación de la sangre humana. Para detectar el paso de las microesferas cargadas con holmio, se utilizó una secuencia dinámica sensible al holmio- (como se describe en la sección de formación de imágenes RM). Después de la adquisición de un valor de línea de base, se hizo una corta inyección de microesferas vía la inyección de un catéter 5F, y a esto luego se le introdujo aproximadamente 4 ml del líquido que imita a la sangre. Las dosis inyectadas de microesferas variaron de 4,4 hasta 31 mg. El experimento de derivación también se realizó para las dosis más grandes y de inyección mas lenta (respectivamente 40, 48 y 53 mg).

20 [0049] *Los conejos*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la legislación Holandesa y Europeas "The Netherlands Experiments on Animals Act" (1977) y " The European Convention guidelines(86/609/EC). Se obtuvo la aprobación del comité de experimentos con animales de la Universidad. Los experimentos se realizaron con cuatro conejos hembras sin patógenos de Nueva Zelanda hsdIF consanguíneos Blancos de 3000-4000 g (Harlan, Horst, Países Bajos). Los conejos fueron alojados individualmente en jaulas de acero proporcionándoles diariamente 100 g aproximadamente de una "dieta completa" de pellets para conejos. Se proporcionó agua ad libitum (a placer). Los tres conejos que tenían tumores se sacrificaron después de tres o cuatro semanas. El conejo sin tumor fue sacrificado directamente después de la toma de imágenes de tomografía SPECT y de RM.

30 [0050] *Analgesia, sedación y eutanasia*. Se logró la analgesia y sedación durante las laparotomías con 0,5 ml de metadona (10mg/ml, Farmacia Veterinaria, Universidad de Utrecht, Holanda) y 0,5 ml de Ventranquil® (acepromacina, 10 mg / ml; Sanofi Sante Animale Benelux BV, Maassluis, Holanda). Posteriormente, los conejos fueron anestesiados con una inyección intravenosa de Hypnomidate® (2mg/ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania) y el N<sub>2</sub>O y el halotano (Albico BV, Maassluis, Holanda) como anestesia de inhalación. Los conejos se sacrificaron con 3 ml Euthesate (pentobarbital, 200mg/ml; bv Apharmo, Arnhem Holanda).

35 [0051] *Las células tumorales*. La línea celular VX2 [21] se obtuvo del Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial del Centro Médico Universitario de Utrecht, Holanda [22]. El tumor VX2 fue propagado mediante paso subcutáneo en la región de la cadera del conejo. Tras diseccionar el tumor se diseccionó en piezas pequeñas (2 mm de diámetro) que se seleccionaron para la implantación.

40 [0052] *Implantación del tumor*. Las partes Tumorales (dos o tres) se inyectaron en el lóbulo lateral izquierdo con un Abbocath® 18G (Abbocath Ltd., Irlanda). La herida de inyección se selló con pegamento para tejido (Histoacryl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania). Después de aproximadamente 12 días, se realizó la primera ecografía de investigación (HDI 3000 ATL, Entos™ CL10-5 transductor) para comprobar el crecimiento del tumor.

45 [0053] *La administración de las microesferas*. Cuando el tumor había alcanzado un diámetro de 20 mm, se realizó una segunda laparotomía con el fin de administrar las microesferas cargadas holmio. La arteria gastroduodenal se canuló con un 24G Abbocath® (Abbott Ltd., Irlanda). El retroflujo fue controlado con metileno azul al 0,1% en 5% de glucosa. Un sistema de administración de pre- evacuación similar al descrito por Herba et al. [23] fue conectado a la Abbocath®. Las microesferas suspendidas fueron administradas y se realizó una medición de la jeringa respecto de la actividad pre y post inyección, a fin de calcular la dosis inyectada. La arteria gastroduodenal se ligó o en la medida de lo posible sellada con pegamento para tejidos (Histoacryl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania). Las imágenes de RM fueron tomadas antes, tres días después y 17 días después de la administración de las microesferas radioactivas. Las imágenes SPECT se tomaron tres días después de la administración. Con el fin de verificar la presencia de microesferas el hígado se embebó en parafina y fue evaluado después de la tinción con hematoxilina-eosina.

55 [0054] *Hígado Ex-vivo*. El hígado provino de un conejo utilizado en un experimento con animales terminales. No se mataron más conejos para la realización de estos experimentos ex vivo. Se insertó una aguja en el ventrículo izquierdo del corazón y se cortó la aurícula derecha. Se lavó el conejo abundantemente con solución salina y heparina; 500 ml con 1 ml de heparina (Leo Pharma BV, Weesp, 5000 IE / 1 ml). Se extirpó el hígado y la arteria hepática fue canulada con una Abbocath® 24 G. Después se enjuaga el hígado con solución salina y heparina a través de la arteria hepática. Los hígados se almacenaron en una solución salina a 5 ° C durante un máximo de 30 horas. Las microesferas suspendidas se administraron a través de la arteria hepática durante los experimentos de formación dinámica de imágenes RM.

5 [0055] Resonancia magnética. Todas las investigaciones de RM se realizaron en un sistema de cuerpo entero operativo a 1.5T (Gyrosan ACS-NT 15, Philips Medical Systems). El protocolo de captación de imágenes incluyó la captación de imágenes SE ponderado en T1- captación de imágenes SE ponderado en T2. La medición de las propiedades de relajación de las microesferas de holmio y de itrio para diferentes concentraciones se realizó usando una medición multi-eco de spin eco (SE), combinada con una secuencia de inversión de recuperación. Las tasas de relajación longitudinal ( $R1 = 1/T1$ ) y relajación transversal ( $R2 = 1/T2$ ) fueron determinadas con el ajuste por mínimos cuadrados de las señales obtenidas. La velocidad de relajación transversal ( $R2^* = 1/T2^*$ ) por eco de gradiente (FFE) se determinó usando una secuencia multi-eco de gradientes capturando 25 ecos con un espaciamiento de eco de 0,91 ms.

10 [0056] Con el fin de detectar bolos de microesferas inyectados, pasando el modelado de vena cava, se realizó un FFE dinámica transversal ponderada en  $T2^*$  (resolución 2 mm, corte 30 mm, tiempo eco (TE) 15 ms, 0,352 s / dinámico). El aumento de la tasa de relajación transversal ( $\Delta R2^*$ ) debido al paso de microesferas se calculó por el cambio de señal observada, en relación con un valor adquirido de línea de base. El protocolo de formación de imágenes para ambos ex vivo e in vivo en las mediciones RM antes y después de la administración de las microesferas de holmio-cargado incluye SE imagen anatómica ponderado en T1 (TE 9,5 ms), imagen SE tumor sensible ponderado en T2 (TE 90 ms) e imagen FFE holmio sensible- ponderado en  $T2^*$  (TE 4,6, 9,2 ms). Para los experimentos ex vivo, una secuencia FFE dinámica ponderada en  $T2^*$  (resolución 2 mm, TE 9,2 ms, grosor de corte de 4 o 10 mm, 1 s por corte) también se usó para describir la administración de las microesferas.

20 [0057] *Gammagrafía*. Después de la administración de las microesferas radiactivas se realizó la captación de imágenes del conejo en su totalidad y en la región abdominal con una cámara de doble cabezal (Vertex-MCD, ADAC, Milpitas, CA). Se generó una imagen planar y SPECT. La captura SPECT implicó una rotación de cada detector de 180 ° con 32 paradas de 30 s en cada parada.

#### Resultados

25 [0058] *Microesferas*. Las microesferas preparadas por evaporación del disolvente después del tamizado resultaron en 3-5 gramos de partículas esféricas con un diámetro de 20-50  $\mu\text{m}$  (Fig. 1) y un contenido de holmio de 15-17% (w/w).

30 [0059] *Los modelos Phantoms ficticios* R1 y R2 como se midieron mediante el multi-eco de espín con experimento de inversión de recuperación fueron en gran parte independientes de la concentración de las microesferas de holmio, Figura 2. El ajuste por mínimos cuadrados sugiere  $\Delta R2 = 1,93 \times [\text{HoMS}] \text{ s}^{-1}$ , [HoMS] en mg/g. Esto es de esperar para perturbadores paramagnéticos estacionarios de este tamaño, debido a que las partículas perturbadoras son grandes en comparación con la longitud de propagación de los protones [24]. La Figura 3 muestra la dependencia  $R2^*$  en la concentración de HoMS. La relatividad transversal corresponde a la que se predijo para el régimen de desfasaje estático [25], en donde la susceptibilidad de los HoMS se calcula utilizando la ley de Curie desde el momento magnético de los iones inapareados Ho (10,4 magnetrones Bohr) y el contenido Ho de las microesferas. Al detectar el paso de las microesferas cargadas con holmio en la estimación de la derivación pulmonar en un modelo a escala de una vena cava media se mostró la capacidad de la RM dinámica para detectar todas las dosis inyectadas individuales (Tabla 1), lo cual se ilustra en la Figura 9 para una dosis de 6,7 mg y 48 mg. Esta última dosis se inyectó lentamente para simular la derivación de microesferas en el tiempo. Esta figura muestra que después de la adquisición de un valor de línea de base, una dosis de unos pocos mg es detectada fácilmente. Para todas las otras dosis inyectadas, los cambios que se midieron en las tasas de relajación fueron linealmente proporcionales a la cantidad de microesferas administrada.

40 [0060] *Implantación del tumor y la administración de microesferas*  $^{166}\text{Ho}$ . La implantación del tumor resultó en una tasa 100% "de absorción". Después de 16 días los tumores alcanzaron un diámetro aproximado de 23 mm. Los tumores estaban bien vascularizados como se ha visto con ultrasonido. El tamaño del tumor varió desde 10 hasta 17  $\text{cm}^3$  (12,7 – 4,1  $\text{cm}^3$ ) en volumen medido con una regla (Fig. 4).

45 [0061] Aproximadamente el 6% de la actividad se adhirió en el sistema de administración después de la administración. Se administró eficazmente la cantidad de 48-50 mg de microesferas de holmio radiactivo en el hígado con tumor correspondiente a 560-640 MBq de actividad.

[0062] Biodistribución en los tumores de hígado de los conejos. En las imágenes gammagráficas la radiactividad se vio especialmente en el tumor y en el hígado (Fig. 5). La actividad en el hígado estaba heterogéneamente distribuida. El aumento en la acumulación de microesferas fue visto en y alrededor del tumor.

50 [0063] La RM del conejo antes de la administración de microesferas cargadas con holmio resultó ser una herramienta de diagnóstico ideal en la visualización de los tumores VX2-(Fig. 6a). Los tumores aparecen como lesión homogénea, de forma redonda y bordes marcados. En las imágenes potenciadas en T1 los tumores son hipointensos y en T2 ponderado, las imágenes aparecen como lesiones hiperintensas respecto del tejido del hígado. Después de la administración de microesferas cargadas con holmio se observaron perturbaciones de campo en el tumor y en el hígado causado por la acumulación de las microesferas cargadas con holmio (Fig. 6b-c). La imagen ponderada en T2 es más sensible al holmio como se muestra por el aumento de las áreas negras en el hígado y especialmente alrededor del tumor. No se observó acumulación de holmio en el núcleo del tumor (Fig.6d).

5 [0064] Las imágenes de seguimiento de RM se obtuvieron 17 días después de la administración de las microesferas. No se vio progresión del tumor. No se vio redistribución sustancial de las microesferas cargadas con holmio. Las imágenes de RM de dos conejos mostraron el aumento 2-4 veces del lóbulo lateral derecho respecto del volumen original. Se observó daño en el lóbulo derecho e izquierdo y en el lóbulo lateral izquierdo del tejido del hígado. Estos lóbulos mostraron grandes áreas necróticas de color amarillo causadas por la acumulación de bilis. No se encontraron lesiones aparentes en el estómago y el duodeno. El tumor fue totalmente necrótico. Las imágenes de RM fueron muy útiles en la identificación de la acumulación de las microesferas cargadas de holmio y por lo tanto del tumor. La histología confirmó la acumulación en y alrededor del tumor necrótico.

10 [0065] *Hígado ex-vivo*. El procesamiento de la administración de las microesferas se realizó en tres hígados de conejos ex vivo. La acumulación en las arterias se observó mediante RM dinámica. En primer lugar se insertaron microesferas en los vasos más pequeños en el borde del hígado (Fig. 8c 1-4). A partir de entonces, la acumulación de las microesferas apareció en los vasos sanguíneos más grandes y en el centro del hígado (4-8 Fig. 8c). Durante estos experimentos se utilizaron de 0-100 mg de microesferas. Después de la imagen 5 de la figura 8, no se embolizó casi ningún vaso nuevo (en ese momento se administraron aproximadamente 40 mg de microesferas).

15 Discusión

20 [0066] En este estudio se investigó si el uso de la resonancia magnética es factible para obtener imágenes de microesferas de carga de holmio radiactivo y no radiactivo. Durante los experimentos in vivo y ex vivo se examinó la biodistribución en el hígado, tras la administración intra-arterial en la arteria hepática de conejos a los que se había implantado tumores VX2.

[0067] Los experimentos ficticios con microesferas poli (ácido L-láctico) con holmio cargado suspendidas en agar mostraron una susceptibilidad a HoMS la cual puede ser descrita por la ley de Curie, lo que indica la no existencia de interacciones magnéticas entre los Ho-iones. La susceptibilidad magnética para Ho es comparable a la de Dy[17].

25 [0068] La captación de imágenes de RM es muy útil para identificar la estructura anatómica de la región abdominal. El tumor se ve como una masa de tejido esférica en el lóbulo lateral izquierdo. Las mediciones del tamaño de los tumores con eco y con una regla son similares a las mediciones con imágenes de RM. Después de la administración de microesferas cargadas de holmio radioactivo se pudo apreciar su acumulación en y alrededor de todo el tumor. Esto se puede explicar por la angiogénesis tumoral de la metástasis del hígado. Los tumores de hígado normalmente tienen un borde hipervasculoso y obtienen su suministro de sangre casi exclusivamente de la arteria hepática [32]. Por tanto, las microesferas inyectadas en la arteria hepática se acumulan alrededor del tumor.

30 [0069] En ambas imágenes de gammagrafía y de RM se observó una distribución no homogénea de las microesferas de holmio en el hígado. Esta heterogénea distribución se describe también en los pacientes humanos y puede explicar la tolerancia del hígado para altas dosis de actividad [32, 33]. Grandes zonas del hígado recibirán menos actividad las que serían de esperar en una distribución uniforme de la actividad con el resultado de la supervivencia de la mayoría de los tejidos del hígado.

35 [0070] En ambas imágenes de gammagrafía y de RM se mostró la acumulación de holmio en el animal. Sin embargo las imágenes de RM combinan esta imagen con información detallada sobre la morfología del animal lo cual es una clara prueba de donde se acumulan en el cuerpo. Se ha demostrado que en un órgano objetivo del estudio del tumor, las imágenes cuantitativas de microesferas de holmio en RM proporcionan estudios dosimétricos fáciles y precisos.

40 [0071] Los experimentos del hígado ex vivo demostraron la viabilidad en tiempo real de las imágenes de RM durante la administración. Se observa claramente que en un punto bien definido ningún vaso recibe más las microesferas y que primero se rellenan con esferas los vasos más pequeños. Esto muestra como el tejido vascular es limitado en cuanto a su capacidad de acumulación de esferas y que la administración de microesferas extra sólo dará lugar a que se llenen los vasos más grandes. Por lo general, estos vasos más grandes son los vasos no tumorales y por lo tanto no participan del tratamiento de los tumores después de la acumulación de las esferas. La posibilidad en tiempo real para controlar y cambiar la posición de la administración, el flujo y la cantidad de microesferas sobre la base de las imágenes RM dará lugar a una optimización de las propiedades terapéuticas de las microesferas cargadas de holmio radiactivo. La personalización de un tratamiento para cada paciente individual mejora el tratamiento lo cual supone una disminución del daño en el hígado y el aumento del tumor en proporción al hígado. Un tumor en proporción al hígado se debe entender como la relación entre la actividad de y/o el número de partículas en el tumor con respecto a la actividad de y / o el número de partículas en el hígado. Una proporción más alta es por lo tanto más eficaz.

45 [0072] Es deseable hacer el seguimiento en un paciente de cara a la investigación y explicación clínica de los efectos observados. Se podrán obtener imágenes de las microesferas de holmio después del tratamiento, siempre que estén acumuladas en el cuerpo. La información acerca de la redistribución y reacción del tejido en tales partículas se podrá observar con imágenes RM. Los experimentos con animales llevados a cabo en conejos muestran que la redistribución no es vista durante los 17 primeros días.

50 [0073] En conclusión, este estudio ha demostrado que las imágenes de las microesferas cargadas de holmio PLLA que puede utilizarse en la terapia con radionúclidos interna, pueden ser capturadas in-vivo. La posibilidad de capturar

imágenes de esferas cargadas con holmio no radiactivo y radiactivo con RM abre el camino para la exacta administración y seguimiento de un tratamiento.

Tabla 1. Comparación de la detección de Ho-PLLA-MS con SPECT y RM		
	SPECT	IRM
Captura de imágenes de microesferas terapéuticas	+	+
Cuantificación de las microesferas terapéuticas	+	+
Dosis de traza radiactiva para estimular la derivación pulmonar	+	+
Dosis de traza no radiactiva para estimular la derivación pulmonar	-	+
Referencia anatómica directa	-	+
Alta resolución	-	+
Contraste de tejido blando (tumores)	-	+
Captura de imágenes largo plazo después del tratamiento	-	+
Administración altamente selectiva	-	+
Posibilidad de interferir durante la administración	-	+

5 Breve descripción de los dibujos

[0074]

La Figura 1a-b. a) Micrografía por barrido electrónico de microesferas PLLA cargadas con holmio. b) Distribución del peso por volumen de microesferas tamizadas. Las microesferas utilizadas en los experimentos tenían un diámetro medio de 30  $\mu\text{m}$  y el 96% del volumen de las partículas tenían un diámetro entre 20 y 40  $\mu\text{m}$ .

10

La Figura 2a-b. a) R1 y b) R2 versus la concentración de HoMS. La línea continua es un ajuste por mínimos cuadrados para los puntos de datos.

15

La Figura 3. R2\* versus la concentración de HoMS. La línea continua representa el resultado teórico en un régimen del desfase estático (Eq. 11 en la ref. 25) como se calcula a partir del contenido de holmio de las esferas.

20

La Figura 4a-b. a) representación del tumor en el lóbulo lateral izquierdo del hígado. b) Visión general del hígado del conejo. El tumor en el lóbulo lateral izquierdo del hígado (I) se implanta 10 mm desde el borde del lóbulo (punto blanco). Este lóbulo del hígado que está puesto en el estómago puede ser fácilmente alcanzado para la implantación. El lóbulo izquierdo medial (II) y el lóbulo medial derecho (III) están parcialmente fusionados entre sí y se encuentran en el estómago. La vesícula biliar está posicionada en la parte posterior del lóbulo medio derecho. El lóbulo lateral derecho (IV) se encuentra, por el lado estómago del cerca de la columna vertebral que también se ve en la figura 6.

25

La Figura 5a-d. Muestra las imágenes de RM y gammagrafías de uno de los conejos portador del tumor. a) imagen SE ponderada en T1 después de la administración de las microesferas. Las perturbaciones de campo causadas por la acumulación de holmio aparecen como áreas negras

30

b) imagen FFE ponderada en T2 (TE = 4,6 y 9,2 msec) después de la administración de las microesferas. Se ve claramente que la imagen ponderada en T2 es más sensible al holmio como lo demuestra el aumento de las áreas negras. El aumento en la acumulación de holmio y por tanto las microesferas, se indica con flechas pequeñas. La flecha grande indica las microesferas en y alrededor del tumor.

35

c) Representación esquemática de la imagen de RM "a" que muestra los órganos y tumores en el conejo.  
d) Imagen de gammagrafía de cuerpo entero de los conejos 3 días después de la inyección de microesferas radioactivas (48 mg, 560 MBq) en la arteria hepática. La pequeña imagen gammagráfica en la esquina superior derecha muestra los contornos del conejo obtenidos mediante el uso de una "fuente inundación". El contorno del conejo se obtuvo utilizando la "fuente inundación". El aumento en la acumulación de radiactividad y por tanto de microesferas cargadas de holmio se indica con flechas pequeñas. Las flecha mas grande indica la actividad en y alrededor del tumor.

5 La Figura 6a-d. Imágenes de resonancia magnética del plano transversal del conejo. b) Representación esquemática que muestra los órganos que se ven en las imágenes. El color y la posición de los órganos se corresponden con los dibujos pequeños en cada imagen de RM. a) imagen SE representativa ponderada en T1 antes de la administración de la carga de microesferas de holmio. c) imagen SE ponderada en T1 después de la administración de las microesferas. Las perturbaciones de campo causadas por acumulaciones de holmio se ven como áreas negras indicadas con flechas pequeñas. En y alrededor del tumor hay un aumento en la acumulación de holmio lo que está indicado con la flecha grade. d) imagen FFE ponderada en T2 (TE = 4,6 y 9,2 ms) después de la administración de las microesferas.

10 La Figura 7a-c. Imágenes de resonancia magnética del hígado del conejo portador del tumor 4 semanas después del tratamiento. a) imagen SE ponderada en T1. b) imagen FFE ponderada en T2 con perturbaciones de campo causadas por acumulaciones de holmio. La flecha blanca indica el lado del tumor. c) hígado ex vivo con tumor (flecha negra). El lóbulo lateral derecho se incrementa, mientras que los otros lóbulos han crecido hacia cada uno de ellos.

15 La Figura 8a-c. Imágenes de resonancia magnética dinámicas (c) de la administración de microesferas cargadas de holmio en un hígado ex-vivo (sin tumor) de un conejo (a-b). La administración fue principalmente selectiva para los lóbulos medios. Las imágenes APE ponderadas en T2 \* muestran el flujo de las microesferas en el hígado normal. Imágenes 8c 1-3 (Dyn-T2 \* FFE, 4 mm de grosor, tiempo de resolución = 5s/corte, TE = 9,2) y las imágenes 4-8 8c (Dyn-FFE T2 \*, 10 mm de grosor, tiempo de resolución = 1s/corte, TE = 9,2).

20 La Figura 9. La detección de microesferas cargadas de holmio al pasar un modelo a escala de una vena cava humana. Las líneas discontinuas denotan los valores de línea de base antes de la inyección de los bolos. Con las dosis pequeña (5,5 mg), se dio una inyección rápida en el punto A, mientras que la dosis grande se inyectó desde los puntos B a C. El punto D es un chorro rápido del catéter de inyección con el fluido circulante. Las áreas entre las líneas de base y las curvas son proporcionales a las dosis inyectadas.

25 u.a.: unidades arbitrarias.

Referencias

[0075]

30 (14) Nijssen JFW, BA Zonnenberg, JR Woittiez, Rook DW, Swildens IA-van Woudenberg, Rijk van PP, van het Schip AD. microesferas pol ácido láctico Holmium-166 aplicable para la terapia intraarterial hepática con radionúclidos de malignidad: efectos de la preparación y técnicas de activación de neutrones. Eur J Nucl Med 1999; 26 (7) :699-704.

(17) Fossheim S, Johansson C, Fahlvik AK, Grace D, Klaveness J. lantánidos basados en agentes de contraste de susceptibilidad: evaluación de las propiedades magnéticas. Magn Reson Med 1996; 35 (2) :201-206.

35 (20) Kooijman H, F Nijssen, Spek AL, van het Schip F. Diaquatris (pentano-2 ,4-dionato-0, 0 ') holmio (III) monohidratado y diaquatris (pentano-2 ,4-dionato-0, 0 ') holmio (III) 4-hidroxipentano-2-ona dihidrato de solvato. Acta Crystallogr C 2000; 56 (Pt 2) :156-158.

(21) Kidd JG, Rous P. Un carcinoma de conejo trasplantable originario de un papiloma inducido por el virus y que contiene el virus en forma enmascarada o alterada. J. Exp. Med. 71 [469], 813-837. 1940.

40 (22) RJ van Es, oh Franssen, HF Dullens, MR Bernsen, F Bosman, Hennink NOSOTROS, Slootweg PJ. El carcinoma VX2 en la aurícula de conejo como modelo experimental para la embolización intra-arterial de la cabeza y cuello de células escamosas carcinoma con microesferas de dextrano. Lab Anim 1999; 33 (2) :175-184.

(23) Herba MJ, Illescas FF, Thirlwell MP, Boos GJ, Rosenthal L, M Atri, Bret μM . Tumores malignos hepáticos: Mejora del tratamiento con intraarterial Y-90. Radiología 1988; 169 (2) :311-314.

45 (24) Weisskoff RM, Zuo CS, Boxerman JL, Rosen BR. Variación susceptibilidad microscópica y relajación transversal: teoría y experimento. Magn Reson Med 1994; 31 (6) :601-610.

(25) Yablonskiy DA, Haacke EM. Teoría del comportamiento de la señal de RMN en los tejidos no homogéneos magnéticamente: régimen desfase estático. Magn Reson Med 1994; 32 (6) :749-763

(32) Fox RA, PF Klemp, G Egan, LL Mina, Burton MA, BN Gray. Distribución de la dosis después terapia de radiación interna selectiva. Int J Radiat Oncol Biol. Phys. 1991; 21 (2) :463-467.

50 (33) ED Yorke, Jackson A, Fox RA, Wessels BW, BN Gray. ¿Pueden los modelos actuales explicar la ausencia de complicaciones hepáticas en Y-90 terapia con microesfera? Clin Cancer Res 1999; 5 (10 Suppl): 3024s 3030s-

(34) Nijsen JFW, Van Steenberghe MJ, Kooijman H, H Talsma, Kroon-- LMJ Batenburg, Van de Weert M, Van Rijk PP, De Witte A, Van het Schip anuncio, Hennink. Caracterización de microesferas poli (ácido L-láctico) cargadas con acetilacetato de holmio. Biomateriales 22 (2001): 3073-3081

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Las partículas radioactivas paramagnética con un diámetro de al menos 1  $\mu\text{m}$ . capaz, al menos, en parte, de alterar u campo magnético para uso en un método para el tratamiento de un tumor en un individuo, en el que la dosificación de dichas paramagnético partículas se deriva de una exploración de imagen obtenida con una suspensión de barrido que comprende partículas capaces al menos en parte de perturbar, un campo magnético, con un diámetro de al menos 1  $\mu\text{m}$  , y con la misma estructura química que dichas partículas paramagnéticas, basado en la distribución de dichas partículas con la misma estructura química dentro de dicha partícula individual, y en donde dichas partículas para su uso en el método para el tratamiento de dicho tumor son más radiactiva que dichas partículas utilizadas para la obtención de dicha imagen medica.
- 10 2. Partículas paramagnéticas para uso de acuerdo a la reivindicación 1, en el que dicho tumor comprende una metástasis de hígado.
- 15 3. Partículas paramagnéticas para uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dichas partículas comprenden holmio.
- 20 4. Partículas paramagnéticas para uso de acuerdo a la reivindicación 3, en el que dichas partículas comprenden una composición capaz de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación de 1 hora con un flujo de neutrones de  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .
- 25 5. Partículas paramagnéticas para uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dichas partículas comprenden una microesfera.
- 30 6. Partículas paramagnéticas para uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dichas partículas comprenden una microesfera poli (ácido L-láctico).
7. Partículas paramagnéticas para uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho medicamento comprende holmio químicamente unido a un compuesto capaz de mantener esencialmente su estructura durante la irradiación de 1 hora con un flujo de neutrones de  $5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

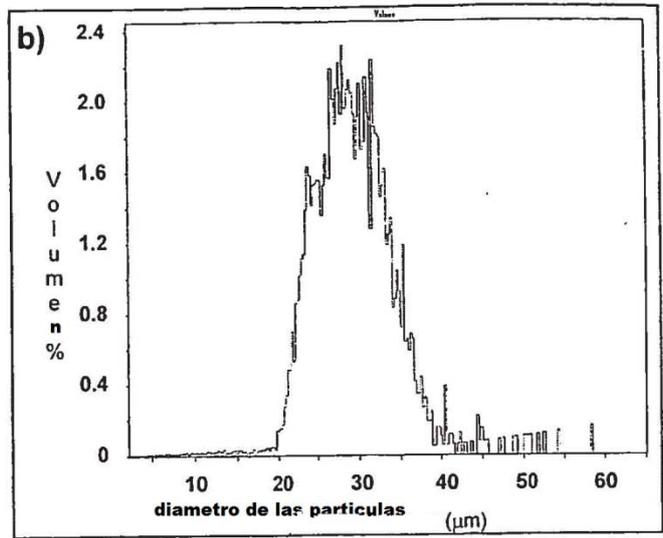
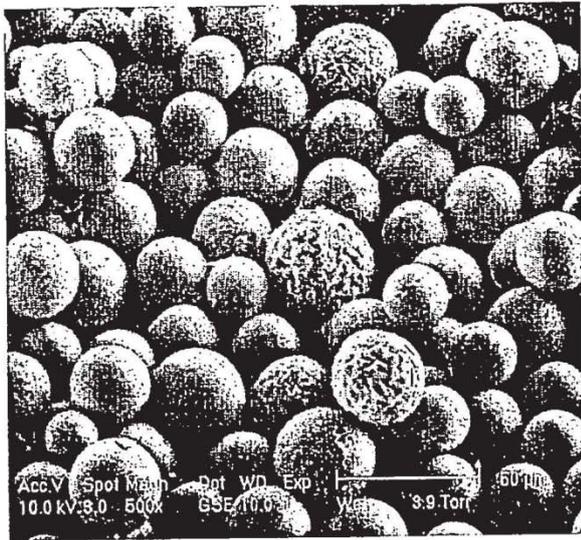
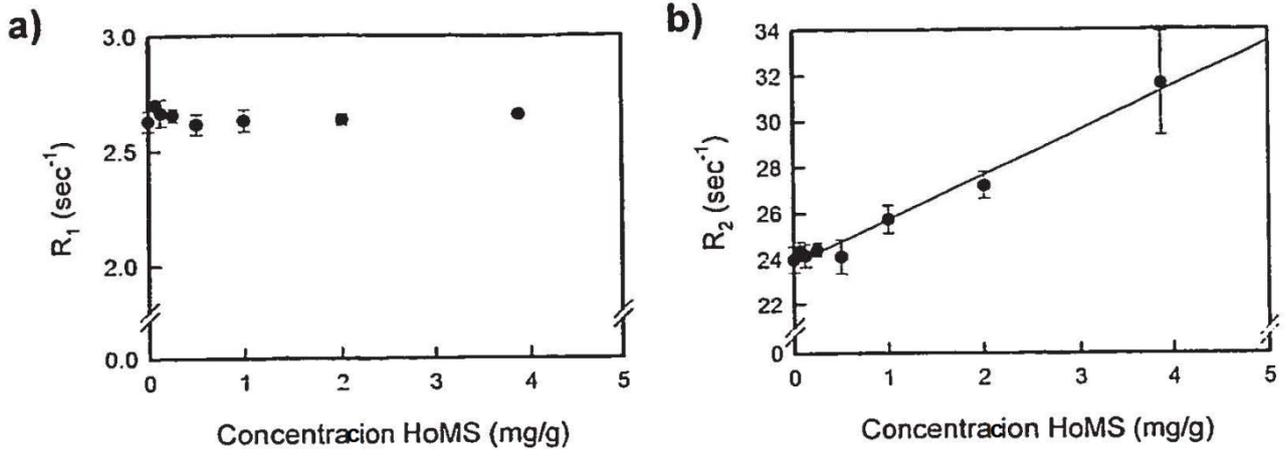


Figura 1a-b.



**Figura 2a-b.**

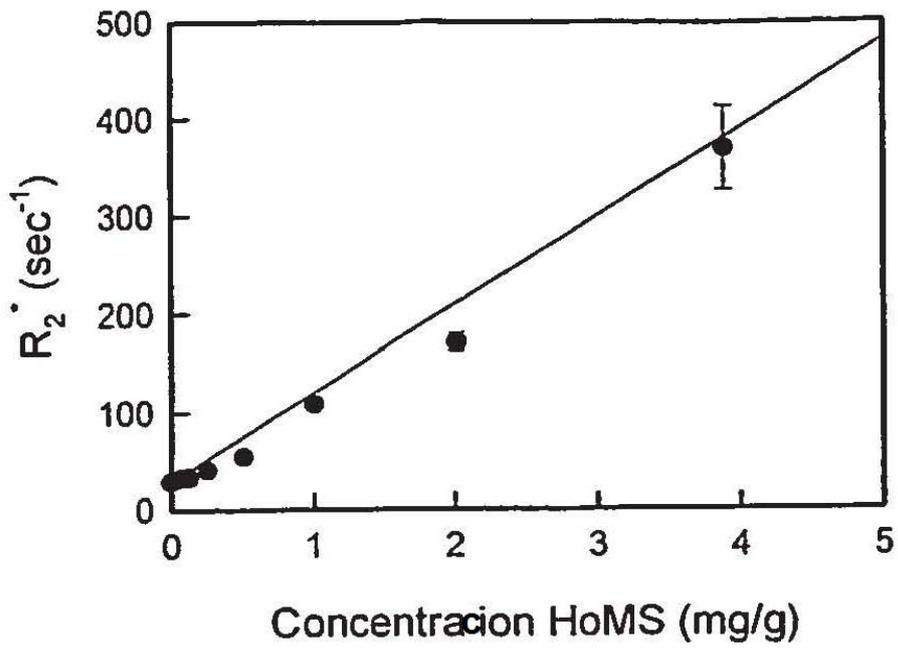
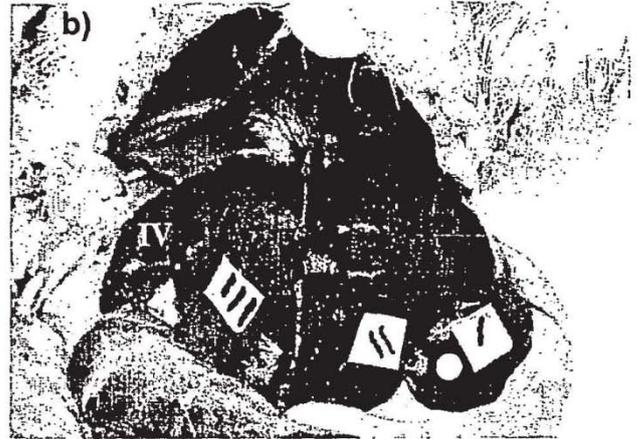
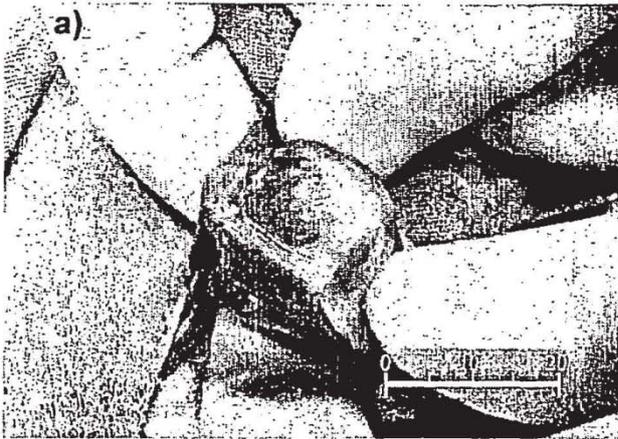
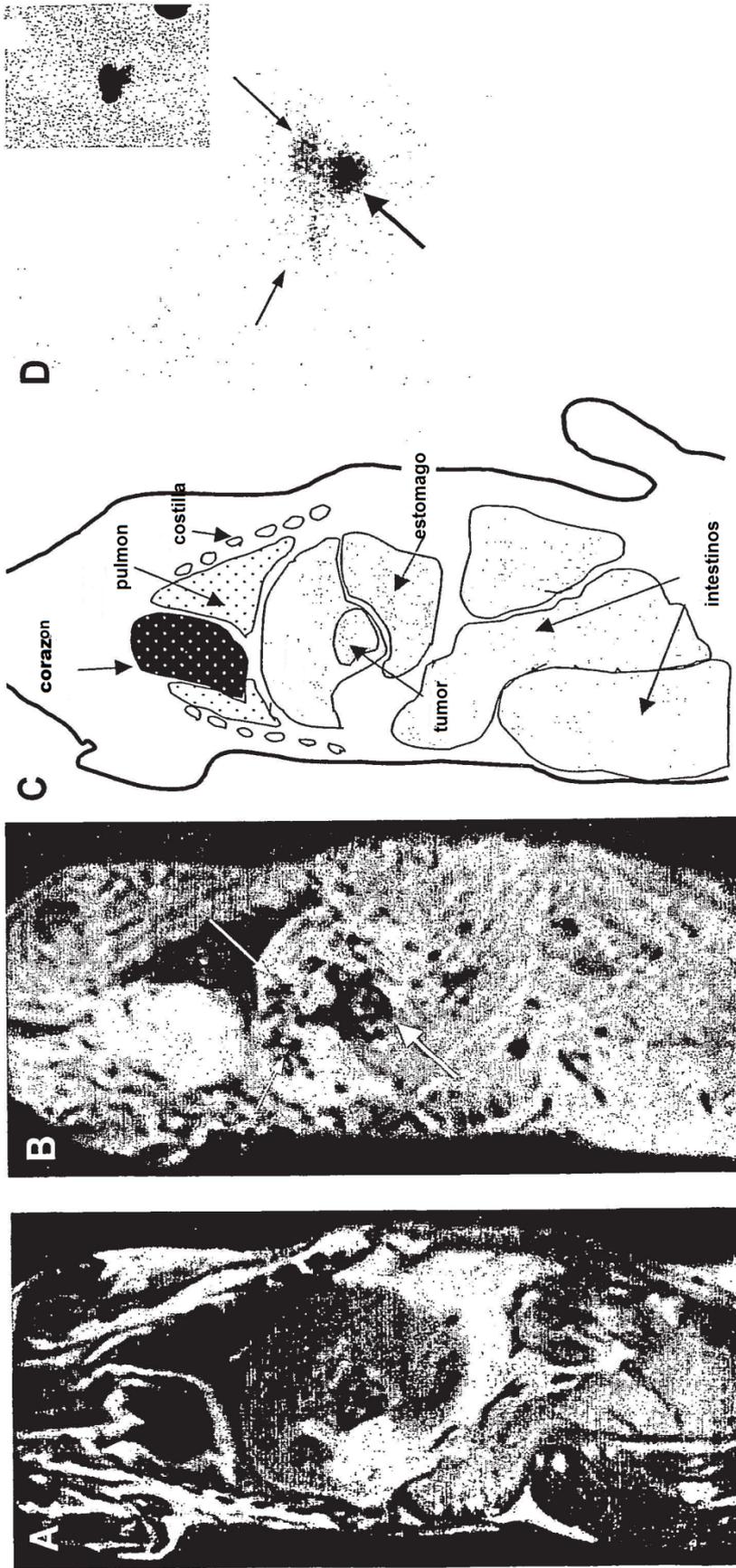


Figura 3.



**Fig.4a-b.**



**Figura 5**

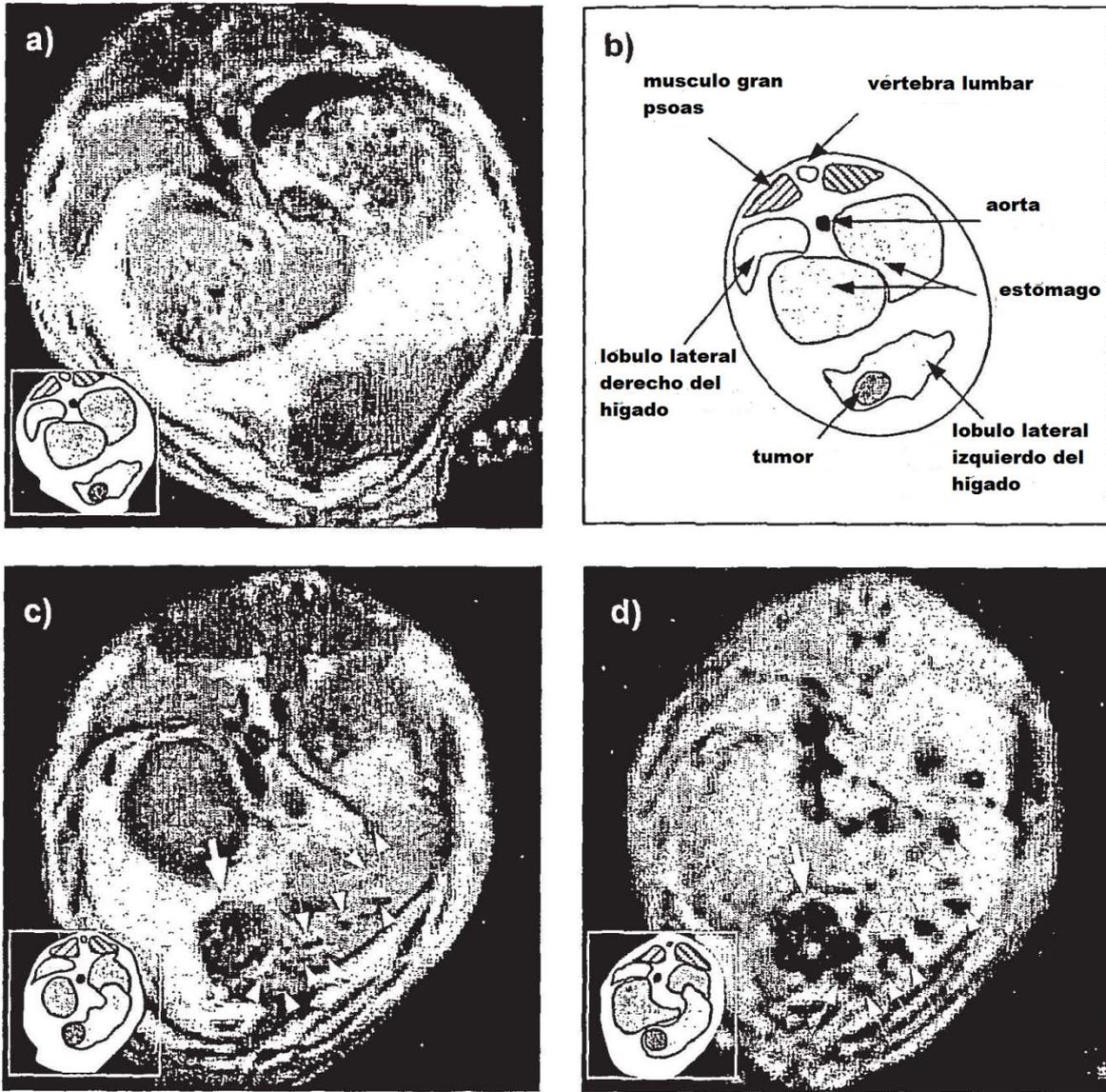
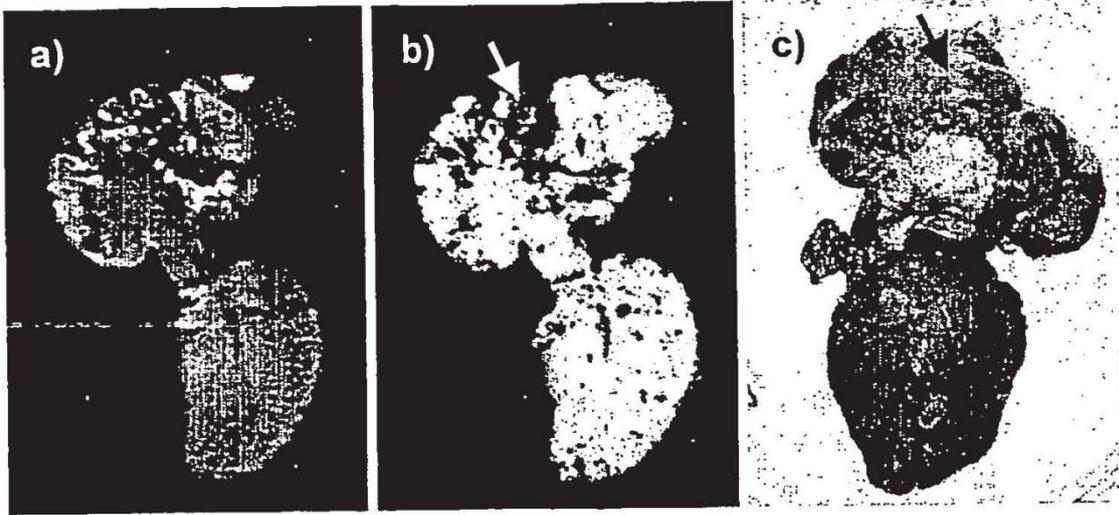


Figura 6a-d.



**Figure 7a-c.**

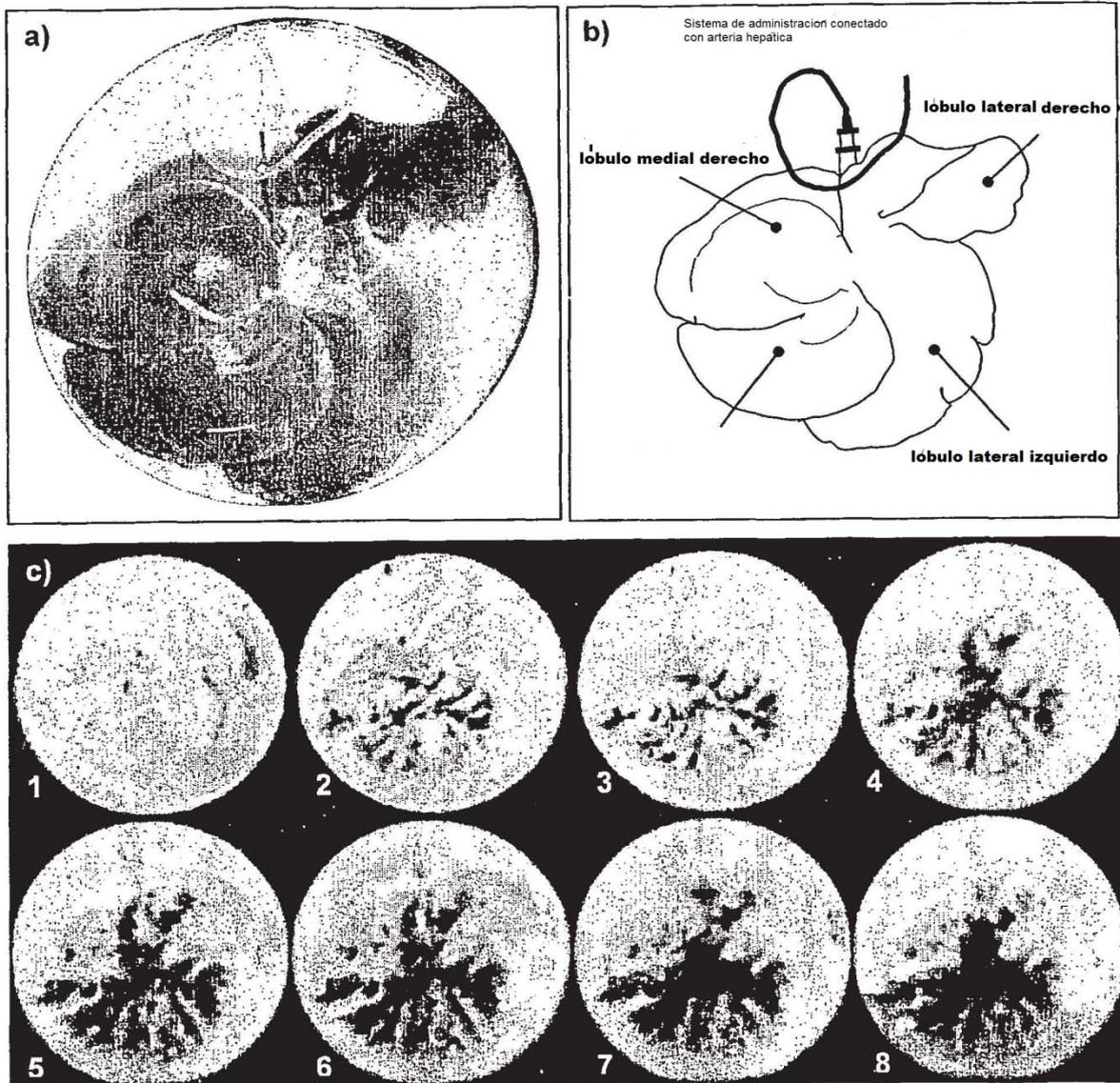


Figura 8a-c.

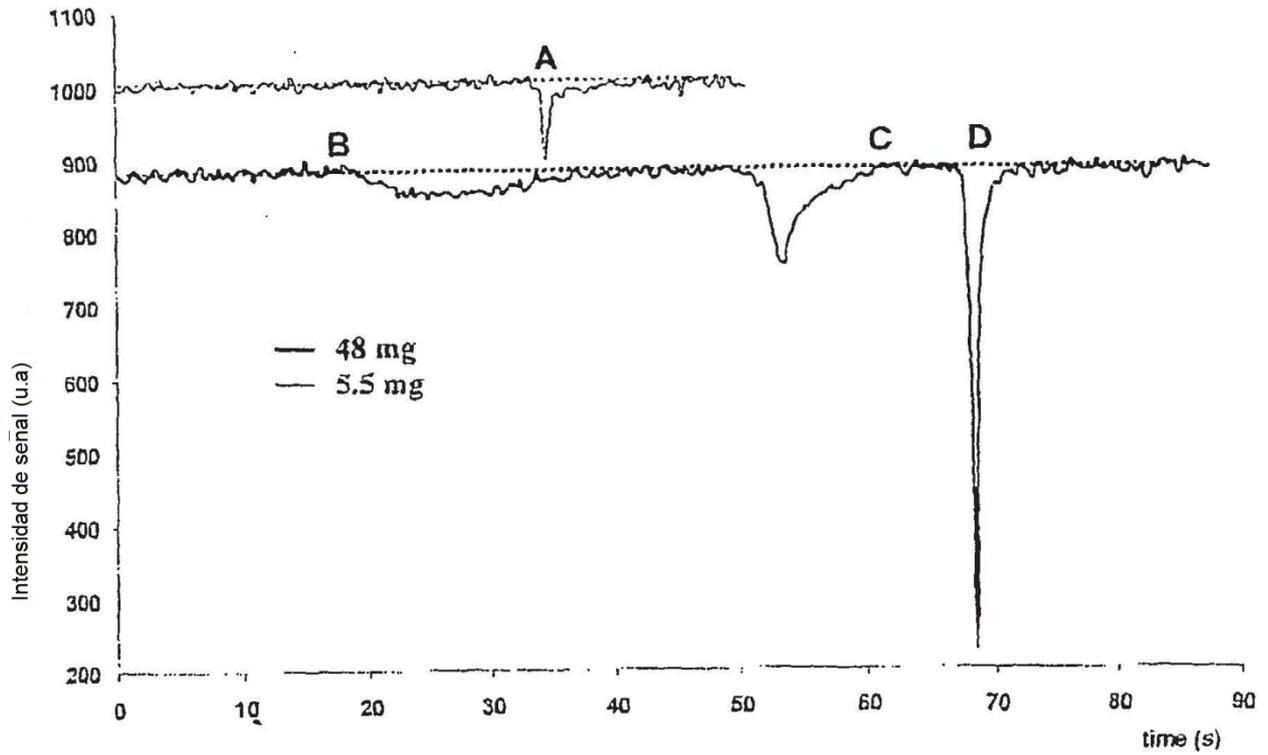


Figura 9