

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 299**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2010 E 10771120 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2493511**

54 Título: **Composición de diagnóstico que comprende cationes de plasma que tiene un perfil superior de seguridad**

30 Prioridad:

**29.10.2009 EP 09174413**

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

**18.12.2013**

73 Titular/es:

**GE HEALTHCARE AS (100.0%)  
Nycoveien 1-2 P.O. Box 4220 Nydalen  
0401 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**WISTRAND, LARS-GÖRAN;  
THANING, MIKKEL y  
NEWTON, BEN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 435 299 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

Composición de diagnóstico que comprende cationes de plasma que tiene un perfil superior de seguridad.

La presente invención se refiere a una nueva composición de diagnóstico de rayos X que exhibe un superior perfil de seguridad cardiaca. La composición comprende un dímero yodado no iónico en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención se refiere también a métodos para generar imágenes usando tal composición de diagnóstico.

Toda la generación de imágenes de diagnóstico está basada en la consecución de diferentes niveles de señal de diferentes estructuras dentro del cuerpo. De este modo en la generación de imágenes por rayos X, por ejemplo, para que una estructura corporal dada sea visible en la imagen, la atenuación de los rayos X por esa estructura debe diferir de la de los tejidos circundantes. La diferencia de señal entre la estructura corporal y sus alrededores se denomina frecuentemente contraste y se ha dedicado mucho esfuerzo a los medios para mejorar el contraste en la generación de imágenes de diagnóstico dado que cuanto mayor sea el contraste entre una estructura corporal y sus alrededores mayor será la calidad de las imágenes y mayor será su valor para el médico que realiza el diagnóstico. Además, cuanto mayor sea el contraste más pequeñas serán las estructuras corporales que se pueden visualizar en los procedimientos de generación de imágenes, es decir, el contraste incrementado puede conducir a resolución espacial aumentada. La calidad de las imágenes de diagnóstico depende mucho del nivel de ruido inherente en el procedimiento de generación de imágenes, y se puede ver de este modo que la relación del nivel de contraste al nivel de ruido representa un factor de calidad de diagnóstico efectivo para las imágenes de diagnóstico. Conseguir la mejora de tal factor de calidad de diagnóstico ha sido durante mucho tiempo y sigue siendo una meta importante.

En técnicas tales como rayos X, un enfoque para mejorar el factor de calidad de diagnóstico ha sido introducir materiales que mejoran el contraste formulados como medio de contraste dentro de la región del cuerpo de la que se están generando imágenes. De este modo, para rayos X, los primeros ejemplos de agentes de contraste eran sales de bario inorgánicas insolubles que mejoraban la atenuación de los rayos X en las zonas del cuerpo en las que se distribuían. Durante los últimos 50 años el campo de los agentes de contraste de rayos X ha estado dominado por compuestos que contienen yodo soluble. Los medios de contraste (CM) comercialmente disponibles que contienen agentes de contraste yodados se clasifican usualmente como monómeros iónicos tales como diatrizoato (comercializado, por ejemplo, con el nombre comercial Gastrografin™), dímeros iónicos tales como ioxagato (comercializado, por ejemplo, con el nombre comercial Hexabrix™), monómeros no iónicos tales como iohexol (comercializado, por ejemplo, con el nombre comercial Omnipaque™), iopamidol (comercializado, por ejemplo, con el nombre comercial Isovue™), iomeprol (comercializado, por ejemplo, con el nombre comercial Iomeron™) y el dímero no iónico iodixanol (comercializado con el nombre comercial Visipaque™). La seguridad clínica de los medios de contraste de rayos X yodados se ha mejorado continuamente durante las décadas recientes por medio del desarrollo de nuevos agentes; de monómeros iónicos (Isopaque™) a monómeros no iónicos (por ejemplo, Omnipaque™) y dímeros no iónicos (por ejemplo, Visipaque™). Sin embargo, incluso los enormemente refinados medios de contraste de rayos X actualmente en el mercado exhiben un bajo grado de efectos secundarios clínicamente indeseables, tales como nefropatía inducida por el contraste (CIN), sucesos cardíacos adversos, y reacciones adversas retrasadas (DARs). Consecuentemente, hay una necesidad clínica de un nuevo y más seguro medio de contraste de rayos X, especialmente con respecto a las investigaciones de diagnóstico que implican pacientes en los que hay un riesgo de estos efectos secundarios.

La utilidad de los medios de contraste está gobernada en gran medida por su toxicidad, por su eficacia de diagnóstico, por los efectos adversos que puede tener en el sujeto al que se administra el medio de contraste, y por la facilidad de producción, almacenamiento y administración. A la toxicidad y efectos biológicos adversos de un medio de contraste contribuyen los componentes del medio de formulación, es decir, de la composición de diagnóstico, por ejemplo, el disolvente o el vehículo así como el agente de contraste mismo y sus componentes tales como iones para los agentes de contraste iónico y también por sus metabolitos.

El número de procedimientos de arteriografía coronaria continúa aumentando de acuerdo con las capacidades de expansión de las intervenciones coronarias, que incluyen la angioplastia coronaria transluminal percutánea, implantación de stents, y la administración intracoronaria de compuestos terapéuticos. Se realizan alrededor de 70 millones de procedimientos, una mayoría de ellos relacionados con el corazón, en el mundo anualmente. Los efectos secundarios severos causados por los medios de contraste radiográfico yodados son raros, pero pueden ocurrir en pacientes de alto riesgo y durante la intervención coronaria percutánea.

En la arteriografía coronaria la sangre en las arterias coronarias idealmente debía ser completamente reemplazada por un bolo de medio de contraste radiográfico yodado para maximizar la atenuación de las radiografías y por ello optimizar la generación de imágenes de diagnóstico. Cuando el medio de contraste reemplaza a la sangre, las moléculas del medio de contraste provocan efectos quimiotóxicos y osmóticos en los vasos coronarios y también alteraciones en las concentraciones de electrolitos, viscosidad y tensión de oxígeno. Estas alteraciones pueden influir en la fuerza contráctil y el ritmo cardíaco y provocar fibrilación ventricular (VF). La inyección selectiva de medios de contraste en las arterias coronarias induce efectos fisiológicos y hemodinámicos regionales. Las arritmias ventriculares serias, así como la cardiodepresión, son complicaciones conocidas de la arteriografía coronaria que pueden estar relacionadas con los medios de contraste.

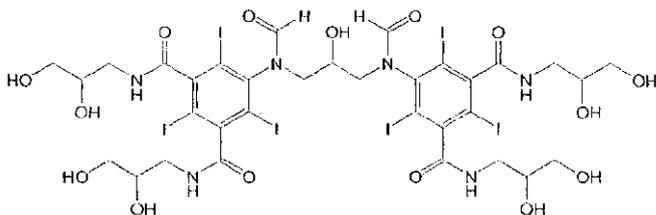
Los documentos WO91/13636 y WO90/11094, ambos de Nycomed AS (ahora GE Healthcare AS), se refieren a medios de contraste de rayos X y a sus formulaciones que incluyen diferentes sales. También hay numerosos estudios sobre las ventajas de formulaciones de agentes de contraste de rayos X con la inclusión de sales, principalmente NaCl, en la bibliografía. Se han realizado estudios en corazones aislados de ratas (Jynge et al., Investigative Radiology 1993, 28, 20-25) y conejos (Bååth et al, Investigative Radiology 1993, 28, 223-227), en perros (Pedersen et al., Acad. Radiol. 1994, 1, 136-144) y en cerdos. Es de particular relevancia el estudio de Chai et al. (Acad. Radiol. 2004, 11, 583-593) en el que se muestra que una formulación de iodixanol que contiene NaCl 19 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,3 mM exhibe una menor frecuencia de fibrilación ventricular que el iodixanol solo.

- 5
- 10 Jacobsen et al., Investigative Radiology 1993; 28,917-924 muestra que las inyecciones rápidamente repetidas de medios de contraste en perros dan como resultado efectos aditivos en inotropía y potencial de acción monofásico mientras que la disolución de Ringer no tenía ningún efecto. Esto se investigó para entender como la angiografía en la práctica clínica, en la que las inyecciones repetidas no son infrecuentes para llenar todo el árbol coronario, puede inducir cambios de parámetros cardíacos y conducir a complicaciones.

- 15 La actual formulación comercializada de iodixanol, 320 mg/ml contiene iones sodio 19 mM e iones calcio 0,3 mM (Visipaque™). Se ha mostrado experimentalmente que esta formulación exhibe un perfil de seguridad cardíaca superior comparado con iodixanol sin sales añadidas, principalmente por medio de estudios en vivo en un modelo cardíaco de cerdo, pero también por medio de estudios en corazones aislados de animales. En estudios similares se ha mostrado que el isohexol también muestra una tolerabilidad cardíaca incrementada cuando se formula con sales añadidas, principalmente NaCl.

- 20 El documento WO 2009/008734 de GE Healthcare AS describe una nueva clase de compuestos y su uso como agentes de contraste de rayos X. Los compuestos son dímeros que contienen dos grupos fenilo yodado unidos. El puente que une los dos grupos fenilo yodado es una cadena alqueno de C<sub>3</sub> a C<sub>8</sub> opcionalmente substituido con uno a seis -OH o grupos OCH<sub>3</sub>. Una gama de compuestos están incluidos en la formula general (I) de la solicitud y se sugieren muchos compuestos específicos.

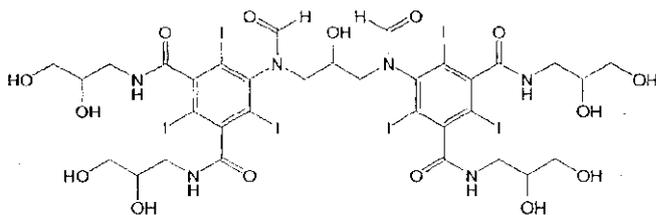
- 25 El solicitante ha encontrado que el Compuesto I, que es un agente de contraste de rayos X dímero específico, que está dentro de la fórmula I del documento WO2009/008734, tiene propiedades favorables:



Compuesto I: 5-[formil-3-[formil-3,5-bis(2,3-dihidroxipropilcarbamoil)-2,4,6-triyodofenil]amino]-2-hidroxipropil]amino]-N,N'-bis(2,3-dihidroxipropil)-2,4,6-triyodobenceno-1,3-dicarboxamida.

- 30 El solicitante ha identificado ahora sorprendentemente una nueva composición de diagnóstico de rayos X que exhibe un superior perfil de seguridad cardíaca comparado con Visipaque™, como se muestra en similares estudios in vivo como se indica anteriormente.

De este modo, en un primer aspecto la invención proporciona una composición de diagnóstico que comprende un Compuesto I



**Compuesto I**

- 35 un vehículo farmacéuticamente aceptable; y disueltos en ella un compuesto de sodio y un compuesto de calcio que proporcionan una concentración de iones sodio 40-50 mM y una concentración de ion calcio 0,1-0,7 mM.

Las propiedades fisicoquímicas del Compuesto I se encuentran a continuación. Información adicional acerca de los métodos usados, además de la biodistribución e información de la toxicidad aguda, se proporciona en el Ejemplo 1.

Unión a proteína: la unión del Compuesto I a seroalbúmina humana (HSA) se determinó usando un método de diálisis de equilibrio. Se determinó que la unión del Compuesto I a seroalbúmina humana era muy baja,  $3,1 \pm 1,3\%$ , confirmando la interacción insignificante de la sustancia con proteínas endógenas.

Coefficiente de reparto: la hidrofiliía del Compuesto I, como se determina por medio del reparto entre octanol y agua, mostró que el Compuesto I es muy hidrófilo con un logP de -4,28.

Viscosidad: la viscosidad del Compuesto I se determinó a 20°C y 37°C a tres concentraciones diferentes. Los resultados se muestran en la Fig. 4. La viscosidad a 320 mg/ml y 20°C es de alrededor de 24 mPas.

Osmolalidad: la osmolalidad del Compuesto I se determinó a cuatro concentraciones diferentes, 204, 254, 310 y 324 mg/ml. La osmolalidad del Compuesto I a 320 mg/ml es 136 mOsm/kg.

Ha sido identificada una nueva composición de diagnóstico de rayos X que exhibe un superior perfil de seguridad cardíaca comparada con Visipaque™. Además de la seguridad del compuesto mismo, es decir, el compuesto que proporciona el contraste, son cruciales los componentes adicionales de la composición de diagnóstico.

El estudio de Chai et al. muestra que una formulación de iodixanol que contiene NaCl 19 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,3 mM exhibe una menor frecuencia de fibrilación ventricular (VF) que el iodixanol solo. Este estudio se llevó a cabo en cerdos en los que el medio se inyectó directamente en la arteria coronaria izquierda (LCA) que se había ocluido previamente. No se observó la aparición de fibrilación ventricular en la inyección de Visipaque™. Como parte del ensayo de seguridad del Compuesto I, y de la identificación de una formulación para este, se ensayaron formulaciones de Compuesto I y se compararon con Visipaque™. Dado que en el estudio publicado previamente (anteriormente) se llevó a cabo la inyección intracoronaria de 20 ml de iodixanol durante un tiempo de inyección de 40 s y no ocurrieron casos de VF, se incrementó el volumen de inyección hasta 25 ml durante un periodo de 62,5 s para incrementar los casos de VF para propósitos de comparación. Además, el ensayo y disoluciones de referencia se inyectaron selectivamente en la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) para incrementar adicionalmente la sensibilidad del modelo. Con este alto volumen, incluso el Visipaque exhibía una frecuencia significativa de fibrilación ventricular, 100% (Figura 3). Los experimentos se describen en el Ejemplo 2.

Para nuestra sorpresa, el nuevo Compuesto I del agente de contraste de rayos X, cuando se formula en una composición de diagnóstico con tanto como NaCl 40-50 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,1-0,7 mM no mostró casos de fibrilación ventricular (Véase figura 3 y Tabla 3 para detalles).

Cuando se comparan los resultados de los dos estudios diferentes, se observó un incremento de la frecuencia de fibrilación ventricular de 0% a 100% con Visipaque. Sin embargo, incluso a la alta dosis, el Compuesto I del agente de contraste de rayos X dímero no exhibía fibrilación ventricular. La principal diferencia es que el Compuesto I se formuló con NaCl 45 mM en este estudio, que es significativamente más alta que la del Visipaque (19 mM). Aunque no se vio ningún efecto significativo de fibrilación ventricular (VF) con concentración de iones calcio entre 0,1 y 0,7 mM, hubo una reducción significativa de la presión arterial sistólica (SAP) y de la presión sistólica ventricular izquierda (LVP) cuando estaba presente menos calcio (Tabla 2). Estos datos indican que el principal factor que influye en la frecuencia de fibrilación ventricular es la concentración de cloruro de sodio, mientras que el calcio tiene un efecto significativo en la presión arterial sistólica y en la presión sistólica ventricular izquierda (LVSP). Ciertamente, un estudio en cerdos normales mostró que aunque la inyección en LAD de una composición de Compuesto I que contenía NaCl 45 mM sin CaCl<sub>2</sub> añadido dio como resultado una reducción de la LVSP de 45 a 70 segundos después de la inyección (media de -5,7 mmHg normalizada con Lactato de Ringer), la inyección de una composición de Compuesto I que contiene NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM mantuvo la LVSP de una manera similar al Visipaque (-0,3 y +0,1 mmHg normalizada con Lactato Ringer respectivamente) (Ejemplo 2b). Además, la inyección de Iopamidol a la misma velocidad y volumen indujo VF en cada ocasión (un total de 9 inyecciones en 3 cerdos) entre aproximadamente de 27 a 50 segundos después del inicio de la inyección (esto limitó cualquier análisis de la respuesta de la LVSP). Estos resultados indican adicionalmente que la presencia de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM en la composición de Compuesto I es beneficiosa y limita cualquier efecto negativo en la LVSP de una manera similar al Visipaque. Además, los electrolitos añadidos presentes en la composición de diagnóstico del Compuesto I y Visipaque pueden rebajar la propensión a inducir VF comparado con Iopamidol que no tiene electrolitos añadidos. Las cantidades y relaciones de los electrolitos estudiados se proporcionan en la tabla 4 del Ejemplo 2b.

En un estudio de inyecciones más rápidas (40 ml, a 5 ml/s) la presión sistólica ventricular izquierda se mantuvo y era similar a la observada después de la administración de lactato de Ringer y Visipaque cuando se inyectó Compuesto I en una composición con NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM selectivamente en la LAD de cerdos normales. En contraste la inyección de Iopamidol, que no contiene electrolitos añadidos, indujo una significativa reducción de la LVSP (Ejemplo 2c).

Además, el Iopamidol indujo un sustancial incremento de dP/dt (69%) mientras que el Compuesto I era similar al lactato de Ringer y Visipaque en este aspecto (un modesto incremento de hasta 30%). Se considera que la presencia y relación de los electrolitos de sodio (Na) y calcio (Ca) en las formulaciones del Compuesto I y Visipaque

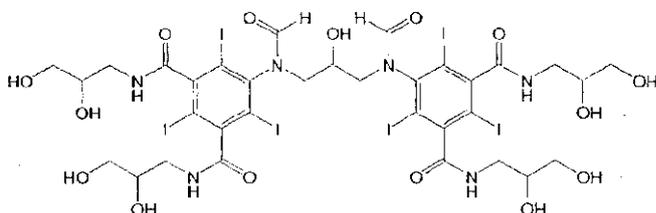
estudiadas, que están más cerca de la composición equilibrada de Na/Ca de lactato de Ringer y del fluido intersticial, contribuyeron a un mantenimiento superior de la función cardíaca comparado con aquella después de la inyección de Iopamidol, que no contiene electrolitos añadidos. Las cantidades y relaciones de los electrolitos se proporcionan en la tabla 5 del Ejemplo 2b.

- 5 En una realización adicional de la invención la composición de la invención comprende un compuesto de sodio que proporciona una concentración de iones sodio 42-47 mM, e incluso más preferentemente una concentración de iones sodio 44-46 mM, y lo más preferentemente una concentración de iones sodio 45 mM.

- En otra realización más de la invención la composición de la invención comprende un compuesto de calcio que proporciona una concentración de iones calcio 0,3-0,6 mM, e incluso más preferentemente una concentración de iones calcio 0,4-0,5 mM y lo más preferentemente una concentración de iones calcio 0,5 mM.
- 10

En este aspecto, la relación entre la concentración de iones sodio y la concentración de iones calcio debe estar entre 57 y 500, tal como entre 63 y 117, más preferentemente entre 70 y 156, más preferentemente entre 85 y 115 y lo más preferentemente entre 88 y 95.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición de diagnóstico que comprende un Compuesto I



**Compuesto I**

- 15 un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- y disuelto en ella un compuesto de sodio y un compuesto de calcio, en la que la relación entre la concentración de iones sodio y la concentración de iones calcio está entre 40 y 45, y es preferentemente 42. Esto es para reflejar las concentraciones de electrolitos de una composición de lactato de Ringer.

- 20 El compuesto de sodio y el compuesto de calcio de la composición se pueden proporcionar en forma de sales, es decir, los compuestos incluyen contraiones fisiológicamente tolerables, por ejemplo, seleccionados del grupo de cloruro, sulfato, fosfato e hidrogenocarbonato. Preferentemente, el compuesto de sodio es cloruro de sodio y el compuesto de calcio es cloruro de calcio.

El vehículo farmacéuticamente aceptable es una disolución acuosa, preferentemente agua pura.

- 25 El sodio es esencial para la despolarización miocárdica, que depende de una corriente hacia el interior de  $\text{Na}^+$ . Creemos que añadiendo iones sodio 40-50 mM, y preferentemente NaCl 45 mM, al Compuesto I lo acerca más a la concentración intersticial de  $\text{Na}^+$  normal que el iodixanol + 19 mM de  $\text{Na}^+$ /l. Por ello, el Compuesto I puede ser más fisiológico y más capaz de mantener la acción potencial de los canales rápidos del sodio, contrarrestando de este modo la acción potencial de "respuesta lenta" provocada por demasiado poco o nada sodio.

- 30 Las investigaciones previas han mostrado que añadir pequeñas cantidades de sodio (10-30 mmol/l) a medios de contraste no iónicos puede disminuir el riesgo de fibrilación ventricular (VF) de estos medios de contraste. Sin embargo, los estudios también muestran que la adición de más sodio a medios de contraste puede incrementar también la inotropía negativa, como se acusa por la reducida presión arterial sistólica/presión sistólica ventricular izquierda (SAP/LVP). Para mantener las relaciones de sodio-calcio (Na-Ca) normales extracelulares e intracelulares, la adición de calcio a medios de contraste no iónico reduce los efectos inotrópicos negativos. La cuestión clave es cuanto calcio se debe añadir para prevenir el incremento de la inotropía negativa. La adición de NaCl 19 mM y  $\text{CaCl}_2$  0,3 mM a 320 mg/ml de iodixanol en la formulación de Visipaque se consideró óptima para minimizar las perturbaciones fisiológicas tales como VF y la inotropía negativa incrementada durante la angiografía coronaria.

- En nuestros estudios, se confirmó el beneficio del  $\text{CaCl}_2$  al Compuesto I que contiene NaCl 45 mM (Tabla 3). Una formulación (F1) con  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM indujo significativamente menor SAP y LVP que la formulación con  $\text{CaCl}_2$  0,3 mM (F3) o  $\text{CaCl}_2$  0,7 mM (F5), respectivamente. La formulación de Compuesto I con  $\text{CaCl}_2$  0,3 mM provocó menor SAP que la formulación con  $\text{CaCl}_2$  0,7 mM. Por consiguiente añadir iones calcio a los medios de contraste puede contrarrestar la inotropía negativa provocada añadiendo sodio.
- 40

- Sin embargo, hay un equilibrio crítico entre los iones sodio y calcio. Añadir concentraciones apropiadas de sodio y calcio a medios de contraste no iónicos disminuye el riesgo de VF y reduce los efectos adversos sobre la fuerza contráctil. Añadir demasiado sodio disminuye la fuerza contráctil miocárdica. Este último efecto es contrarrestado por
- 45

la adición de iones Ca. La formulación de Compuesto I, que contiene NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,7 mM (F7) parece ser la mejor formulación porque no provocó ninguna VF y mantuvo mejor inotropía que las formulaciones F1 y F3. Sin embargo los efectos hemodinámicos de la formulación F5 de Compuesto I, sin embargo, eran iguales a los de Visipaque, de modo que se prefiere una concentración de calcio entre F3 y F5. De este modo, en una realización particularmente preferida la composición de la invención comprende NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM.

La seguridad intravenosa e intraarterial de esta composición de Compuesto I se mostró en un estudio separado. En este estudio los efectos cardiovasculares del Compuesto I en una composición de NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM se verificaron a tres niveles de dosificación in vivo en un modelo porcino agudo. En resumen no hubo cambios totales del rendimiento miocárdico cuando se administró la composición vía la ruta intravenosa e intraarterial. El estudio se describe adicionalmente en el Ejemplo 3.

Generalmente, los medios de contraste yodados pueden provocar reacciones tardías de hipersensibilidad en pacientes susceptibles desde 1 hora hasta varios días después de la exposición. Estas reacciones son principalmente erupciones de la piel no-serias tales como erupciones maculares, maculopapulares y del tipo de urticaria. Las reacciones adversas retrasadas inducidas por los medios de contraste (DARs) tales como las erupciones de la piel parecen ser causadas por células T reactivas con los medios de transporte que, al reconocer los medios de transporte, proliferan y subsecuentemente orquestan una reacción inflamatoria en la piel. El solicitante ha evaluado un modelo de proliferación de células T in vitro diseñado para predecir la frecuencia relativa con la que los medios de contraste, tales como Compuesto I, provocarán reacciones tardías de la piel en pacientes post-administración intravascular. Dos medios de contraste, iodixanol e iohexol, con velocidades conocidas de reacciones de la piel retrasadas, y el nuevo medio de contraste, Compuesto I, se analizaron (2 y 5 mg/ml) para ver la proliferación de células T in vitro en células mononucleares de sangre periférica sin CD25<sup>+</sup> de 100 donantes que representan las frecuencias de HLA-DR de la población mundial. Las respuestas positivas de las células T se evaluaron según los protocolos publicados y los valores del índice de estimulación (respuesta positiva  $\geq 1,9$ ). Se ensayó la toxicidad in vitro midiendo la viabilidad celular de las primeras 10 muestras de donante incubadas con medios de contraste de ensayo (5 mg/ml). Los resultados fueron que todos los principales alotipos de HLA-DR estaban representados con una frecuencia equivalente a la población mundial. Ningún medio de contraste ensayado parecía tener un efecto significativo sobre la viabilidad celular. El Compuesto I tenía menos muestras de donante con proliferación de células T positivas comparado con iodixanol e iohexol a ambas concentraciones. Para iodixanol e iohexol, las respuestas de proliferación de células T para la mayoría de los donantes ocurrieron los días 7 y 8; la significancia estadística favoreció una respuesta de proliferación reducida al Compuesto I el día 8. En las conclusiones el modelo estableció con éxito la frecuencia relativa con la que los medios de contraste provocaron la activación de las células T in vitro. Los resultados se correlacionaron con la frecuencia publicada de reacciones tardías de la piel con dos medios de contraste comercializados e identificaron una frecuencia más baja para el Compuesto I.

Los resultados por consiguiente indican que el Compuesto I tiene la menor capacidad para estimular in vitro la proliferación de células T comparado con iodixanol e iohexol. Dada la más frecuente asociación de DAR con medios de contraste dímeros, nuestro hallazgo de que un dímero muy relacionado con iodixanol no estimula la proliferación de células T in vitro hasta el mismo punto que el iodixanol, o ciertamente hasta el mismo punto que el monómero iohexol, es de considerable interés. Debido a que ahora se sabe que la proliferación de células T subyace DAR, nuestros datos sugieren que una estructura dímera per se puede no provocar en sí misma una mayor frecuencia de proliferación de células T. La diferencia estructural clave entre el Compuesto I y el iodixanol es que 2 grupos acetilo en el iodixanol han sido reemplazados por 2 grupos formilo en el Compuesto I. Esta modificación tiene un efecto en la estructura de unión de la molécula, conformación, y comportamiento quimico-físico, y sorprendentemente el Compuesto I tiene una menor capacidad para estimular la proliferación de células T in vitro que el iodixanol e iohexol. Por consiguiente, se espera que una composición de diagnóstico según los primeros aspectos de la invención provoque menores reacciones de hipersensibilidad posterior que los medios de contraste comercializados tales como Omnipaque<sup>™</sup> (iohexol) y Visipaque<sup>™</sup> (iodixanol).

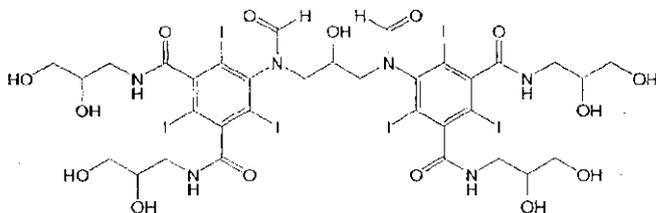
El Compuesto I se puede preparar como se describe en el documento WO 2009/08734. Se describe un procedimiento general en las páginas 16-20, y se proporciona un método específico para la preparación en el Ejemplo 1 del documento WO 2009/008734. La solicitud WO 2009/008734 revela una descripción de un procedimiento para preparación

El Compuesto I puede existir en varias formas isómeras debido a los átomos de carbono quirales. Además, el compuesto exhibe isomerismo exo/endo debido a la rotación restringida del enlace N-CO en la función formilo provocada por la proximidad del voluminoso átomo de yodo. Se incluyen tanto los productos enantiómericamente puros como las mezclas de isómeros ópticos.

La composición de diagnóstico de la invención está en una concentración lista para su uso. Generalmente las composiciones en una forma lista para su uso tendrán concentraciones de yodo de por lo menos 100 mg l/ml, preferentemente por lo menos 150 mg l/ml, siendo preferidas las concentraciones de por lo menos 300 mg l/ml, por ejemplo, 320 mg l/ml. La composición de diagnóstico preferentemente incluye adicionalmente vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de tales son ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS).

La composición de diagnóstico de la invención es preferible para uso como medio de contraste de rayos X en diagnóstico de rayos X o generación de imágenes de rayos X. La composición se puede administrar en forma de inyección de bolo o por infusión. Adicionalmente, la composición se puede administrar por administración intravascular, intravenosa o intraarterial. Alternativamente, la composición se puede administrar también oralmente.

- 5 En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de un Compuesto I



**Compuesto I**

para la fabricación de una composición de diagnóstico para uso en diagnóstico de rayos X, en el que la composición comprende

un vehículo farmacéuticamente aceptable;

- 10 y disuelto en ella un compuesto de sodio y un compuesto de calcio que proporciona una concentración de iones de sodio 40-50 mM y una concentración de iones de calcio 0,1-0,7 mM.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de diagnóstico que comprende administrar una composición de diagnóstico de la invención al cuerpo de un ser humano o animal, examinar el cuerpo con un dispositivo de diagnóstico y recoger datos del examen. En el método de diagnóstico al cuerpo se le puede

- 15 preadministrar la composición de diagnóstico.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de detección por generación de imágenes in vivo que comprende las siguientes etapas:

i) administrar una cantidad detectable de la composición de diagnóstico de la invención;

ii) dejar que se distribuya la composición administrada;

- 20 iii) detectar las señales emitidas por el Compuesto I de la composición distribuida,

iv) generar una imagen representativa de la localización y/o cantidad de dicha señal.

El método de generación de imágenes es un método de generación de imágenes de rayos X y en una realización preferida de este aspecto, el método de detección es un método de arteriografía coronaria, y más preferentemente la composición de diagnóstico se administra en forma de inyección de bolo a las arterias coronarias.

- 25 En otro aspecto más, la invención proporciona una composición de la invención para uso en generación de imágenes o diagnóstico de rayos X, tal como en arteriografía coronaria.

Breve descripción de los dibujos:

La Figura 1 representa una comparación de la distribución de radiactividad en ratas Wistar macho y hembra 48 horas después de la administración de Compuesto I marcado con [<sup>123</sup>I].

- 30 La Figura 2 representa la frecuencia de fibrilación ventricular provocada por la inyección de Manitol, Manitol + sodio y calcio añadido, Iodixanol + Manitol, Visipaque™ y disolución de Ringer. Datos tomados de Chai et al.

La Figura 3 representa la frecuencia de fibrilación ventricular provocada por la inyección de composiciones de Compuesto I, que comprende diferentes concentraciones de cloruro de calcio, comparado con inyecciones de Visipaque. El volumen de inyección era de 25 ml durante un periodo de 62,5 s y las disoluciones se inyectaron selectivamente en el LAD.

- 35

La Figura 4 representa la viscosidad del Compuesto I a 20°C y 37°C frente a la concentración.

La Figura 5 representa el efecto del Compuesto I (con o sin calcio añadido) y Visipaque en la LVSP de 45 a 70 segundos desde el inicio de la inyección a la LAD de cerdos normales normalizado con inyección de lactato de Ringer (LR).

- 40 La Figura 6 representa el efecto en los parámetros cardiovasculares después de la inyección de 40 ml (5 ml/s) de

lactato de Ringer, Compuesto I, Visipaque o Iopamidol a la LAD de cerdos normales.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Propiedades quimicofísicas, toxicidad aguda y datos de biodistribución para el Compuesto I

#### Unión a proteína

- 5 La unión del Compuesto I a seroalbúmina humana (HSA) se determinó usando un método de diálisis de equilibrio. Una disolución patrón de Compuesto I (5,0 mg/ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS)) se mezcló con citrato:plasma humano en una relación de 1:9. El equilibrio se llevó a cabo en un dializador Diachem Dianorm contra una disolución salina acuosa tamponada con fosfato usando una membrana de corte de MW de 10.000 Diachem 10.17 y llevó a cabo durante 25 horas.
- 10 El análisis de las disoluciones se llevó a cabo usando un instrumento de ICP-AES. Además, las disoluciones con PBS añadido se equilibraron también contra disoluciones de plasma humano citrado para asegurar que se había obtenido el equilibrio. Se determinó que la unión del Compuesto I a seroalbúmina humana era muy baja,  $3,1 \pm 1,3\%$ , confirmando la interacción insignificante de la sustancia con proteínas endógenas. Como referencia, se determinó que la unión de iodixanol a HSA era  $0,4 \pm 0,9\%$ .

#### 15 Coeficiente de reparto

- Como medida de la hidrofilia del Compuesto I, se determinó el coeficiente de reparto entre octanol y agua. Se agitó agua (5 ml) que contiene la sustancia de ensayo (0,3 mg/ml) con 15 ml de n-octanol hasta que se obtuvo el equilibrio. La fase acuosa se separó por centrifugación y se analizó por HPLC (HP1100 equipado con una columna C18 Discovery, 100x2,1 mm) usando detección de UV a 244 nm y un flujo de 0,3 ml/min. Se usaron condiciones de HPLC isocrático, 8% acetonitrilo en agua (v/v). La fase octanol (12,5 ml) se extrajo con agua (0,75 ml) hasta que se obtuvo el equilibrio y las fases se separaron por centrifugación. La fase acuosa se analizó por HPLC usando las condiciones detalladas anteriormente. Tanto el octanol como el agua se presaturaron con agua y octanol, respectivamente, antes de los experimentos del coeficiente de reparto. La hidrofilia del Compuesto I, tal como se determina por medio del reparto entre octanol y agua, mostró que el Compuesto I es muy hidrófilo con un logP de -
- 20 4,28. Como comparación, se determinó que el log P correspondiente de iodixanol era de -4,28. El valor dado en la bibliografía es -4,05. La hidrofilia incrementada del Compuesto I comparada con iodixanol se confirma por su comportamiento en HPLC.

#### Viscosidad

- 30 La viscosidad del Compuesto I se determinó a dos temperaturas diferentes, 20°C y 37°C y a tres concentraciones diferentes, 246, 295 y 313 mg/ml. Las disoluciones de ensayo eran isotónicas por el ajuste de la osmolalidad con NaCl y se habían esterilizado en autoclave. La densidad de las disoluciones se determinó usando un medidor de densidad, DMA58 (Anton Paar). Se usó una técnica de tubo en U calibrado, en la que el tiempo de caída se usó como medida de la viscosidad dinámica. La viscosidad del Compuesto I se determinó a 20°C y 37°C a tres concentraciones diferentes. Los resultados se muestran en la Fig. 4. En comparación con Visipaque, la viscosidad a
- 35 320 mg l/ml y 20°C es similar, alrededor de 24 mPas.

#### Osmolalidad

- La osmolalidad del Compuesto I se determinó a cuatro concentraciones diferentes 204, 254, 310 y 324 mg/ml. Se usó un osmómetro de presión de vapor Vapro 5520 de Vapro Inc.. La osmolalidad del Compuesto I muestra una relación con la concentración que es cercana a la lineal. La osmolalidad del Compuesto I a 320 mg/ml es menor que
- 40 la del iodixanol, 136 mOsm/kg frente a 210 mOsm/kg a 320 mg/ml.

#### Toxicidad aguda

- A ratas Sca:SD macho adultas jóvenes (Scanbur, Sweden), que pesaban  $200 \pm 20$  g se les inyectó intravenosamente a una velocidad de 1,2 ml/min el Compuesto I (340 mg/ml, 286 mosmol/kg), iodixanol (321 mg/ml, 284 mosmol/kg), manitol de control osmótico (283 mosmol/kg), o disolución salina (290 mosmol/kg), administradas en forma de 2
- 45 dosis distintas separadas 4 horas. Para los animales sacrificados en el intermedio (el día 2 después del tratamiento), el Compuesto I y el iodixanol se dosificaron a 8, 10 y 12,8 gl/kg, que corresponde a volúmenes de dosis total de 23,7, 29,7 y 38,0 ml/kg, y 25, 31,3 y 40 ml/kg, respectivamente, mientras que para el manitol y la disolución salina, el volumen de dosis era 40 ml/kg. Para los animales sacrificados finales del día 7, había 4 grupos de dosis; Compuesto I e iodixanol (12,8 gl/kg), y disolución salina y manitol (40 ml/kg). En todos los casos, cada grupo incluía 8 animales.
- 50 Durante el estudio se efectuaron las siguientes evaluaciones; signos clínicos, pesos corporales y sangre para ver la hematología y la química clínica los días 0, 2 y 7, y observaciones generales, peso de órganos y examen histomorfológico de tejidos de los animales sacrificados por inyección de tiopental intravenosa en exceso los días 2 o 7. El día de la dosificación se definió como día 0. Se midieron los parámetros de bioquímica clínica (Na, K, Cl, PO<sub>4</sub>, Ca, AST, ALT, ALP, colesterol, creatinina, CK, GGT, TG (triglicérido), bilirrubina total, proteína total, urea, albúmina,

LDH y GLDH en un Beckman Synchron CX5 a 37°C. Se analizaron los parámetros hematológicos (WBC, fórmula leucocitaria, RBC, relación WBC/RBC, Hgb, PLT, HCT, MCH, MCHC, MCV, MPV y RDW) con un analizador de hematología automático Cell-Dyn 3500 CS de Abbott. Los riñones del control salino y los 12,8 g/kg de Compuesto I y los grupos de iodixanol se fijaron sumergidos en formalina tamponada neutra al 10%, se procesaron en cera de parafina, se cortaron con un grosor nominal de 5 µm, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron por microscopía visible.

5

Los datos se examinaron por ANOVA paramétrico de una vía, seguido del ensayo post procedimiento de Dunnett, usando los grupos salinos de 2 días y 7 días para la comparación con los grupos de iodixanol y Compuesto I de 2 días y 7 días. El análisis estadístico se aplicó al día -1 (línea base), día 2 y día 7.

#### 10 Biodistribución

Para cada punto de tiempo (2, 20 min, 1, 2, 4, 24, 48 horas) se anestesiaron con isoflurano 3 animales de cada sexo. Cada animal de estudio recibió 2 inyecciones en aproximadamente 20 segundos. La primera inyección era una formulación del Compuesto I (no radiactivo) a ~320 mg/ml, administrada para dar una dosis química total de ~1,6 g/kg vía una específica vena de la cola (izquierda o derecha). Tan pronto como es posible después (en aproximadamente 20 segundos) se inyectó el objeto de ensayo Compuesto I radiactivo [<sup>123</sup>I] (de ~1 a ~8 MBq, hasta 350 µg) en forma de un bolo intravenoso en la vena opuesta de la cola. Este enfoque permitió ajustar la cantidad de radiactividad administrada según el punto de tiempo de disección (día de estudio 1, 2 o 3) sin alterar significativamente la dosis química total de Compuesto I. Los animales fueron colocados a continuación en jaulas de metabolismo para la recogida de orina y heces hasta el tiempo apropiado después de la inyección del Compuesto I marcado. En este momento los animales fueron anestesiados de nuevo con isoflurano y sacrificados por dislocación cervical. Se retiraron los órganos y tejidos seleccionados (sangre, riñones, vejiga y orina, pulmones, hígado, estómago, intestino delgado y grueso, corazón, testículos, ovarios, útero y heces), junto con la cola, que se ensayó como sitio de inyección. Se analizó a continuación la cantidad de radiactividad en los órganos, tejidos y excreciones seleccionados usando un contador automático gamma de doble cristal y sistema de análisis.

15

20

#### 25 Resultados de toxicidad aguda

No había signos clínicos adversos en ratas tratadas con disolución salina o manitol, mientras que en aquellos tratados con Compuesto I e iodixanol, se observó de suave a moderada depresión y movimientos no coordinados y debilidad/inactividad, así como edema y eritema de las extremidades. Estos efectos comenzaron 10-20 minutos después de la primera administración y duraron 2-3 h, pero sin una clara respuesta a la dosis. Los análisis de los datos de hematología y química clínica indicaron que no había efectos adversos toxicológicamente significativos en ninguno de los grupos.

30

En los riñones, los mayores hallazgos relacionados con el tratamiento fueron la vacuolización citoplasmática de los túbulos próximos, y en los glomérulos, la dilatación del espacio de Bowman que contiene material proteínico. El día 2, la severidad de la vacuolización era mayor en aquellos a los que se dio iodixanol comparado con el Compuesto I. Para el día 7, la severidad de la vacuolización era algo menor comparada con el día 2 en ambos grupos, como lo era la dilatación del espacio de Bowman y la presencia de material proteínico.

35

Tabla 1 – Sumario de los principales hallazgos histomorfológicos en los riñones:

Grupo	Nº de ratas	Día de necropsia	Objeto de ensayo	Dosis (gl/kg)	Vacuolización de los túbulos próximos		Glomérulos: dilatación del espacio de Bowman		Glomérulos: material proteinico del espacio de Bowman	
					Riñón izquierdo	Riñón derecho	Riñón izquierdo	Riñón derecho	Riñón izquierdo	Riñón derecho
1	8	2	Disolución salina	-	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0
5	8	2	Compuesto I	12,8	3,3,3,3	3,4,3,3	P,P,0,P	0,0,0,0	P,P,0,P	0,0,0,0
8	8	2	Iodixanol	12,8	4,4,4,4	4,4,4,4	P,P,0,0	P,P,P,P	P,P,0,0	P,P,P,P
9	8	7	Disolución salina	-	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0
10	8	7	Compuesto I	12,8	3,3,2,2	3,3,2,2	0,0,P,P	0,P,0,0	0,0,P,P	0,P,0,0
11	8	7	Iodixanol	12,8	3,3,2,2	3,3,2,2	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0

Clave de los hallazgos: 0= No presente; P=presente; 1= mínimo; 2= suave; 3= moderado; 4= marcado; 5= severo.

Resultados de la biodistribución:

- 5 Después de la administración intravenosa el Compuesto I marcado con [<sup>123</sup>I] se excretó rápidamente estando >80% de la dosis inyectada (id) presente en la vejiga y orina 2 horas después de la inyección. Los niveles en sangre disminuyeron del 21% a los 2 minutos después de la inyección hasta 0,6% de la id 2 horas después de la inyección. Había una pequeña pero significativa cantidad de excreción vía la ruta fecal, que apareció ligeramente mayor en animales hembra (14,3% de la id en las heces) comparado con los animales macho (8,2% de la id en las heces) a las 48 horas después de la inyección, aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa. Menos del 2% de la id se retuvo en el cuerpo 48 horas después de la inyección de Compuesto I marcado, estando aproximadamente 0,5% retenido en los riñones, 0,1% retenido en el hígado y menos de 1% en la carcasa restante (Figura 1), todo la cual había disminuido adicionalmente desde el punto de tiempo de 24 horas. Esto probablemente refleja la excreción lenta continua del Compuesto I retenido en el cuerpo después de la fase inicial de rápida excreción. No hubo retención de radiactividad en los órganos reproductores. En total, el perfil de biodistribución del Compuesto I marcado era similar al de otros agentes de contraste yodados dímeros.

**Ejemplo 2. Estudios de comparación**

2a) Comparación de la cardiotoxicidad de Visipaque™ y composiciones de diagnóstico de Compuesto I en un modelo de oclusión de la LAD de cerdo

- 20 Se hace referencia al estudio de Chai et al. (Acad. Radiol. 2004, 11, 583-593) en el que se mostró que una composición de Iodixanol que contiene NaCl 19 mM y CaCl2 0,3 mM exhibe una menor frecuencia de fibrilación ventricular que el Iodixanol solo. El estudio se llevó a cabo en cerdos en los que el medio se inyectó directamente en la arteria coronaria izquierda (LCA) que se había ocluido previamente. Está claro de la Figura 2 que una formulación de Iodixanol que contiene NaCl 19 mM y CaCl2 0,3 mM exhibe una menor frecuencia de fibrilación ventricular que el Iodixanol solo (P<0,01). En este caso, no se observó la aparición de fibrilación ventricular en la inyección de Visipaque™. La dosis dada en estos experimentos era 20 ml con una velocidad de inyección de 2,0 ml/minuto.

30 Dado que en el estudio de Chai et al. se llevó a cabo una inyección intracoronaria de 20 ml de Iodixanol (formulado como Visipaque) durante un tiempo de inyección de 40 s y no ocurrieron casos de VF, realizamos un estudio en el que se incrementó el volumen de inyección a 25 ml durante un periodo de 62,5 s para incrementar los casos de VF para propósitos de comparación. Además, las disoluciones de ensayo y de referencia se inyectaron selectivamente

en la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) para incrementar adicionalmente la sensibilidad del modelo. Las propiedades químicas y físicas de las disoluciones de ensayo se proporcionan en la tabla 2 y los resultados se representan en la Figura 3.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de las disoluciones de ensayo

Agente de ensayo	Concentración de yodo (mg l/ml)	Electrolitos (mM)	
		Na	Ca
F1: Compuesto I + NaCl + CaCl <sub>2</sub>	320	45	0,1
F3: Compuesto I + NaCl + CaCl <sub>2</sub>	320	45	0,3
F5: Compuesto I + NaCl + CaCl <sub>2</sub>	320	45	0,7
Iodixanol + NaCl + CaCl <sub>2</sub> (Visipaque)	320	19	0,3

5 Con este alto volumen de inyección, incluso el Visipaque™ exhibía una significativa frecuencia de fibrilación ventricular, 100% (Figura 3).

10 Sin embargo, para nuestra sorpresa, el nuevo compuesto I del agente de contraste de rayos X, cuando se formula con NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,1-0,7 mM, no mostró casos de fibrilación ventricular (Véase la Figura 3 y la Tabla 3 para los detalles).

15 Al comparar los resultados de los dos diferentes estudios, se observó un incremento de la frecuencia de fibrilación ventricular de 0% a 100% con Visipaque™. Sin embargo, incluso con la dosis alta, el compuesto I de contraste de rayos X dímero en una composición de diagnóstico no exhibe fibrilación ventricular. La principal diferencia es que el Compuesto I se ha formulado con NaCl 45 mM, que es significativamente mayor que la de Visipaque (19 mM). Aunque no se observó un efecto significativo en la VF, con una concentración de iones calcio entre 0,1 y 0,7 mM en la VF, había una reducción significativa de SAP y LVP cuanto estaba presente menos calcio (Tabla 3).

Tabla 3. Cambios hemodinámicos 50 s después de la inyección, % de valor pre-inyección

	F1	F3	F5	Visipaque
SAP	-18%±11	-9%±7,2*	-4%±6,1†‡	-5%±4,5†§
LVP	-16%±10	-7%±8*	-3%±7†	-4%±5†
dP/dt máxima	+10%±27	+31%±38	+34%±29	+21%±10,8
HR	-1%±1,0	0%±0,8	-2%±3,0	0%±3,5

SAP: presión arterial sistólica (mm Hg)

20 LVP: presión sistólica ventricular izquierda (mm Hg)

dP/dt máxima: máxima velocidad de generación de presión LV (mm Hg/s)

HR: ritmo cardíaco (pulsaciones/min)

\*P<0,05 vs F1

†P<0,01 vs F1

25 ‡P<0,01 vs F3

§P<0,01 vs F3

Estos datos indican que el principal factor que influye en la frecuencia de fibrilación ventricular es la concentración de cloruro de sodio, mientras que el calcio no tiene un efecto significativo en la presión arterial sistólica y la presión sistólica ventricular izquierda.

30 2b: Comparación del Compuesto I en composiciones con y sin CaCl<sub>2</sub> añadido con Visipaque y Iopamidol

Los efectos hemodinámicos de composiciones de Compuesto I con y sin CaCl<sub>2</sub> añadido se compararon con Visipaque y Iopamidol después de la administración selectiva a la LAD en cerdos normales sin oclusión con globo. Los efectos de cada medio de contraste se normalizaron con cualquier efecto observado con una inyección equivalente de disolución de lactato de Ringer, que actuó como control de la "relación" de volumen y electrolito.

5 Había un total de 12 cerdos en este estudio, y cada cerdo recibió un solo CM inyectado 3 veces con volúmenes de 10 ml (4 ml/s), 20 ml (1 ml/s) y 25 ml (0,4 ml/s) (un total de 9 inyecciones de CM en cada cerdo). Cada CM iba precedido o seguido de una inyección de control de Lactato de Ringer, y el otro de cada inyección (volumen) se distribuyó al azar en cada cerdo. La Tabla 4 proporciona las cantidades y relaciones de electrolitos de sodio y calcio usados

10 Tabla 4:

Electrolitos	Visipaque mM	Compuesto I mM	Compuesto I + CaCl <sub>2</sub> mM	Lactato de Ringer mM o (Relación)	Fluido intersticial humano mM o (Relación)
Na	19	45	45	130	140 (135-145)
Ca	0,3	-	0,5	3	1,2 (1,2-1,3)
Na/Ca	63	-	90	43	117

A un volumen de inyección de 25 ml el Compuesto I en una composición sin CaCl<sub>2</sub> añadido se asoció a una reducción de LVSP entre 45 y 70 segundos después de la inyección (media de -5,7 mm Hg normalizado con lactato de Ringer) mientras que el Compuesto I en una composición con CaCl<sub>2</sub> añadido y Visipaque tenía poco o ningún efecto (-0,3 y +0,1 mm Hg normalizado con lactato de Ringer) (Figura 5). La disminución de LVSP observada con la composición de Compuesto I sin CaCl<sub>2</sub> añadido era significativamente diferente a aquella con CaCl<sub>2</sub> añadido, que no era significativamente diferente a Visipaque. Además, una respuesta correspondiente a la inyección de Iopamidol no se pudo analizar dado que se observó VF en cada caso entre aproximadamente 27 y 50 segundos después del inicio de la inyección de 25 ml. Estos resultados indican que la presencia de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM en la composición de Compuesto I es beneficiosa y limita cualquier efecto negativo en la LVSP de una manera similar al Visipaque. Además, los electrolitos adicionales presentes en la composición de diagnóstico de Compuesto I y Visipaque pueden rebajar la propensión a la inducción de VF comparado con Iopamidol que no tenía electrolitos añadidos.

15

20

2c: Comparación de una composición de Compuesto I con Visipaque, Iopamidol y lactato de Ringer en cerdos normales con una rápida velocidad de inyección

25 En un estudio adicional los efectos hemodinámicos del Compuesto I en una composición con NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM se compararon con Visipaque y Iopamidol después de la administración selectiva a la LAD de cerdos normales con una rápida velocidad de inyección (5 ml/s). Se estudió también el lactato de Ringer como control de la "relación" de volumen y electrolito. En total se estudiaron 3 cerdos, y cada CM se administró dos veces a cada cerdo en orden aleatorio. La velocidad de inyección usada era 5 ml/s con un volumen de inyección total de 40 ml. La Tabla 5 proporciona las cantidades y relaciones de electrolitos de sodio y calcio usados.

30

Tabla 5:

Electrolitos	Visipaque mM	Compuesto I mM	Lactato de Ringer mM o (Relación)	Fluido intersticial humano mM o (Relación)
Na	19	45	130	140 (135-145)
Ca	0,3	0,5	3	1,2 (1,2-1,3)
Na/Ca	63	90	43	117

Mientras que la inyección de Compuesto I y Visipaque no indujo cambios en la LVSP o dP/dt respecto a la línea base que fueran significativamente diferentes de la administración de lactato de Ringer, el Iopamidol indujo una significativa disminución e incremento de los valores de LVSP y dP/dt respectivamente (Figura 6). La LVSP se redujo en 9%±6 y la dP/dt se incrementó en 69%±16 después de la administración de Iopamidol. Esto contrastaba con la inyección de lactato de Ringer, Compuesto I y Visipaque, que estaban asociadas a un ligero incremento de la LVSP (~5%) y un modesto incremento de dP/dt (hasta ~30%). Estos resultados indican que después de la inyección rápida en la LAD de cerdos normales de Compuesto I en una composición con NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM tenía efectos mínimos sobre los parámetros hemodinámicos similar a Visipaque o disolución de Ringer fisiológica. Se considera que la presencia de electrolitos en las formulaciones de Compuesto I y Visipaque estudiadas, que son más similares a la composición equilibrada de lactato de Ringer y al fluido intersticial, contribuyó a un superior mantenimiento de la

35

40

función cardíaca comparado con aquella de después de la inyección de lopamidol, que no contiene electrolitos añadidos.

### Ejemplo 3. Seguridad intravenosa e intraarterial de la composición de diagnóstico de Compuesto I

5 La seguridad intravenosa (i.v.) e intraarterial (i.a.) de una composición de Compuesto I se mostró en un estudio separado (ref. B145095). En este estudio los efectos cardiovasculares del Compuesto I en una composición con NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM se evaluaron a tres niveles de dosificación in vivo en un modelo porcino agudo.

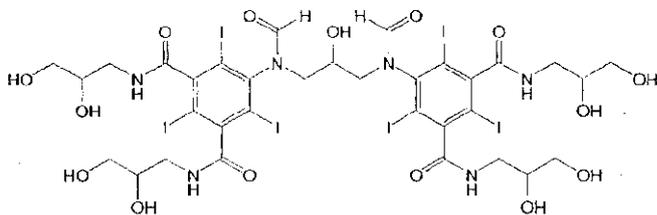
Métodos: La composición se administró intraarterialmente o intravenosamente a grupos de tres animales a uno de tres niveles de dosificación (1 vez, 2 veces o 3 veces el volumen estándar de 2 ml/kg). Cada animal recibió también un volumen equivalente de disolución de Lactato de Ringer como control de volumen. Se evaluaron los efectos CV: 10 ritmo cardíaco (HR), oximetría de pulso, electrocardiograma (ECG), presión aórtica (sistólica, diastólica y media), presión diastólica del extremo ventricular izquierdo (LVEDP). También se evaluaron la ecocardiografía/ultrasonidos para el volumen sistólico, fracción de eyección y contractilidad cardíaca.

**Resultados:** La evaluación del resumen de datos preliminares sugiere que no hubo efectos importantes 15 relacionados con la dosis o la ruta del Compuesto I en HR, oximetría de pulso y ECG en el corazón porcino. El análisis de oximetría de pulso mostró que la saturación de oxígeno permanecía a aproximadamente 98% durante toda la dosificación. El HR también permaneció dentro de los intervalos normales. No hubo perturbaciones rítmicas relacionadas con el Compuesto I: el intervalo QT estaba dentro del intervalo normal independientemente de la dosificación i.a. o i.v. de Compuesto I. Similarmente, se observó poco o ningún efecto del Compuesto I en la presión 20 aórtica (sistólica, diastólica y media) en todo el intervalo de dosificación. Los cambios de presión aórtica parecían similares si el Compuesto I se administró por ruta i.v. o i.a. Hubo ligeros incrementos en la LVEDP con dosis aumentadas de Compuesto I, el efecto era similar si el Compuesto I se administraba vía ruta i.v. o i.a.. Además, los incrementos de LVEDP eran similares en magnitud a los observados después de la administración de volúmenes crecientes de lactato de Ringer. El análisis del volumen sistólico, fracción de eyección y contractilidad cardíaca por 25 ecocardiografía mostró solo un ligero cambio en volumen diastólico final (EDV), confirmando que algunos efectos estaban relacionados con el volumen y no eran específicos de la administración de Compuesto I.

Por consiguiente, no hubo cambios generales del rendimiento miocárdico cuando se administró Compuesto I vía la ruta i.a. o i.v.. Los cambios mínimos en los parámetros de la función CV se atribuyeron al volumen administrado y no al Compuesto I objeto del análisis, debido a que se observaron efectos similares en la inyección con disolución de lactato de Ringer. Todos los parámetros miocárdicos estaban dentro de los intervalos normales después de la 30 administración intravenosa o intraarterial de Compuesto I hasta 3 veces el volumen de dosis estándar de 2 ml/kg.

## REIVINDICACIONES

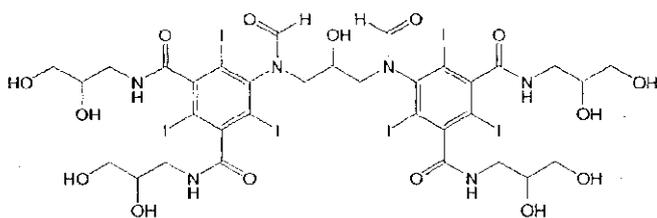
1. Una composición de diagnóstico que comprende un Compuesto I



**Compuesto I**

un vehículo farmacéuticamente aceptable;

- 5 y disuelto en ella un compuesto de sodio y un compuesto de calcio que proporcionan una concentración de iones sodio 40-50 mM y una concentración de iones calcio 0,1-0,7 mM.
2. Una composición de diagnóstico según la reivindicación 1, que comprende un compuesto de sodio que proporciona una concentración de iones sodio 42-47 mM.
3. Una composición de diagnóstico según la reivindicación 1, que comprende un compuesto de sodio que proporciona una concentración de iones sodio 44-46 mM.
- 10 4. Una composición de diagnóstico según la reivindicación 1, que comprende un compuesto de sodio que proporciona una concentración de iones sodio 45 mM.
5. Una composición de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un compuesto de calcio que proporciona una concentración de iones calcio 0,3-0,6 mM.
- 15 6. Una composición de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un compuesto de calcio que proporciona una concentración de iones calcio 0,4-0,5 mM.
7. Una composición de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un compuesto de calcio que proporciona una concentración de iones calcio 0,5 mM.
8. Una composición de diagnóstico según la reivindicación 1, en la que la relación entre la concentración de iones sodio y la concentración de iones calcio está entre 63 y 117.
- 20 9. Una composición de diagnóstico que comprende un Compuesto I

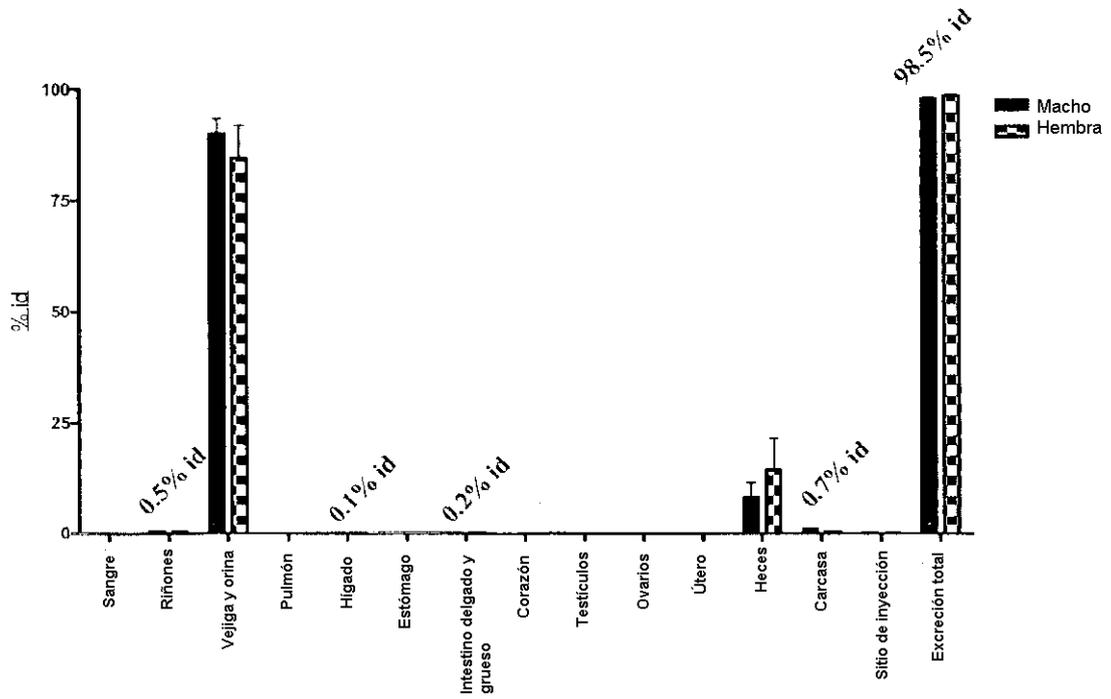


**Compuesto I**

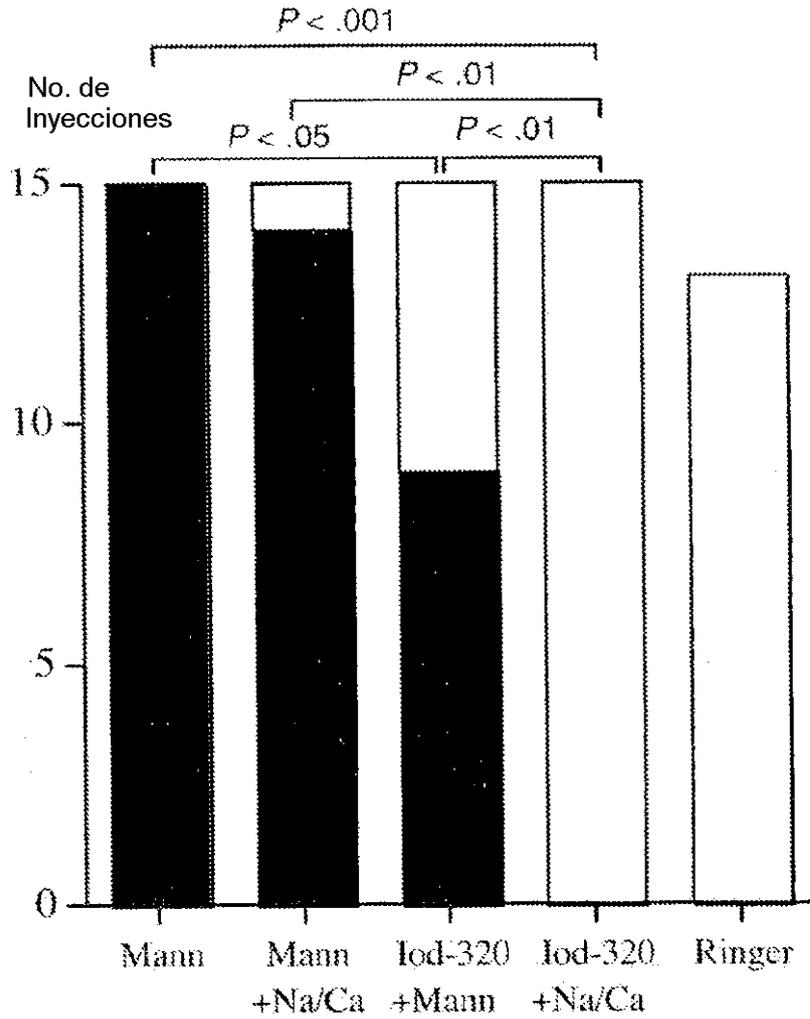
un vehículo farmacéuticamente aceptable;

- 25 y disuelto en ella un compuesto de sodio y un compuesto de calcio en el que la relación entre la concentración de iones sodio y la concentración de iones calcio está entre 40 y 45.
10. Una composición de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el compuesto de sodio y el compuesto de calcio son sales que comprenden contraiones seleccionados del grupo de cloruro, sulfato, fosfato e hidrogenocarbonato.
11. Una composición de diagnóstico según la reivindicación 10, en la que el compuesto de sodio es cloruro de sodio y el compuesto de calcio es cloruro de calcio.
- 30 12. Una composición de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende adicionalmente EDTA y/o TRIS.

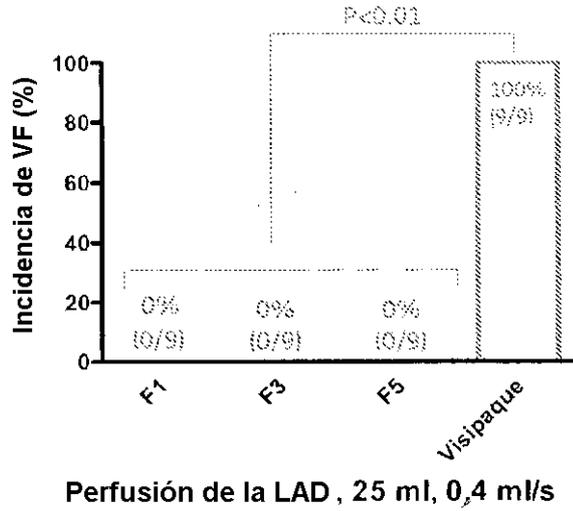
13. Una composición de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso como medio de contraste de rayos X en diagnósticos de rayos X o generación de imágenes de rayos X.
  14. Una composición de diagnóstico según la reivindicación 13, en la que el uso incluye examinar el cuerpo con un dispositivo de diagnóstico y recoger datos del examen.
- 5 15. Una composición de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, en la que el uso es un método de arteriografía coronaria.



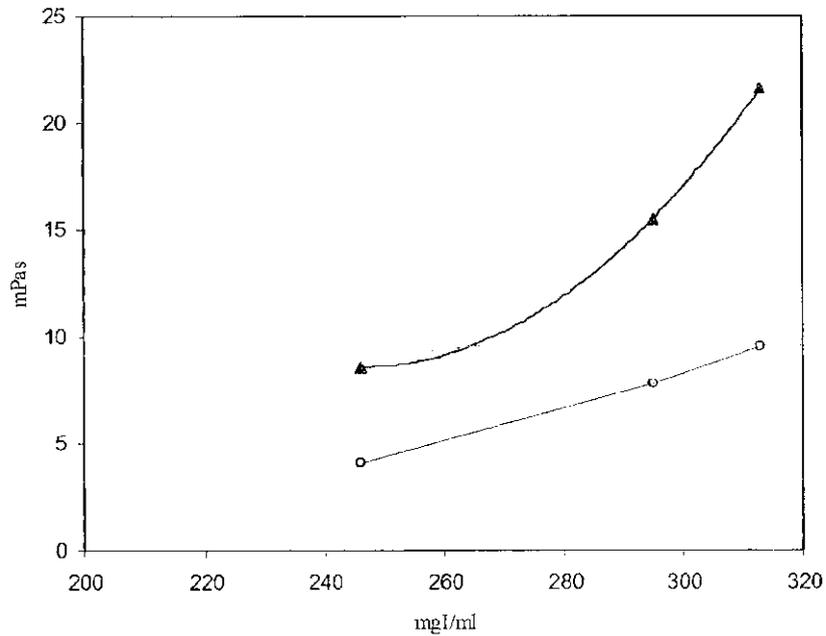
**Figura 1.** Comparación de la distribución de radiactividad en ratas Wistar macho y hembra 48 horas después de la administración de Compuesto I marcado [<sup>123</sup>I]. Excreción total = suma de radiactividad en la vejiga y orina más las heces.



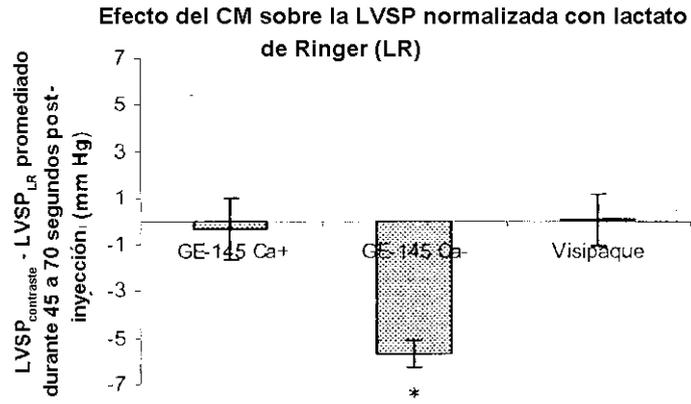
**Figura 2.** Frecuencia de fibrilación ventricular causada por la inyección de manitol (Mann; 275 mM), Manitol + sodio y calcio añadidos (Mann + Na/Ca; manitol 240 mM, NaCl 19 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,3 mM), Iodixanol + Manitol (Iod-320 + Mann; 320 mg/ml de Iodixanol y manitol 50 mM), Visipaque™ (Iod-320; 320 mg/ml de Iodixanol, NaCl 19 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,3 mM) y disolución de Ringer (Ringer, acetato de Ringer, KabiVitrum AB, Suecia). El relleno de negro denota VF, el relleno de blanco denota no VF. Los datos están tomados de Chai et al.



**Figura 3.** Frecuencia de la fibrilación ventricular causada por la inyección de: Compuesto I, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM (F1, 320 mgI/ml Compuesto I, NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM); Compuesto I, CaCl<sub>2</sub> 0,3 mM (F3, 320 mgI/ml Compuesto I, NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,3 mM); Compuesto I, CaCl<sub>2</sub> 0,7 mM (F5, 320 mgI/ml Compuesto I, NaCl 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,7 mM), Visipaque

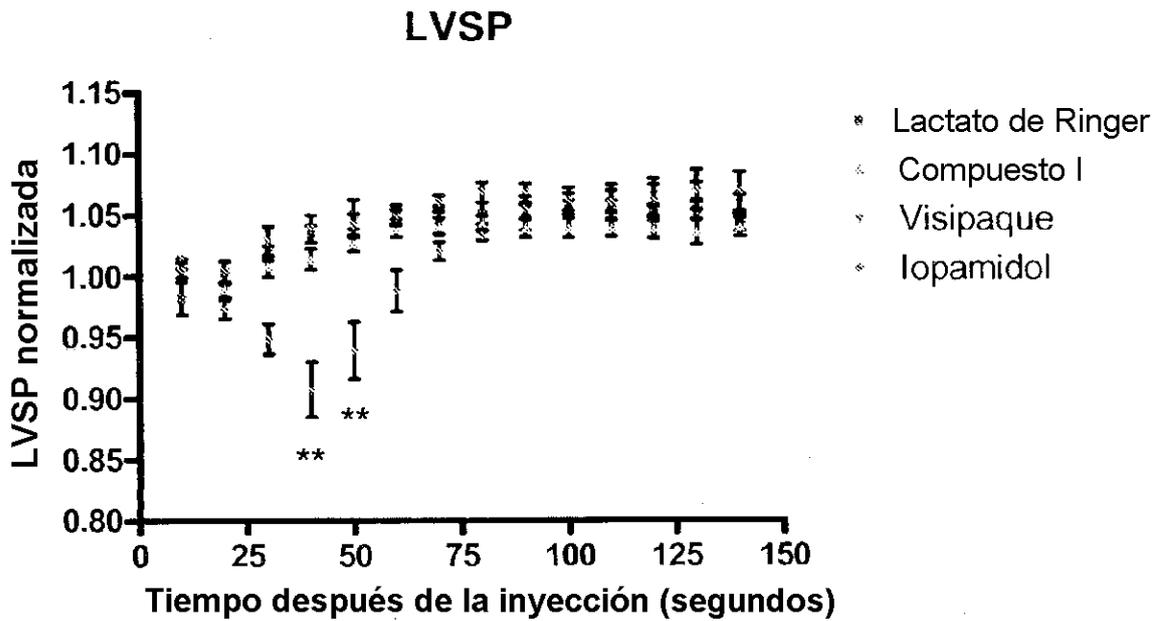


**Figura 4.** La viscosidad del Compuesto I a 20°C (▲) y 37°C(○)vs concentración

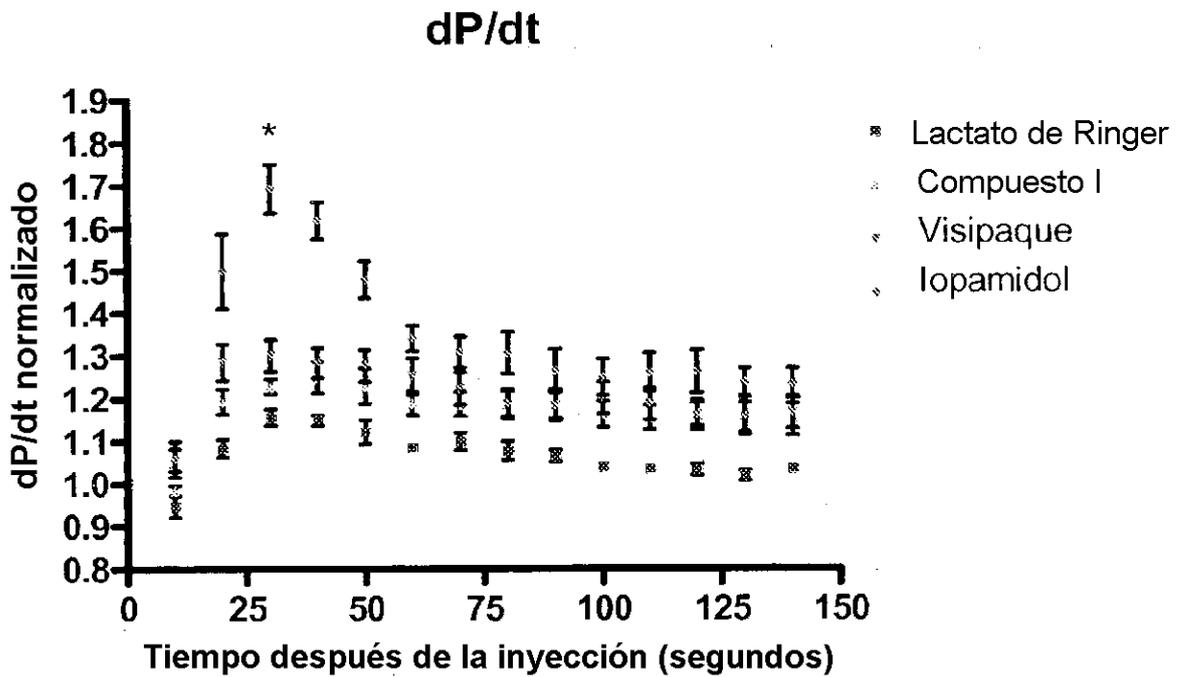


**Figura 5.** Efecto del Compuesto I (con o sin Ca añadido) y Visipaque en la LVSP de 45 a 70 segundos desde el inicio de la inyección en la LAD de cerdos normales normalizado con inyección de lactato de Ringer (LR). El volumen de inyección era 25 ml (0,4 ml/s). “GE-145 Ca+” es una composición de Compuesto I que contiene Na 45 mM, Ca 0,5 mM, y “GE-145 Ca-” es una composición de Compuesto I que contiene Na 45 mM, y sin Ca añadido. Media±SEM. \* =p<0,05 diferencia significativa con GE-145+ usando el test de Dunnett de dos vías.

a)



b)



**Figura 6.** Efecto sobre los parámetros cardiovasculares después de la inyección de 40 ml (5 ml/s) de Lactato de Ringer, Compuesto I, Visipaque o Iopamidol en la LAD de cerdos normales. a) Cambio de LVSP normalizado a la línea base. b) Cambio de dP/dt normalizado a la línea base. Media±SD. \* = diferencia significativa con lactato de Ringer, \* p<0,005, \*\* p<0,01 usando ANOVA de dos vías con test posterior de Bonferroni.