

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 935**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2009 E 09781822 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2328621**

54 Título: **Nanoemulsión fluorescente de verde de indocianina**

30 Prioridad:

**14.08.2008 FR 0855590**

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

**10.03.2014**

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET  
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (100.0%)  
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GOUTAYER, MATHIEU;  
NAVARRO Y GARCIA, FABRICE y  
TEXIER-NOGUES, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 446 935 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**

Nanoemulsión fluorescente de verde de indocianina

5 **[0001]** La presente invención se refiere a una nueva formulación de verde de indocianina que se puede usar como un agente de diagnóstico, en particular para la obtención de imágenes de fluorescencia, y a un procedimiento para la preparación de la misma y a los usos de la misma.

[Técnica anterior]

10

**[0002]** La obtención de imágenes de fluorescencia es una técnica de obtención de imágenes que se basa en la inyección de un marcador fluorescente en un animal o humano y la detección de la localización del marcador fluorescente. En consecuencia, la instrumentación comprende una fuente de excitación del marcador fluorescente y un detector de la fluorescencia emitida por el marcador.

15

**[0003]** En la actualidad, la obtención de imágenes de fluorescencia aparece como una técnica de obtención de imágenes complementaria a otras modalidades como la RMN (resonancia magnética nuclear), PET (tomografía por emisión de positrones), SPECT (tomografía computarizada de emisión de fotón único), ecografía, radiografía o tomografía de rayos X.

20

**[0004]** La obtención de imágenes de fluorescencia tiene una serie de ventajas sobre las otras técnicas de obtención de imágenes:

25 - no utiliza radiaciones ionizantes y, por consiguiente, no requiere protección radiológica ni la compleja gestión de los residuos radiactivos;

- la instrumentación es de bajo coste, compacta y fácil de usar;

30

- los tiempos de adquisición son muy cortos;

- es una técnica que es muy sensible en términos de la concentración del marcador que se ha de inyectar, la concentración del marcador es mucho menor que para la RM y similar a la utilizada en las técnicas PET y SPECT;

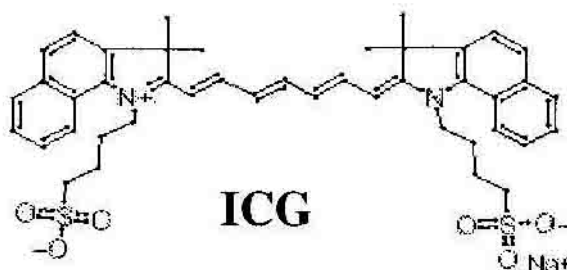
35

- es una técnica cuya resolución es similar a la de las técnicas nucleares de obtención de imágenes (PET, SPECT) cuando la obtención de imágenes se lleva a cabo de forma no invasiva en la escala de un pequeño animal o de un órgano, y que puede tener resolución celular cuando se utilizan técnicas de microscopía.

**[0005]** En la actualidad, la fluoresceína y el verde de indocianina son fluoróforos aprobados en Estados Unidos para su inyección en seres humanos.

40

**[0006]** El verde de indocianina, que se denomina en lo sucesivo ICG, se comercializa con el nombre Cardiogreen (Akorn Inc.), Infracyanine (Serb), ICG-Pulsion (Pulsion Medical System). El compuesto tiene la siguiente fórmula:



45

**[0007]** Se trata de un fluoróforo que emite en el infrarrojo cercano. Ese intervalo es de particular interés para la obtención de imágenes de fluorescencia, ya que, en comparación con el intervalo visible, los tejidos absorben menos luz, los tejidos difunden menos luz y se reduce la autofluorescencia de los tejidos.

**[0008]** Por esa razón, el verde de indocianina es hoy en día el fluoróforo de elección para las aplicaciones clínicas de obtención de imágenes de fluorescencia.

5 **[0009]** No obstante, el ICG tiene algunas propiedades que hacen que su uso como marcador fluorescente resulte problemático.

**[0010]** En primer lugar, el ICG es un compuesto anfílico con una solubilidad comprendida entre 5 y 10 mg/ml y, por consiguiente, es poco soluble en agua. A mayores concentraciones, se forman dímeros o agregados que  
10 tienen diferentes propiedades espectrales.

**[0011]** Además, el ICG tiene poca estabilidad y un bajo rendimiento cuántico de fluorescencia en solución acuosa, especialmente debido a la formación de esos dímeros poco emisivos. Por lo tanto, la FDA obliga a que las soluciones se preparen menos de 10 horas antes de la inyección en el paciente.

15 **[0012]** Además, el ICG se adsorbe sobre las proteínas plasmáticas en un grado considerable cuando se inyecta por vía intravenosa, lo cual altera la absorción y el espectro de emisión.

**[0013]** Asimismo, la duración de la fluorescencia del ICG (0,5 ns) es muy cercana a la de la autofluorescencia de los tejidos biológicos (típicamente de 0,3-0,4 ns). Por consiguiente, es difícil distinguir la fluorescencia del ICG de la autofluorescencia del tejido utilizando un dispositivo de fluorescencia basado en la excitación luminosa pulsada.

**[0014]** Finalmente, el ICG no tiene un grupo de injerto que permita acoplarlo a biomoléculas o moléculas de direccionamiento, tales como anticuerpos, péptidos, sacáridos, proteínas, oligonucleótidos o aptámeros. El injerto de  
25 moléculas de direccionamiento es valioso porque, después de la inyección sistémica, permite dirigir el fluoróforo *in vivo* hasta la zona de interés, lo que se traduciría en la acumulación preferencial del ICG en la zona de la que se desean obtener las imágenes y, en consecuencia, en un aumento de la sensibilidad de detección.

**[0015]** Se han propuesto una serie de formulaciones de ICG para superar algunos de estos problemas.

30 **[0016]** De esta manera, para el tratamiento de lesiones por fotocoagulación, la solicitud de patente WO 2001/017561 propone formulaciones de ICG que permiten incrementar su solubilidad y estabilidad química, formulaciones que comprenden alcohol, tampones, tensioactivos, glicerol, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), aceites, glóbulos rojos, ácidos grasos y agentes antimicrobianos. La solicitud de patente de EE. UU. n.º  
35 2004/0156782 describe formulaciones de ICG en forma liofilizada para angiografía, para medir el aclaramiento hepático o cardíaco, o para medir el flujo sanguíneo.

**[0017]** La solicitud de patente WO 2003/057259 describe una formulación de ICG basada en liposomas y permite incrementar la solubilidad del fluoróforo. No se especifica la ubicación del fluoróforo. Sin embargo, dado que el fluoróforo se añade después de la formación de los liposomas, es de suponer que se adsorbe en su superficie. Por otra parte, la estabilidad de esta formulación es inferior a un mes. Por último, los liposomas son vesículas con una cubierta de doble capa y en términos generales tienen tamaños de partícula mayores de 100 nm de diámetro; las soluciones de partículas de ese tamaño difunden la luz y no permiten lograr una satisfactoria extravasación de la circulación sanguínea a los tejidos tumorales e internalización en las células.

45 **[0018]** También se ha propuesto adsorber el ICG en moléculas de carga, en especial con el fin de aumentar su semivida en la sangre. Por ejemplo, el documento WO 2005/082423 describe la conjugación por adsorción no específica de seroalbúmina con ICG. Sin embargo, las formulaciones basadas en enlaces de adsorción no covalentes tienen una baja estabilidad química y limitan la elección de los ligandos de direccionamiento biológico que se pueden usar. En consecuencia, estos procedimientos no permiten asociar el ICG con pequeños péptidos de direccionamiento, tales como cRGD, un marcador de la angiogénesis que se ha estudiado en gran medida (Haubner y cols. JACS 1996, 118, 7461-7472), con el fin de producir un marcador fluorescente.

**[0019]** La solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0019265 propone una formulación de fluoróforo en polimerosomas. Sin embargo, tales liposomas sintéticos son complicados de sintetizar, requieren el uso de polímeros sintéticos y no producen directamente nanopartículas adecuadas para permitir una satisfactoria extravasación de la circulación sanguínea a los tejidos tumorales e internalización en las células, a saber, menos de 100 nm e incluso menos de 50 nm.

**[0020]** El documento WO 2008/102065 describe una nanoemulsión fluorescente para la obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo*.

**[0021]** Además, los documentos US 7.014.839 y WO 98/48846 describen una formulación de ICG en forma de una emulsión de tipo oleacuosa, pero sin indicar el procedimiento de producción ni las características de la emulsión. Sin embargo, ese tipo de formulación conduce en la mayoría de los casos a emulsiones en las que el tamaño de las gotitas es demasiado grande para limitar la difusión de la luz y garantizar una satisfactoria furtividad y estabilidad coloidal tras la inyección *in vivo*.

#### 10 **[Problema técnico]**

**[0022]** Las formulaciones propuestas no permiten optimizar el rendimiento del ICG como fluoróforo para la obtención de imágenes de fluorescencia. Por consiguiente, se desea disponer de una formulación de ICG que se pueda usar para la obtención de imágenes de fluorescencia y que sea estable y permita optimizar sus propiedades ópticas, en especial preservándolas frente al ambiente exterior, y que permita acceder a formulaciones transparentes que, después de la inyección, muestren una satisfactoria extravasación de la circulación sanguínea a los tejidos tumorales e internalización en las células.

#### **[Características de la invención]**

20

**[0023]** De acuerdo con la invención, se propone formular el ICG en una emulsión que comprende un lípido de solubilización en la fase oleosa de acuerdo con la reivindicación 1.

**[0024]** De acuerdo con un primer aspecto, por consiguiente, la invención se refiere a una formulación de verde de indocianina en forma de una nanoemulsión, que comprende una fase continua acuosa y al menos una fase oleosa dispersa, en la que la fase oleosa comprende verde de indocianina, al menos un lípido anfílico y al menos un lípido de solubilización de acuerdo con la reivindicación 1.

**[0025]** El lípido anfílico es preferentemente un fosfolípido.

30

**[0026]** La fase oleosa puede comprender además al menos un aceite, especialmente un aceite que tiene un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) comprendido entre 3 y 6, en particular, aceite de soja o aceite de linaza.

**[0027]** La fase acuosa comprende preferentemente además un cotensioactivo, especialmente un cotensioactivo que tiene al menos una cadena compuesta de unidades de óxido de etileno o de unidades de óxido de etileno y óxido de propileno. El cotensioactivo se puede elegir especialmente entre conjugados de polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG-PE), éteres de ácido graso y de polietilenglicol, ésteres de ácido graso y polietilenglicol, y copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno.

**[0028]** La fase continua de la emulsión puede comprender especialmente un tampón fisiológicamente aceptable.

**[0029]** De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una formulación de verde de indocianina que comprende al menos una fase acuosa continua y al menos una fase oleosa dispersa, procedimiento que comprende etapas en las que:

- (i) se prepara la fase oleosa que comprende al menos un lípido de solubilización, un lípido anfílico e ICG;
- (ii) la fase oleosa se dispersa en una fase acuosa bajo una acción de cizallamiento suficiente para formar una nanoemulsión; y
- (iii) se recupera la nanoemulsión así formada.

**[0030]** La acción de cizallamiento se puede ejercer, en particular, por sonicación.

55

**[0031]** La fase oleosa se puede preparar especialmente disolviendo todos o algunos de los constituyentes en un disolvente adecuado y, seguidamente, eliminando el disolvente por evaporación.

**[0032]** De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a dicha formulación de verde de indocianina

para uso como agente de diagnóstico.

- [0033]** Cuando está así formulado, el ICG muestra unas características ópticas considerablemente mejoradas (rendimiento alrededor de 10 veces superior), lo que permite mejorar el rendimiento de la obtención de imágenes o reducir la dosis inyectada. Por ejemplo, entre 2 y 10 ml de ICG formulados como una nanoemulsión a 0,27 mg/ml emiten una señal fluorescente al menos tan intensa como entre 2 y 8 ml de una solución a 2,5 mg/ml de ICG (dosis inyectada por vía intravenosa en un ser humano de 70 kg con el fin de medir el volumen de sangre circulante y el gasto cardíaco).
- 10 **[0034]** Además, la formulación de acuerdo con la invención es muy estable, tanto en términos químicos como a nivel coloidal y respecto al rendimiento óptico con el tiempo.
- [0035]** Otra de las ventajas de la presente formulación es que se puede preparar en un medio isotónico, tal como cloruro de sodio 154 mM, a diferencia del ICG en suspensión, que flocula en un medio de este tipo y, por  
15 consiguiente, se inyecta en un medio hipotónico (agua con glucosa al 5 %).
- [0036]** Resulta totalmente adecuada para su uso en la obtención de imágenes de fluorescencia en la medida en que está constituida preferentemente por compuestos todos ellos aprobados actualmente para la inyección en seres humanos.
- 20 **[0037]** La formulación de ICG de acuerdo con la invención es, además, fácilmente accesible, ya que es muy fácil de preparar y es de bajo coste.
- [0038]** Asimismo, la formulación se puede adaptar a diferentes farmacocinéticas mediante la modificación de  
25 la composición molar de los ingredientes.
- [0039]** Por último, la formulación de acuerdo con la invención se puede funcionalizar y, de esta manera, permite conseguir que el ICG sea transportable hasta la zona de interés de la que se desean obtener imágenes por medio de injerto con una biomolécula o molécula de direccionamiento, lo que abre nuevas aplicaciones clínicas para  
30 la obtención de imágenes de fluorescencia.

#### **[Definiciones]**

- [0040]** Dentro del alcance de la presente descripción, el término «nanoemulsión» se entiende como una  
35 composición que tiene al menos dos fases, en general una fase oleosa y una fase acuosa, en la que el tamaño medio de la fase dispersada es menor que 1 micrómetro, preferentemente entre 10 y 500 nm y en particular entre 20 y 100 nm (véase el artículo C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar y M.J. Garcia-Celma, Curr Opin Colloid In, 2005, 10, 102-110).
- 40 **[0041]** El término «gotita» incluye tanto las gotitas de aceite líquido como tal, como las partículas sólidas obtenidas a partir de emulsiones de tipo oleoacuosas, en las que la fase oleosa es sólida. En este último caso, también se utiliza a menudo la expresión emulsión sólida.
- [0042]** Dentro del alcance de esta descripción, el término «lípidos» se refiere a la totalidad de los materiales  
45 grasos o de las sustancias que contienen ácidos grasos que están presentes en las grasas de origen animal y en los aceites vegetales. Se trata de moléculas hidrófobas o anfílicas constituidas principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, y que tienen una densidad menor que la del agua. Los lípidos pueden estar en estado sólido a temperatura ambiente (25 °C), como en el caso de las ceras, o líquido, como en el caso de los aceites.
- 50 **[0043]** El término «fosfolípido» se refiere a los lípidos que tienen un grupo fosfato, especialmente los fosfoglicéridos. En la mayoría de los casos, los fosfolípidos comprenden un extremo hidrófilo formado por el grupo fosfato opcionalmente sustituido y dos extremos hidrófobos formados por cadenas de ácidos grasos. Entre los fosfolípidos, en particular se puede hacer mención de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y esfingomielina.
- 55 **[0044]** El término «lecitina» se refiere a fosfatidilcolina, es decir, un lípido formado a partir de una colina, un fosfato, un glicerol y dos ácidos grasos. Más generalmente, abarca los fosfolípidos extraídos de organismos vivos, de origen vegetal o animal, en la medida en que están en su mayor parte constituidos por fosfatidilcolina. Tales lecitinas constituyen generalmente mezclas de lecitinas que llevan diferentes ácidos grasos.

**[0045]** La expresión «ácido graso» se utiliza para denotar los ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una cadena carbonosa compuesta por al menos 4 átomos de carbono. Los ácidos grasos naturales tienen una cadena carbonosa de entre 4 y 28 átomos de carbono (generalmente un número par). La expresión ácido graso de cadena larga se utiliza para una longitud de entre 14 y 22 átomos de carbono, y ácido graso de cadena muy larga si tiene más de 22 átomos de carbono.

**[0046]** Se entiende que el término «tensioactivo» se refiere a compuestos con una estructura anfílica, que les confiere una afinidad particular por las interfases de tipo aceite/agua y agua/aceite, lo que hace que sean capaces de reducir la energía libre de dichas interfases y estabilizar los sistemas dispersos.

**[0047]** Se entiende que el término «cotensioactivo» se refiere a un tensioactivo que actúa junto con otro tensioactivo con el fin de reducir aún más la energía de la interfase.

## 15 [Descripción de la invención]

### [Emulsión]

**[0048]** De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a una formulación de verde de indocianina en forma de una nanoemulsión, que comprende al menos una fase acuosa y al menos una fase oleosa, en la que la fase oleosa comprende verde de indocianina, al menos un lípido anfílico y al menos un lípido de solubilización.

**[0049]** La emulsión es, por lo tanto, una emulsión del tipo oleoacuosa. Puede ser sencilla o múltiple, especialmente en el caso en el que comprenda una segunda fase acuosa en la fase dispersa.

**[0050]** La emulsión se caracteriza porque la fase oleosa comprende, además del fluoróforo, al menos un lípido anfílico y al menos un lípido de solubilización.

**[0051]** La emulsión de acuerdo con la invención comprende además, en la fase oleosa, uno o más lípidos anfílicos cuyo objetivo es estabilizar la emulsión.

**[0052]** Tales lípidos anfílicos comprenden una parte hidrófila y una parte lipófila. Por lo general, se eligen entre compuestos en los que la parte lipófila comprende una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada, que tiene entre 8 y 30 átomos de carbono. Se pueden elegir entre fosfolípidos, colesterol, lisolípidos, esfingomielinas, tocoferoles, glucolípidos, estearilaminas, cardiolipinas de origen natural o sintético; moléculas compuestas por un ácido graso unido a un grupo hidrófilo por un enlace éter o un grupo funcional éster, tales como ésteres de sorbitán, por ejemplo monolaurato y monooleato de sorbitán, comercializados con los nombres Span<sup>®</sup> de Sigma; lípidos polimerizados; lípidos conjugados con cadenas cortas de óxido de polietileno (PEG), tales como los tensioactivos no iónicos comercializados con los nombres comerciales Tween<sup>®</sup> de ICI Americas Inc., y Triton<sup>®</sup> de Union Carbide Corp.; ésteres de azúcares tales como mono y dilaurato, mono y dipalmitato, y mono y diestearato de sacarosa; siendo posible que dichos tensioactivos sean usados por sí solos o en mezclas.

**[0053]** El lípido o los lípidos anfílico es/son preferentemente de origen natural y biocompatibles, tales como fosfolípidos y colesterol.

**[0054]** La emulsión de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un lípido de solubilización.

**[0055]** El propósito de este compuesto es solubilizar el lípido anfílico, que es poco soluble, en la fase oleosa de la nanoemulsión.

**[0056]** El lípido de solubilización tiene una afinidad por el lípido anfílico suficiente para permitir su solubilización. Puede ser un aceite o una cera.

**[0057]** El lípido de solubilización comprende glicéridos de ácidos grasos saturados que tienen entre 12 y 18 átomos de carbono.

**[0058]** Se trata de una mezcla de diferentes glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden al menos el 10 % en peso de ácidos grasos C12, al menos el 5 % en peso de ácidos grasos C14, al menos el 5 % en peso de ácidos grasos C16 y al menos el 5 % en peso de ácidos grasos C18.

**[0059]** Se da preferencia a los glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos C8, entre el 0% y el 20 % en peso de ácidos grasos C10, entre el 10% y el 70 % en peso de ácidos grasos C12, entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos C14, entre el 5% y el 30 % en peso de ácidos grasos C16 y entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos C18. El lípido de solubilización es sólido a temperatura ambiente (25 °C).

**[0060]** Los lípidos de solubilización particularmente preferentes son las mezclas de glicéridos semisintéticos que se comercializados con el nombre comercial Suppocire® NC por Gattefossé y aprobados para su inyección en seres humanos.

**[0061]** Los lípidos de solubilización mencionados anteriormente permiten obtener una formulación en forma de nanoemulsión que es ventajosamente estable. Sin ánimo de limitación a una teoría particular, se supone que los lípidos de solubilización mencionados anteriormente permiten obtener gotitas en la nanoemulsión que tienen un núcleo amorfo. El núcleo así obtenido tiene una alta viscosidad interna sin tener cristalinidad. De hecho, la cristalización resulta perjudicial para la estabilidad de la nanoemulsión, ya que generalmente conduce a la agregación de las gotitas y/o a la expulsión de las moléculas encapsuladas a la parte exterior de las gotitas. Por tanto, estas propiedades físicas favorecen la estabilidad física de la nanoemulsión y la estabilidad de la encapsulación de verde de indocianina con el tiempo.

**[0062]** El ICG es preferentemente ICG de calidad médica sin yodo residual.

**[0063]** El ICG se puede utilizar en solución concentrada en un disolvente orgánico adecuado, tal como etanol, DMSO o metanol. Sin embargo, en la aplicación *in vivo* se prefieren los disolventes que son bien tolerados.

**[0064]** Preferentemente, la fase oleosa dispersa de la emulsión de acuerdo con la invención también comprende adicionalmente al menos un aceite.

**[0065]** Se trata preferentemente de un aceite biocompatible. Los aceites biocompatibles se utilizan preferentemente sin modificación química o física antes de la formación de la emulsión.

**[0066]** Los aceites biocompatibles que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención pueden ser de origen natural (vegetal o animal) o sintético. Entre dichos aceites, puede hacerse mención especial a los aceites de origen vegetal, especialmente aceite de soja, aceite de palma, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de semilla de uva y aceite de girasol; aceites de origen animal, especialmente aceites de pescado, aceites sintéticos, especialmente triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos; siendo posible usar dichos aceites por sí solos o en mezclas. Estos aceites pueden ser aceites vírgenes, aceites refinados o aceites interesterificados.

**[0067]** De acuerdo con una forma de realización particularmente preferente de la invención, los aceites se eligen entre los aceites que son poco solubles en agua, es decir, aceites que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) generalmente por debajo de 8 y aún más preferentemente entre 3 y 6, tales como, por ejemplo, el aceite de soja.

**[0068]** Más particularmente preferente es una emulsión en la que la fase oleosa comprende al menos un aceite elegido entre aceite de soja y aceite de linaza.

**[0069]** Por supuesto, la emulsión comprende, además, una fase acuosa continua.

**[0070]** La fase acuosa comprende preferentemente o está constituida sustancialmente por agua o un tampón fisiológicamente aceptable, tal como un tampón fosfato, por ejemplo PBS (solución salina tamponada con fosfato), o una solución de cloruro de sodio.

**[0071]** Sin embargo, la fase acuosa puede contener además agentes que permiten aumentar la viscosidad de la fase continua y facilitar la emulsificación, tales como glicerol.

**[0072]** Ventajosamente, la emulsión de acuerdo con la invención comprende además un cotensioactivo.

**[0073]** El agente cotensioactivo tiene preferentemente al menos una cadena compuesta de unidades de óxido de etileno o de unidades de óxido de etileno y óxido de propileno.

**[0074]** Ventajosamente, el cotensioactivo se elige entre conjugados de polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG-PE), éteres de ácido graso y de polietilenglicol, ésteres de ácido graso y polietilenglicol, y copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno.

5

**[Procedimiento de preparación]**

**[0075]** La formulación descrita anteriormente se puede obtener mediante uno de los procedimientos de emulsificación conocidos, por ejemplo por sonicación.

10

**[0076]** Sin embargo, las formulaciones de la presente invención se obtienen preferentemente por un procedimiento en el que el ICG se introduce en la fase oleosa y no en la solución acuosa.

**[0077]** Este paso permite lograr una encapsulación más eficaz del fluoróforo y, en consecuencia, un mejor rendimiento cuántico de fluorescencia y una mejor estabilidad de la formulación resultante.

15

**[0078]** Por consiguiente, de acuerdo con un segundo aspecto, la invención propone un procedimiento para la preparación de una formulación de verde de indocianina que comprende al menos una fase acuosa y al menos una fase oleosa, procedimiento que preferentemente comprende etapas en las que:

20

(i) se prepara la fase oleosa que comprende al menos un lípido de solubilización, un lípido anfílico e ICG;

(ii) la fase oleosa se dispersa en una fase acuosa bajo una acción de cizallamiento suficiente para formar una nanoemulsión; y

25

(iii) se recupera la nanoemulsión así formada.

**[0079]** La acción de cizallamiento se ejerce preferentemente por sonicación.

**[0080]** Además, es ventajoso preparar la fase oleosa disolviendo todos o algunos de los constituyentes en un disolvente adecuado y, seguidamente, eliminando el disolvente por evaporación.

30

**[0081]** Cuando el compuesto anfílico es soluble con dificultad, puede ser interesante preparar la fase oleosa mezclando los componentes de la fase dispersa y seguidamente disolviendo el compuesto anfílico en el aceite con la ayuda del lípido de solubilización.

35

**[0082]** A continuación, el disolvente orgánico en el que está disuelto el ICG se elimina por evaporación.

**[0083]** Entonces, es posible añadir la fase acuosa preparada mezclando los componentes de la fase continua.

40

**[0084]** La adición de la fase acuosa a la fase oleosa se lleva a cabo preferentemente con calentamiento, de manera que la fase oleosa sea líquida.

**[0085]** La emulsificación se lleva a cabo con un fuerte cizallamiento, por ejemplo por ultrasonicación, con el fin de efectuar la formación de una nanoemulsión.

45

**[0086]** De acuerdo con una realización preferente de la invención, la formulación se puede funcionalizar mediante el injerto de ligandos biológicos o de moléculas de interés en la superficie de la nanoemulsión.

50

**[0087]** El injerto se lleva a cabo preferentemente en los cotensioactivos, que forman parte de la interfase entre la fase continua y la fase dispersa.

**[0088]** El acoplamiento de estas moléculas a los cotensioactivos puede llevarse a cabo ya sea antes de la emulsificación o después de la emulsificación. Después de la emulsificación, es preferente que las reacciones de injerto químico tengan lugar en solución acuosa y a un pH que no sea ni demasiado ácido ni demasiado básico (pH 5-11) de manera que las emulsiones no se desestabilicen. Por consiguiente, la primera variante (injerto antes de la emulsificación) es preferente, en principio, cuando las reacciones de injerto químico sean difíciles de llevar a cabo.

55



**[0089]** Las moléculas de interés que se pueden usar para funcionalizar la emulsión de acuerdo con la invención pueden ser, por ejemplo:

a) ligandos biológicos:

5

i) un ligando de direccionamiento biológico: una entidad biológica (anticuerpo, péptido, sacárido, aptámero, oligonucleótido, etc.) o una entidad química (por ejemplo ácido fólico) que permite el reconocimiento específico de ciertas células (por ejemplo células tumorales, como se describe, por ejemplo, en el artículo de S. Achilefu, *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2004, 3, 393-408) o de ciertos órganos,

10

ii) un ligando biológico que es un marcador de una actividad biológica determinada, por ejemplo una actividad enzimática. Por ejemplo, tales ligandos biológicos pueden ser un péptido escindible por una proteasa determinada, al final del cual se habrá injertado un inhibidor de la fluorescencia del ICG. Este tipo de ligando permite realizar la obtención de imágenes específica de la actividad enzimática de la proteasa, tal y como se documenta en el artículo de C.H. Tung, *Biopolymers*, 2004, 76, 391-403. Otro ejemplo está constituido por un ligando biológico que tiene un puente disulfuro que separa el marcador de un inhibidor de su fluorescencia. Ese ligando biológico permite la obtención de imágenes específica de la internalización de la sonda en una célula, tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente francesa FR 2 888 938;

15

20 b) un agente de furtividad: se trata de una entidad que tiene el efecto de aumentar el tiempo de circulación del ICG en el organismo y de ralentizar su eliminación;

c) un «vector de ensamblaje»: se trata de una entidad que puede permitir el ensamblaje del marcador o marcadores fluorescentes y/o del ligando o ligandos de direccionamiento biológico y/o del agente o agentes de furtividad y/o una o más funciones (por ejemplo, entrega de medicamentos, otra modalidad de obtención de imágenes, función terapéutica).

25

**[0090]** La emulsión puede contener adicionalmente otros agentes para su uso en la aplicación pretendida, tales como:

30

- agentes de obtención de imágenes para otras modalidades de obtención de imágenes tales como la RMN (resonancia magnética nuclear), PET (tomografía por emisión de positrones), SPECT (tomografía computarizada de emisión de fotón único), ecografía, radiografía o tomografía de rayos X; o

35

- moléculas que tienen un efecto terapéutico (por ejemplo, ADN, oligonucleótidos, moléculas químicas, etc.)

**[0091]** Tales agentes se pueden introducir en la fase dispersa o en la fase acuosa de la emulsión, o alternativamente en su superficie, o pueden estar adsorbidas en la fase dispersa mediante un enlace covalente o no covalente.

40

**[0092]** La emulsión resultante tiene en la fase dispersa un diámetro medio comprendido entre 10 y 500 nm, más particularmente entre 20 y 200 nm y lo más particularmente de menos de 100 nm.

45

**[0093]** Sin ánimo de limitación a ninguna teoría, actualmente se supone que probablemente el ICG esté tanto encapsulado dentro de la nanoemulsión como intercalado en su membrana (o cubierta). Dado que el ICG está presente incluso antes de la emulsificación, parece muy poco probable que el ICG se adsorba en la superficie.

**[0094]** La formulación de ICG propuesta tiene una excelente estabilidad con el tiempo y, además, presenta unas buenas propiedades ópticas.

50

**[0095]** Además, permite su funcionalización con un ligando de direccionamiento que resulta de interés para algunas aplicaciones.

#### **[Procedimientos de uso de la emulsión]**

55

**[0096]** La formulación de ICG propuesta se puede usar en particular como agente de diagnóstico.

**[0097]** La estabilidad química, óptica y coloidal, el pequeño diámetro medio de la fase dispersa y el elevado y estable rendimiento cuántico de fluorescencia del ICG en la formulación propuesta lo vuelven particularmente valioso

para la obtención de imágenes de fluorescencia.

**[0098]** En esa aplicación, la emulsión se debe inyectar en el organismo con el fin de que actúe como sonda fluorescente, y la señal emitida será captada por un dispositivo de detección adecuado.

5

**[0099]** Una aplicación importante es la detección de ganglios centinela.

**[00100]** Los procedimientos que se han usado principalmente con fines clínicos en ese campo hasta la fecha son la escintigrafía (medicina nuclear) y la obtención de imágenes con colorante (colorante azul como el azul patente, azul de metileno, etc.) Los marcadores utilizados son en la mayoría de los casos conjugados de albúmina en forma de nanocoloides y en los cuales se ha absorbido un colorante o se ha injertado un quelato de radionúclido, generalmente basado en <sup>99m</sup>Tc. Con el fin de evitar el uso de técnicas de formación de imágenes nucleares, que son difíciles de llevar a cabo en un quirófano, la fluorescencia sería una técnica de elección que es más sensible y cuantificable que las técnicas de tinción.

15

**[00101]** Por consiguiente, la invención también se refiere a una formulación para uso en un procedimiento de diagnóstico que comprende la administración de la formulación mencionada anteriormente a un mamífero. El mamífero es preferentemente un ser humano.

20 **[00102]** La invención se describirá en mayor detalle por medio de los ejemplos y las figuras adjuntas, que muestran:

**Figura 1A:** la densidad óptica a 750 nm de nanoemulsiones de ICG de acuerdo con el ejemplo 1 con una tasa de carga comprendida entre 0  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M antes y después de la diálisis, se determina en un espectrofotómetro CARY 300 SCAN. La ecuación de la línea de correlación lineal antes de la diálisis es  $y=0,2235x-2,8271$ , con un coeficiente de correlación (R) de 0,997; la ecuación después de la diálisis es:  $y=0,0754x+0,0111$  con un R de 0,999. La tasa media de incorporación de ICG a la nanoemulsión es de aproximadamente el 35 %;

**Figura 1B:** la densidad óptica a 750 nm de nanoemulsiones de ICG de acuerdo con el ejemplo 1 con una tasa de carga comprendida entre 0  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M dializadas 10 y 40 días después de su preparación. Después de 10 días, la ecuación de la línea de correlación lineal es:  $y=0,0709x-0,1805$  con un R de 0,983; la ecuación después de 40 días es:  $y=0,0704x-3,7455$  con un R de 0,988. Se estima que la tasa de pérdida del ICG de la nanoemulsión 40 días después de la encapsulación es de aproximadamente el 7 %;

35 **Figura 2A:** los espectros de absorción de ICG en agua, DMSO o formulado en las nanoemulsiones de acuerdo con el ejemplo 1. El ICG se disuelve en agua o en DMSO a una tasa de 7,75 mg/ml. Los espectros de absorción de ICG en agua, en DMSO y encapsulado en las nanoemulsiones (en una concentración final de 1 mM), determinada en un espectrofotómetro CARY 300 SCAN;

40 **Figura 2B:** los espectros de emisión de fluorescencia de las mismas muestras determinados en un espectrofluorímetro PERKIN ELMER LS 50B;

**Figura 3:** un histograma del diámetro medio de la fase dispersa de las emulsiones preparadas según se describe en el ejemplo 1: 10 días (barras negras) y 40 días (barras blancas) después de la diálisis. Las mediciones se llevan a cabo en 1 ml de una solución de PBS 0,1 X a la que se ha añadido un volumen muy pequeño (entre 0,5 y 2 ml) de nanoemulsiones que contienen una cantidad variable de ICG (tasa de carga comprendida entre 0 y 1500  $\mu$ M), por dispersión de luz dinámica en un ZeitaSizer Nano (Malvern Instrument);

**Figura 4A:** un histograma que representa el rendimiento cuántico de fluorescencia F del ICG en solución en DMSO, en agua o encapsulado en nanoemulsiones de acuerdo con el ejemplo 1, directamente después de la diálisis (barras negras), 10 días después de la diálisis (barras rayadas) y 40 días después de la diálisis (barras blancas). El rendimiento cuántico de fluorescencia F se calcula de acuerdo con la fórmula:  $F = F_{ref} \times ((I_{fluo})/(I_{fluo})_{ref}) \times ((1-10^{-Abs})_{ref}/(1-10^{-Abs})) \times (n_{ref}^2/n^2)$ , en la que F es el rendimiento cuántico de fluorescencia de la referencia (ICG en DMSO,  $F = 0,13$ ),  $I_{fluo}$  es la integral de la fluorescencia de la muestra,  $I_{fluo,ref}$  es la integral de la fluorescencia de la referencia, Abs es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación,  $Abs_{ref}$  es la absorbancia de la referencia a la longitud de onda de excitación,  $n_{ref}^2$  es el coeficiente de refracción de la referencia (DMSO),  $n^2$  es el coeficiente de refracción de la muestra. Cabe señalar que el rendimiento cuántico de ICG formula como una nanoemulsión es estable con el tiempo, a diferencia del de ICG en solución en agua;

55

**Figura 4B:** un histograma que representa el rendimiento cuántico  $F$  de ICG en DMSO y de diferentes tipos de ICG (Cardiogreen de Sigma Aldrich o Infracyanine de Serb Laboratoires) formulados como nanoemulsiones con una tasa de carga de  $1000 \mu\text{M}$  (según se describe en el ejemplo 1), calculado de acuerdo con la fórmula dada anteriormente. Es importante señalar que la mejora de las propiedades ópticas del ICG formulado como una nanoemulsión es independiente del tipo de ICG usado;

**Figura 5A:** se muestran los niveles de fluorescencia de ICG en agua y de ICG encapsulado en las nanoemulsiones (según se describe en el ejemplo 1) en una escala logarítmica en función de los intervalos de concentración de las dos soluciones, determinados mediante un dispositivo óptico compuesto por una fuente de luz que emite en la banda de absorción del ICG y una cámara acoplada a un objetivo adecuado. Los intervalos de concentración (que varían entre  $100 \mu\text{M}$  y  $0,01 \mu\text{M}$ ) de ICG en agua y de ICG encapsulado en las nanoemulsiones (con un tasa de carga después de la diálisis de  $350 \mu\text{M}$ ) se preparan, respectivamente, en agua ultrapura y en de cloruro de sodio  $154 \mu\text{M}$ , y se depositan  $10 \text{ ml}$  de cada uno de los puntos de concentración en un pequeño capilar de PTFE que tiene un diámetro de  $1,9 \text{ mm}$ , que se coloca debajo de la cámara para la medición del nivel de fluorescencia;

**Figura 5B:** los niveles de fluorescencia de los capilares que contienen  $2,5 \text{ nmoles}$  de ICG en solución en agua y  $0,5 \text{ nmoles}$  de ICG formulado como nanoemulsiones según lo descrito anteriormente, que se muestran en una escala logarítmica, se miden aproximadamente  $25 \text{ minutos}$  después de la medición mostrada en la figura 5A. Cabe destacar la reducción con el tiempo del nivel de fluorescencia de ICG en el agua y la estabilidad del de ICG encapsulado en las nanoemulsiones;

**Figura 6:** la disminución de la fluorescencia del ICG libre en solución en metanol o encapsulado en las nanoemulsiones en suspensión en PBS ( $10 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH } 7,3$ ), preparado de acuerdo con el ejemplo 1, se mide en una cadena de medición usando un láser de titanio-zafiro [Tsunami, Spectra-Physics, EE. UU.] ( $80 \text{ MHz}$ ,  $100 \text{ femtosegundos}$ ), bombeado por un láser de neodimio-vanadato continuo [Millennia Pro, Spectra-Physics, EE. UU.] ( $532 \text{ nm}$ ,  $5 \text{ W}$ ) y ajustable en términos de longitud de onda entre  $700 \text{ nm}$  y  $100 \text{ nm}$ . Dependiendo del modo de funcionamiento del dispositivo, el láser se inyecta en una fibra óptica multimodo, que se utiliza como fibra de excitación para la muestra a estudiar. Una segunda fibra óptica (para la detección) recoge la fluorescencia emitida o la dispersión del láser a través de un sistema de filtro. La señal se mide mediante un tubo fotomultiplicador [Hamamatsu, Japón] acoplado a una tarjeta de recuento TCSPC [Becker & Hickel, Alemania]. Esta última se activa mediante una porción ( $4 \%$ ) retirada de la señal del láser (tren de impulsos) a través de un fotodiodo rápido (PD) [Becker & Hickel, Alemania] antes de ser inyectada en la fibra óptica. Las mediciones se realizaron usando una longitud de onda de excitación pulsada de  $740 \text{ nm}$ . Las duraciones de fluorescencia  $t$  se obtuvieron posteriormente con ayuda del software SPCLmage (Becker Hickel GmbH) por ajuste mediante una disminución monoexponencial ( $\chi_r^2 = 1,0$ ) de las curvas de disminución de fluorescencia desconvolucionadas de la función de respuesta del instrumento (IRF). Los resultados se recogen en la tabla 2 del ejemplo 1.

**Figura 7A-D:** fotografías de imágenes de fluorescencia del sistema vascular de la rata, según se describe en el ejemplo 2. La fotografía muestra a la luz blanca la zona de la que se han obtenido imágenes con el dispositivo óptico. Se llevó a cabo la disección del cuello de la rata con anestesia gaseosa (isoflurano al  $2 \%$ ) y la carótida aislada se colocó sobre una cánula de disección. Seguidamente, se inyectaron  $200 \text{ ml}$  de una solución, diluida a  $225 \mu\text{M}$ , de ICG formulado como nanoemulsiones (tasa de carga después de la diálisis  $350 \mu\text{M}$ ) como un bolo en la vena caudal. La imagen B muestra la carótida muy poco después de la inyección ( $0,5 \text{ segundos}$  después de la inyección). La imagen C fue tomada  $1,5 \text{ segundos}$  después de la inyección y muestra que la señal fluorescente se hace cada vez más fuerte a medida que pasa el fluoróforo. La imagen D fue tomada  $2,5 \text{ segundos}$  después de la inyección, y muestra una señal fluorescente incluso más fuerte a medida que pasa el fluoróforo así formulado. La imagen E fue tomada  $5 \text{ segundos}$  después de la inyección y muestra que, después de la circulación del ICG encapsulado en las nanoemulsiones por el sistema vascular de los tejidos de la cabeza, se observa una señal fluorescente cada vez más intensa en la vena yugular (flecha blanca). La ligera señal fluorescente emitida posteriormente por los tejidos circundantes podría corresponder a la vascularización de los mismos.

**Figura 8A-B:** imágenes que muestran una superposición entre las imágenes obtenidas con luz blanca y las imágenes de fluorescencia de los ganglios linfáticos caudales (en este caso el ganglio linfático poplíteo aparece representado por las flechas blancas) en el ratón atímico (Nude) después de la inyección intradérmica de ICG en solución acuosa de glucosa al  $5 \%$  (A) o de ICG encapsulado en nanoemulsiones (B). Las imágenes con luz blanca se obtuvieron de acuerdo con el mismo tiempo de integración ( $60 \text{ ms}$ ), mientras que las imágenes de fluorescencia se obtuvieron de acuerdo con diferentes tiempos de integración ( $200 \text{ ms}$  para la imagen A y  $30 \text{ ms}$  para la imagen B).

**Figura 9A-E:** las imágenes obtenidas por obtención de imágenes de fluorescencia de los tumores implantados subcutáneamente dos semanas antes en ratones atímicos (Nude) después de la inyección intravenosa de ICG encapsulado en nanoemulsiones (A, C) o de ICG en solución acuosa de glucosa al 5 % (B, D). Las imágenes A y B se obtienen con el dispositivo óptico sin láser con luz ambiente, mientras que las imágenes C y D se obtienen con el dispositivo óptico apantallado frente a la entrada de toda luz, con excitación láser. La imagen E representa la obtención de imágenes de fluorescencia de los tumores después de la escisión, en la que el tumor extirpado del ratón al que se le había inyectado ICG formulado como nanoemulsiones está a la derecha y el tumor extirpado del ratón al que se le había inyectado ICG en solución acuosa de glucosa al 5 % está a la izquierda.

10 **Figura 10:** dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las nanoemulsiones después de la producción a temperaturas de  $T = 10\text{ }^\circ\text{C}$  y  $T = 60\text{ }^\circ\text{C}$  (ejemplo 6).

**Figura 11a) y b):** termogramas (flujo térmico (W/g) como función de la temperatura en  $^\circ\text{C}$ ) obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las nanoemulsiones después de la producción (a) y después del almacenamiento durante 4 meses a temperatura ambiente (b) utilizando un dispositivo Universal V3.8B TA (ejemplo 6).

**Figura 12:** cambio del tamaño de las gotitas (en nm) de la nanoemulsión como función del tiempo (en días) para las tres nanoemulsiones a  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . Los diamantes representan una nanoemulsión sin lípido de solubilización y que comprende aceite, los triángulos representan una nanoemulsión que comprende una mezcla 50/50 de lípido de solubilización y aceite, y los círculos representan una nanoemulsión sin aceite y que comprende lípido de solubilización (ejemplo 6).

## **EJEMPLOS**

### 25 **EJEMPLO 1**

#### Formulación del ICG en forma de emulsión

30 **[00103]** En un recipiente adecuado se preparó una premezcla constituida por 0,05 g de aceite de soja (Sigma-Aldrich), 0,150 g de glicéridos semisintéticos que se comercializan con el nombre comercial Suppocire<sup>®</sup> NC (Gattefossé) y 0,310 mg y 9,30 mg de ICG (Cardiogreen, Sigma-Aldrich o Infracyanine Serb laboratoires) en solución en dimetilsulfóxido (DMSO), así como 0,100 g de lecitina de soja (enriquecida con 45 % de fosfatidilcolina) comercializada por Lipoïd con el nombre comercial Lipoïd<sup>®</sup> S45.

35 **[00104]** Después de la evaporación del DMSO en vacío, el residuo se calienta a  $50\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$  y la mezcla líquida se mantiene a esa temperatura durante la emulsificación (a temperatura ambiente, la mezcla se convierte en cerosa).

40 **[00105]** La fase continua se preparó mezclando 0,05 g de glicerol, 0,331 g de estearato de polioxietileno que tiene 50 unidades de óxido de etileno comercializado con el nombre comercial Myrj<sup>®</sup> 53 por ICI Americas Inc., y una solución de cloruro de sodio 154 mM hasta completar 1,7 g de mezcla. A continuación, la solución se mantuvo caliente ( $50\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$ ) antes de la emulsificación.

45 **[00106]** A continuación se añadió la solución acuosa a la mezcla de aceite/lecitina. La solución bifásica se pone entonces en contacto con un sonicador AV505<sup>®</sup> equipado con una sonda cónica que tiene un diámetro de 3 mm (Sonics, Newtown) sumergida aproximadamente 1 cm en la solución. La solución se sonicó durante 5 minutos con el sonicador ajustado al 25 % de la potencia máxima, con la siguiente secuencia de impulsos: 10 segundos de sonicación/30 segundos de descanso. Durante la sonicación, la solución se mantuvo a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  en un baño de agua.

50 **[00107]** A continuación la solución se dializó en una solución de cloruro de sodio 154 mM con una membrana de diálisis Spectra/Por<sup>®</sup> con un punto de corte de 12.000 con el fin de eliminar los reactivos que no hubiesen reaccionado.

55 **[00108]** La emulsión resultante se filtra en un filtro de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  con el fin de esterilizarla y eliminar los agregados. Tras ello, la emulsión se puede utilizar directamente después de su dilución como una sonda fluorescente para la formación de imágenes funcionales *in vivo*. La tabla 1 siguiente resume la composición de la formulación obtenida antes de la diálisis.

**Tabla 1:** composición de la formulación del ejemplo 1

		Peso en mg	% en peso
Fase dispersa	Aceite de soja	50	2,5
	Suppocire <sup>®</sup> NC	150	7,5
ICG		0,31-9,3	0,015-0,465
Tensioactivos	Lecitina	100	5
	Myrj 53	331	16,55
Fase acuosa	Glicerol	50	2,5
	Solución de NaCl 154 mM	1319	65,95
Total		2000	100

5 **[00109]** Después de la diálisis, se elimina el exceso de fluoróforo (no formulado en las nanoemulsiones). La tasa media de incorporación de ICG en las nanoemulsiones es del 35 %, como se muestra en la figura 1 A. Por otra parte, la formulación de ICG es muy estable durante al menos 40 días dado que no hay ninguna o muy poca pérdida de fluoróforo 40 días después de la encapsulación, como se muestra en la figura 1B.

10 **[00110]** Las características espectrales del ICG así formulado son idénticas a las del ICG en DMSO, como se muestra en las figuras 2A y 2B y en la tabla 2.

**Tabla 2:** propiedades ópticas del ICG en agua, en metanol, en DMSO y como una nanoemulsión

Fluoróforo	Absorción (nm)	Emisión (nm)	F	t (ps)
ICG en agua	777	802	0,042	-
ICG en metanol	783	809	0,16	
ICG en DMSO	793	817	0,13	460 ± 10
ICG como una nanoemulsión 400 µM	798	820	0,086	530 ± 40

15

**[00111]** La nueva formulación obtenida tiene una estabilidad óptica, coloidal y química muy alta (por lo menos > 40 días) en comparación con la registrada en la literatura (25 días en el documento WO 2003/057259).

20 **[00112]** La emulsión así obtenida tiene un diámetro medio de la fase dispersa, determinado por dispersión de luz (ZeitaSizer Nano, de Malvern Instrument), de 29 nm y ese diámetro no cambia con el tiempo, como se muestra en la figura 3.

25 **[00113]** Aunque el rendimiento cuántico de fluorescencia F del ICG cae ligeramente cuando se encapsula en comparación con el medido en DMSO, sigue no obstante siendo mayor que el medido en agua, como se muestra en la tabla 2 y la figura 4A. Además, el rendimiento cuántico se mantiene estable con el tiempo, a diferencia de lo que ocurre con el ICG libre en agua, como se muestra en la figura 4A, independientemente del tipo de ICG utilizado (Cardiogreen de Sigma Aldrich o Infracyanine de Serb Laboratoires), como se muestra en la figura 4B.

30 **[00114]** Las propiedades ópticas optimizadas permiten reducir el umbral de detección en un dispositivo de medición adecuado, constituido por una fuente de luz que emite en la banda de absorción del ICG con una potencia de excitación del orden de varios mW/cm<sup>2</sup> y una cámara acoplada a un objetivo adaptado a la muestra observada, como se indica en las figuras 5A y 5B.

35 **[00115]** Además, la duración de la fluorescencia t del ICG aumenta cuando está encapsulado, como se muestra en la figura 6 y en la tabla 2. Esta propiedad es muy valiosa, ya que permite considerar el uso de la formulación de acuerdo con la invención en dispositivos de medición con resolución temporal.

**[00116]** Las imágenes de las figuras 7A-7E muestran el valor de la formulación de ICG de acuerdo con la invención para la obtención de imágenes de fluorescencia, en particular.

40

**[00117]** Por consiguiente, a la luz de todas estas propiedades, sería posible comercializar la formulación de acuerdo con la invención en una forma lista para su uso.

**EJEMPLO 2**Formación de imágenes de la vascularización

5 **[00118]** Se procedió a anestesiar a ratas macho de la cepa Sprague Dawley (Harlan France) por inhalación de isoflurano (4 % para la inducción y 2 % para el mantenimiento) y, a continuación, se colocaron bajo un dispositivo de obtención de imágenes. El dispositivo está constituido por: 1) una fuente de luz que emite en la banda de excitación del ICG y cuya potencia de excitación es del orden de varios mW/cm<sup>2</sup> y 2) una cámara CCD acoplada a un objetivo adaptado a la muestra observada. El conjunto está equipado con filtros que permiten evitar la luz de excitación y los brillos y que solo recogen la luz de fluorescencia. A continuación, se lleva a cabo la disección de la región del cuello con el fin de aislar la carótida y la vena yugular. Seguidamente, se inyecta por vía intravenosa una formulación de ICG preparada según se describe en el ejemplo 1 con una tasa de carga de 350 µM después de la diálisis. Después se lleva a cabo la obtención de imágenes de fluorescencia del sistema vascular de esa región, con visualización en primer lugar de la carótida y, a continuación, de la vena yugular, como se muestra en la figura 7. Este sistema de obtención de imágenes de fluorescencia permitiría guiar y/o controlar los movimientos del cirujano durante una intervención quirúrgica.

**EJEMPLO 3**

20 Imágenes de ganglios centinelas

**[00119]** Se procedió a anestesiar a ratones hembra de la cepa Nude (Janvier) por inhalación de isoflurano (4 % para la inducción y 2 % para el mantenimiento) y, a continuación, se colocaron bajo un dispositivo de obtención de imágenes de fluorescencia descrito anteriormente.

**[00120]** Se inyectan 10 µl de una formulación de ICG (0,5 nmol inyectados) preparada según se describe en el ejemplo 1 o de ICG disuelto en agua con glucosa (1 nmol inyectado) por vía intradérmica en la pata trasera derecha.

30 **[00121]** A continuación se realizó una monitorización temporal de los ratones que habían recibido las inyecciones mediante obtención de imágenes de fluorescencia. Se debe indicar que el trazador de ICG formulado como nanoemulsiones se acumula rápidamente (a partir de los primeros 5 minutos) y preferentemente en los ganglios linfáticos próximos al lugar de la inyección. Además, el uso del trazador de ICG formulado como nanoemulsiones permite acceder a una detección más sensible de los ganglios linfáticos, en comparación con los resultados obtenidos utilizando ICG formulado en agua con glucosa al 5 %, como se muestra en las figuras 8A y 8B.

**EJEMPLO 4**Obtención de imágenes de tumores

40 **[00122]** Se inyectaron células tumorales Ts/Apc de origen murino por vía subcutánea (10<sup>6</sup> células) en la espalda de ratones hembra de la cepa Nude (Janvier), y se monitorizó el crecimiento del tumor en la región del lugar de la inyección durante todo el período previo a las sesiones de obtención de imágenes.

45 **[00123]** Dos semanas más tarde, los ratones tenían un tumor cerca del lugar de la inyección y se procedió entonces a anestesiarlos por inhalación de isoflurano (4 % para la inducción y 2 % para el mantenimiento) y, a continuación, se colocaron bajo un dispositivo de obtención de imágenes descrito anteriormente.

50 **[00124]** En cada caso, se inyectó un volumen de 200 µl de una formulación de ICG (7 nmoles) preparada según se describe en el ejemplo 1 o de una solución de ICG en agua con glucosa al 5 % (7 nmoles) por vía intravenosa en 3 de los ratones. Un día más tarde, se llevó a cabo una nueva sesión de obtención de imágenes en los ratones anestesiados (isoflurano, 2,5 %) y se observó una mejor detección del tumor por obtención de imágenes de fluorescencia para la formulación de ICG tal como se ha descrito en el ejemplo 1, según se ilustra en la figura 9.

55 **[00125]** Por consiguiente, la formulación de ICG como nanoemulsiones constituye un mejor trazador fluorescente que el ICG en solución acuosa de glucosa, en particular, para la visualización de tumores.

**EJEMPLO 5**

Emulsión con cRGD injertado

**[00126]** En un recipiente adecuado equipado con medios de agitación, se prepara PE-PEG(5000)-maleimida mezclando 25 mg de fosfatidiletanolamina (PE, Sigma) y 100 mg de SCM-PEG 5000-maleimida (Creative Biochem) en 1 ml de metanol con 5  $\mu$ l de trietilamina, y la agitación se lleva a cabo a temperatura ambiente.

**[00127]** Después de 3 horas, el disolvente y la trietilamina se eliminan por evaporación y luego el producto resultante, PE-PEG (5000)-maleimida, se recoge en 1 ml de metanol.

10 **[00128]** Se prepara una emulsión que encapsula el ICG como en el ejemplo 1 pero, además de los 125 mg de aceite de soja, se añaden a la fase dispersa 375 mg de Suppocire, 350 mg de lecitina y 1,5 mg de fluoróforo como anteriormente, 25 mg de PE-PEG(5000)-maleimida preparada previamente.

15 **[00129]** El péptido cíclico dirigido contra las integrinas  $\alpha$ v $\beta$ 3 sobreexpresadas en la superficie de las células endoteliales, c(RGDf[ $\epsilon$ -S-acetiltioacetil])K comercializado por Ansynth Service BV (Países Bajos) y denominado cRGD en lo sucesivo, tiene un grupo tiol protegido en forma de un ácido mercaptoacético. Se desprotegen 2 mg de péptido diluido en agua (500  $\mu$ l) mediante la adición de 4  $\mu$ l de TCEP 0,5 M (Sigma) 30 minutos antes del acoplamiento con la nanoemulsión.

20 **[00130]** Para la funcionalización, la emulsión se diluye en un tampón HEPES/EDTA; pH 7,4, y luego se añade la solución del péptido cRGD. La mezcla de reacción se mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Al final de la reacción se añaden 4 moles de 2-mercaptoetanol con el fin de desactivar cualquier grupo maleimida que no haya reaccionado con el péptido.

25 **[00131]** A continuación la solución se dializó en PBS con una membrana de diálisis Spectra/Por<sup>®</sup> con un punto de corte de 12.000 con el fin de eliminar los reactivos que no hubiesen reaccionado. La emulsión obtenida anteriormente se filtra en un filtro de 0,22  $\mu$ m para eliminar los agregados y también para esterilizarla. Tras ello, la emulsión se puede utilizar directamente después de su dilución como una sonda fluorescente para la formación de imágenes funcionales *in vivo*.

30

**EJEMPLO 6**Demostración de la estabilidad de la nanoemulsión

35 **[00132]** Los siguientes experimentos se llevaron a cabo con el fin de demostrar la estabilidad conferida a las nanoemulsiones por el lípido de solubilización.

**EJEMPLO 6a: Demostración de la alta viscosidad interna de las gotitas por RMN**

40 **[00133]** Se preparó una nanoemulsión que comprende 255 mg de Suppocire<sup>®</sup> NC (Gattefossé) (lípido de solubilización), 85 mg de aceite de soja (Sigma Aldrich) (aceite), 345 mg de Myrj52<sup>®</sup> (ICI Americas Inc.) (cotensioactivo), 65 mg de Lipoid<sup>®</sup> s75 (lecitina, lípido anfílico) y un tampón de fosfato (PBS) siguiendo el protocolo del ejemplo 1.

45 **[00134]** Se llevaron a cabo análisis de la nanoemulsión a 10  $^{\circ}$ C y 60  $^{\circ}$ C mediante resonancia magnética nuclear de protón. Los picos asociados con los componentes básicos de las gotitas de la nanoemulsión (aceite/lípido de solubilización y lípidos anfílicos) (0,9; 1,5; 1,6; 2,0; 2,2; 4,1; 4,2 ppm) observados en los espectros de RMN <sup>1</sup>H aumentan con respecto a la referencia (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico DSS a 0 ppm), tanto más puesto que la temperatura es baja, lo que muestra la alta viscosidad interna de las gotitas. Los picos asociados con el cotensioactivo Myrj53<sup>®</sup> (3,7 ppm) no aumentan en absoluto, lo que indica que el cotensioactivo permanece en la superficie de las gotitas, estando las cadenas de polioxietileno disueltas en el tampón acuoso (figura 10).

50

**EJEMPLO 6b: Demostración de la ausencia de cristalización en las gotitas mediante calorimetría diferencial de barrido**

55

**[00135]** Se preparó una nanoemulsión que comprende 150 mg de Suppocire<sup>®</sup> NC (Gattefossé) (lípido de solubilización), 50 mg de aceite de soja (Sigma Aldrich) (aceite), 228 mg de Myrj53<sup>®</sup> (ICI Americas Inc.) (cotensioactivo), 100 mg de Lipoid<sup>®</sup> s75 (lecitina, lípido anfílico) y un tampón de fosfato (PBS) siguiendo el protocolo del ejemplo 1.

**[00136]** Los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido de la nanoemulsión después de la preparación y después del almacenamiento durante 4 meses a temperatura ambiente muestran que no se observa ningún pico de fusión, ya sea después de la producción o después de un almacenamiento a temperatura ambiente durante 4 meses, lo que indica que las gotitas no han cristalizado (figura 11).

**EJEMPLO 6c: Demostración de la influencia de la composición de las nanoemulsiones en su estabilidad física**

10 **[00137]** Se prepararon tres nanoemulsiones que comprenden 228 mg de Myrj53<sup>®</sup> (ICI Americas Inc.) (cotensioactivo), 100 mg de Lipoid<sup>®</sup> s75 (lecitina, lípido anfílico), 1600 ml de tampón de fosfato (PBS), Suppocire<sup>®</sup> NC (Gattefossé) (lípido de solubilización) y aceite de soja (Sigma Aldrich) (aceite) en las cantidades especificadas en la tabla 3 siguiendo el protocolo del ejemplo 1.

15 Tabla 3: cantidades de Suppocire<sup>®</sup> NC y aceite de soja en las nanoemulsiones.

Nanoemulsión	NC0	NC50	NC100
Suppocire <sup>®</sup> NC	0	100 mg	200 mg
Aceite de soja	200 mg	100 mg	0

20 **[00138]** Se llevó a cabo una prueba de estabilidad acelerada a 40 °C en las tres nanoemulsiones obtenidas. La monitorización del tamaño/polidispersidad de las nanoemulsiones a lo largo del tiempo mostró el efecto estabilizante del lípido de solubilización. Mientras que el tamaño de las nanoemulsiones sin lípido de solubilización aumenta considerablemente después de casi 170 días a 40 °C, las nanoemulsiones que contienen lípidos de solubilización no presentan ninguna variación significativa en el tamaño de la gota (figura 12). Los resultados muestran que la adición de lípido de solubilización a la composición de las nanoemulsiones confiere una mejor estabilidad física a las gotitas y a la nanoemulsión.

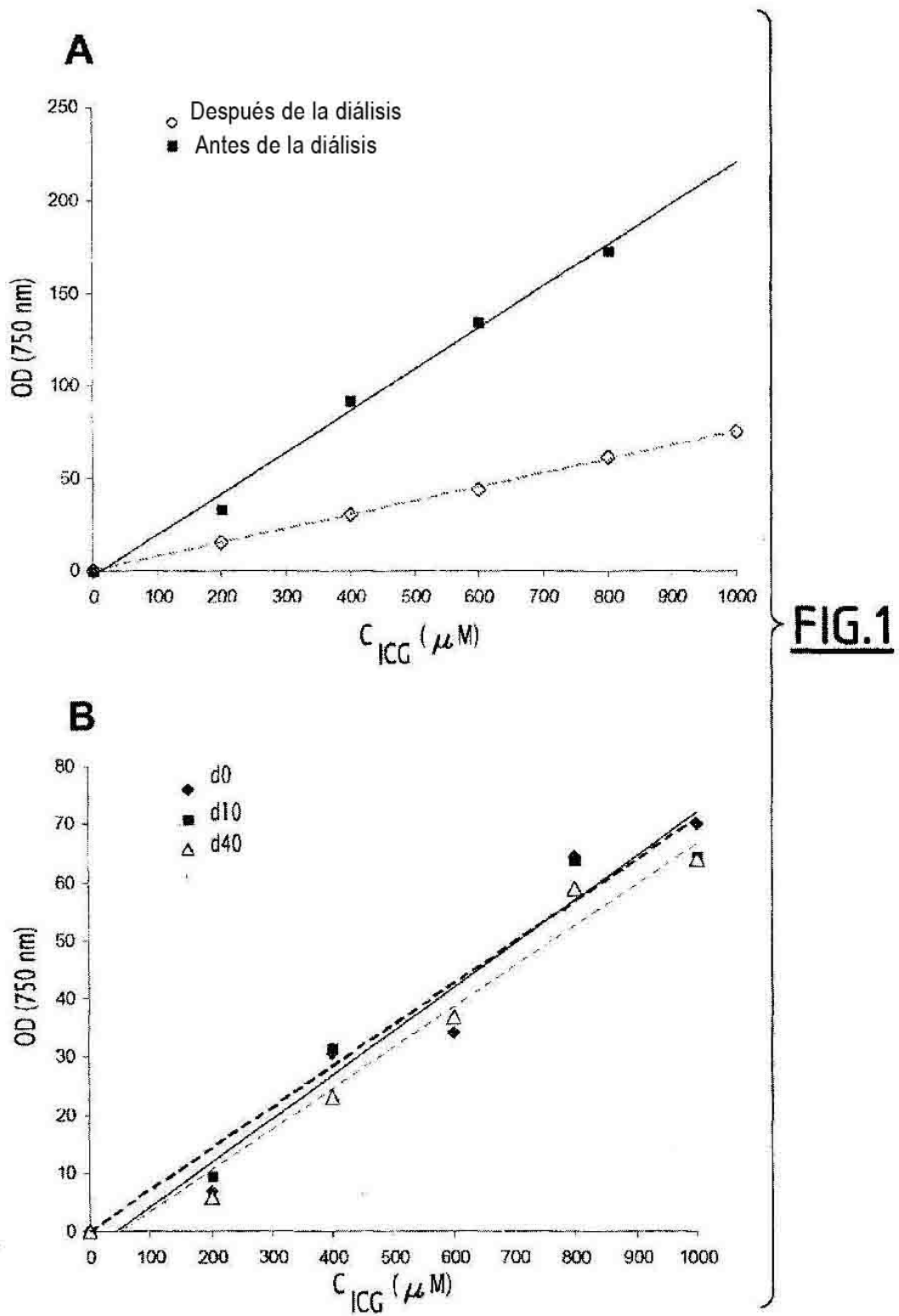
25

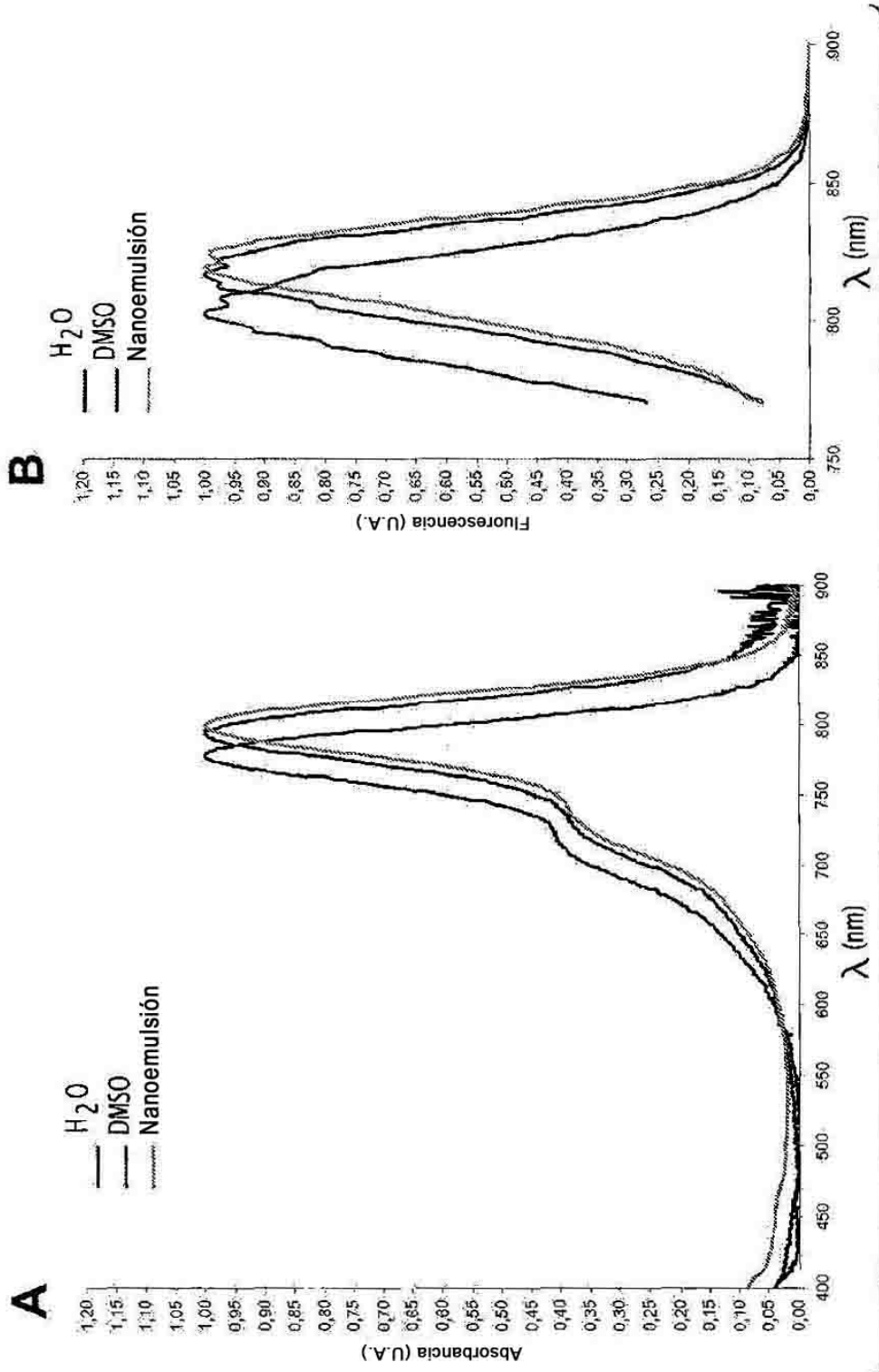


**REIVINDICACIONES**

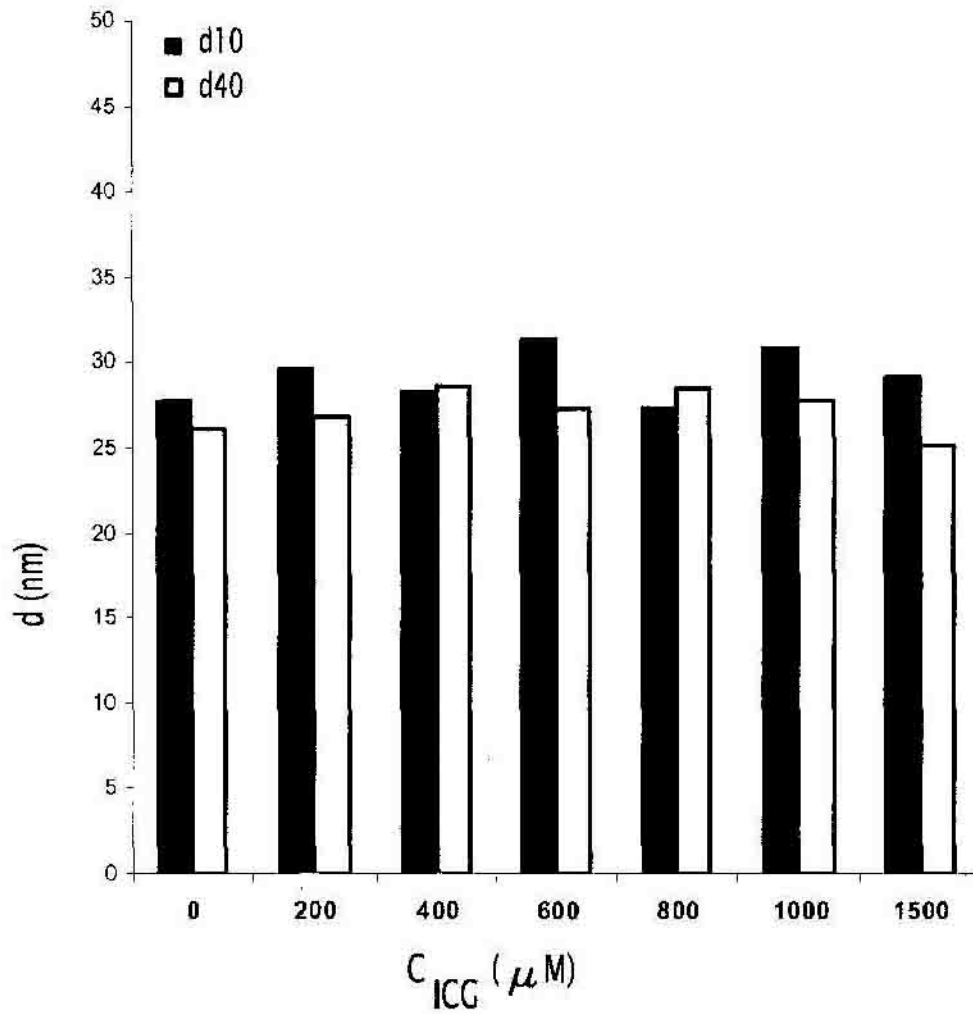
1. Formulación de verde de indocianina en forma de una nanoemulsión, que comprende una fase acuosa continua y al menos una fase oleosa dispersa en la que el tamaño medio de la fase dispersada es menor de 1 5 micrómetro y en la que la fase oleosa comprende:
- verde de indocianina,
  - al menos un lípido anfílico, y
- 10 - al menos un lípido de solubilización que es sólido a 25 °C y consiste en una mezcla de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprende:
- al menos el 10 % en peso de ácidos grasos C12,
- 15 - al menos el 5 % en peso de ácidos grasos C14,
- al menos el 5 % en peso de ácidos grasos C16 y
- 20 - al menos el 5 % en peso de ácidos grasos C18..
2. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el al menos un lípido de solubilización consiste en una mezcla de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprende:
- 25 - entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos C8;
  - entre el 0 % y el 20 % en peso de ácidos grasos C10,
  - entre el 10 % y el 70 % en peso de ácidos grasos C12,
- 30 - entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos C14,
- entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos C16, y
- 35 - entre el 5 % y el 30 % en peso de ácidos grasos C18.
3. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el lípido anfílico es un fosfolípido.
- 40 4. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la fase oleosa comprende además al menos un aceite.
5. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el aceite tiene un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) comprendido entre 3 y 6.
- 45 6. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la fase oleosa comprende al menos un aceite elegido entre aceite de soja y aceite de linaza.
7. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en
- 50 la que la fase acuosa comprende además un cotensioactivo.
8. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el cotensioactivo comprende al menos una cadena compuesta de unidades de óxido de etileno o de unidades de óxido de etileno y óxido de propileno.
- 55 9. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el cotensioactivo se elige entre conjugados de polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG-PE), éteres de ácido graso y de polietilenglicol, ésteres de ácido graso y polietilenglicol, y copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno.

10. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la fase continua de la emulsión comprende un tampón fisiológicamente aceptable.
11. Procedimiento para la preparación de una formulación de verde de indocianina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, procedimiento que comprende etapas en las que:
- (i) se prepara la fase oleosa que comprende ICG, un lípido anfílico y al menos un lípido de solubilización;
  - (ii) la fase oleosa se dispersa en una fase acuosa bajo una acción de cizallamiento suficiente para formar una nanoemulsión; y
  - (iii) se recupera la nanoemulsión así formada.
12. Procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la acción de cizallamiento se ejerce por sonicación.
13. Procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que la fase oleosa se prepara disolviendo todos o algunos de los constituyentes en un disolvente adecuado y, seguidamente, eliminando el disolvente por evaporación.
14. Agente de diagnóstico que comprende una formulación de verde de indocianina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
15. Formulación de verde de indocianina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un procedimiento de diagnóstico.

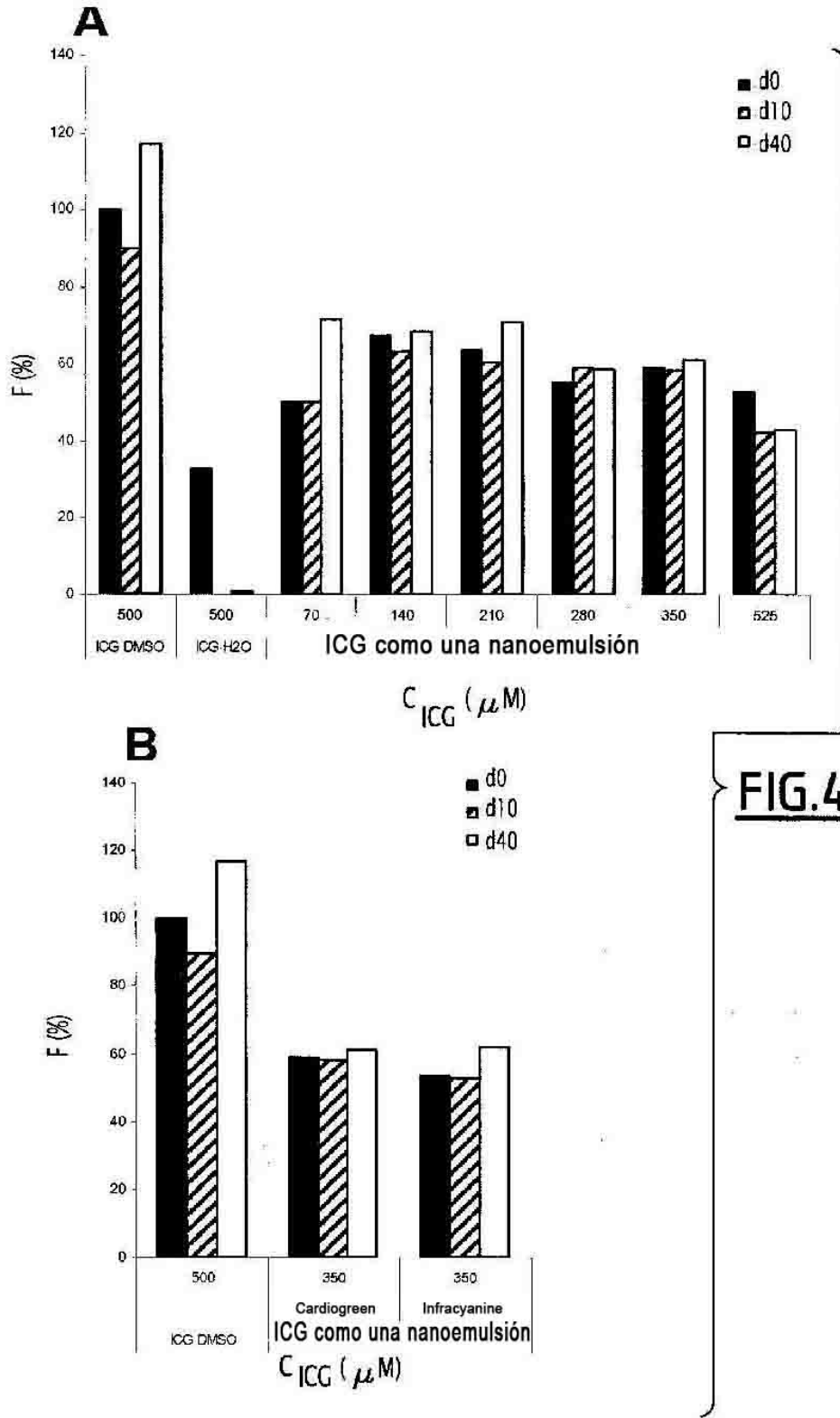


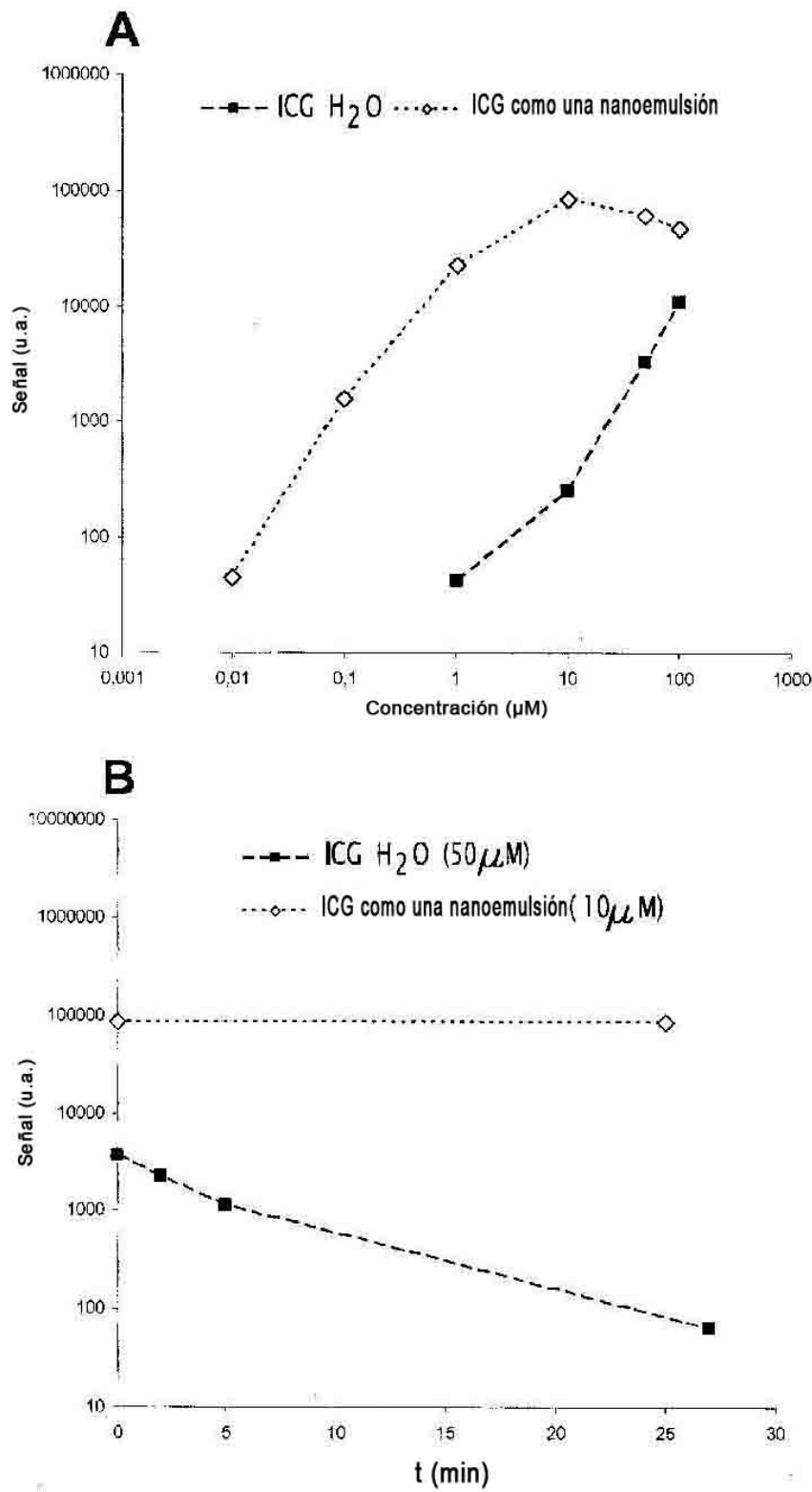


**FIG. 2**

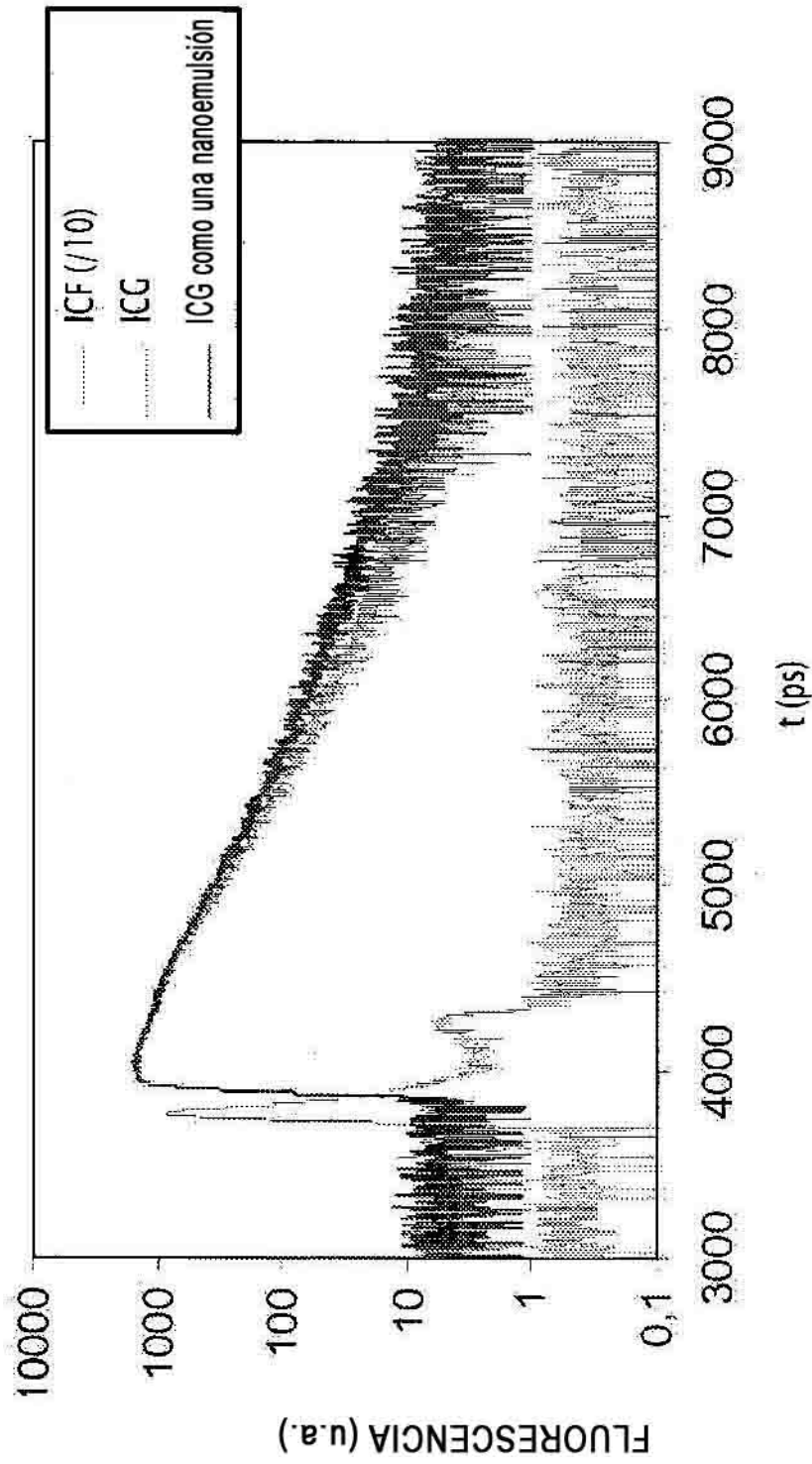


**FIG.3**



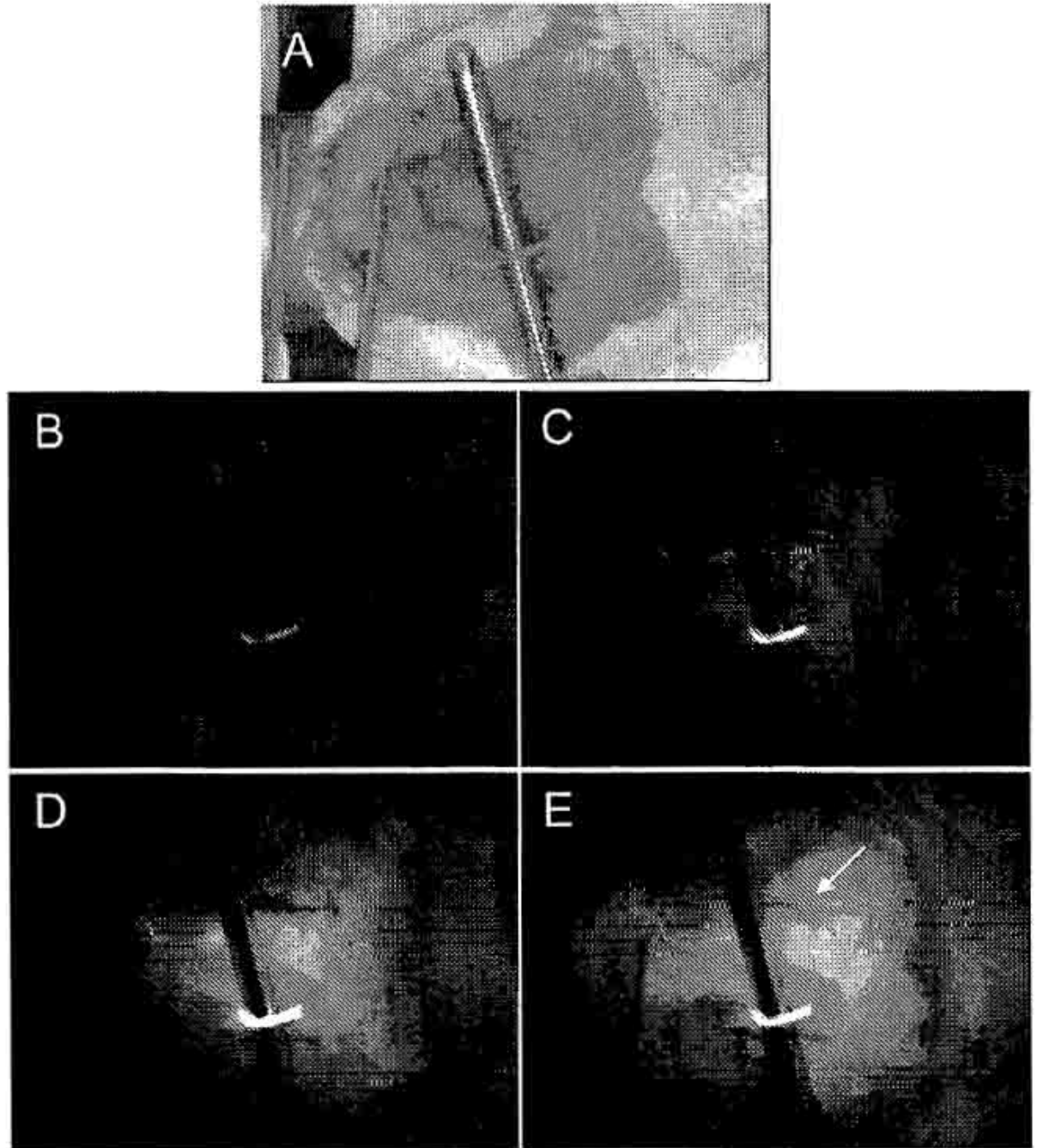


**FIG.5**

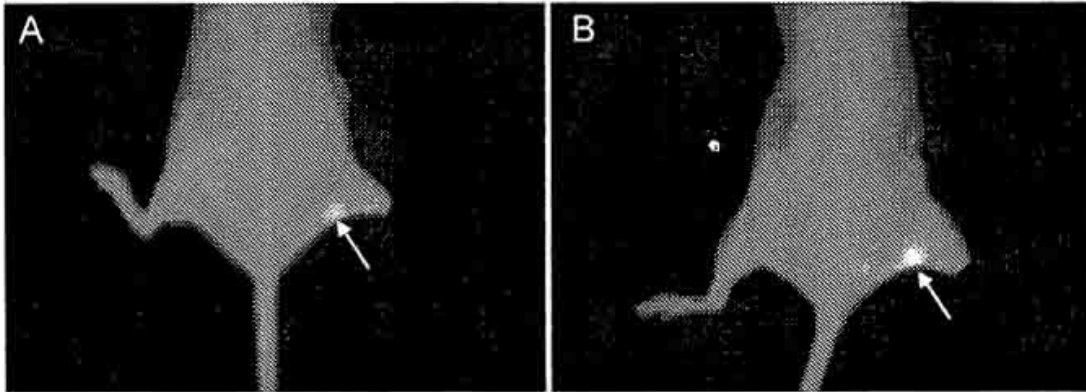


**FIG.6**

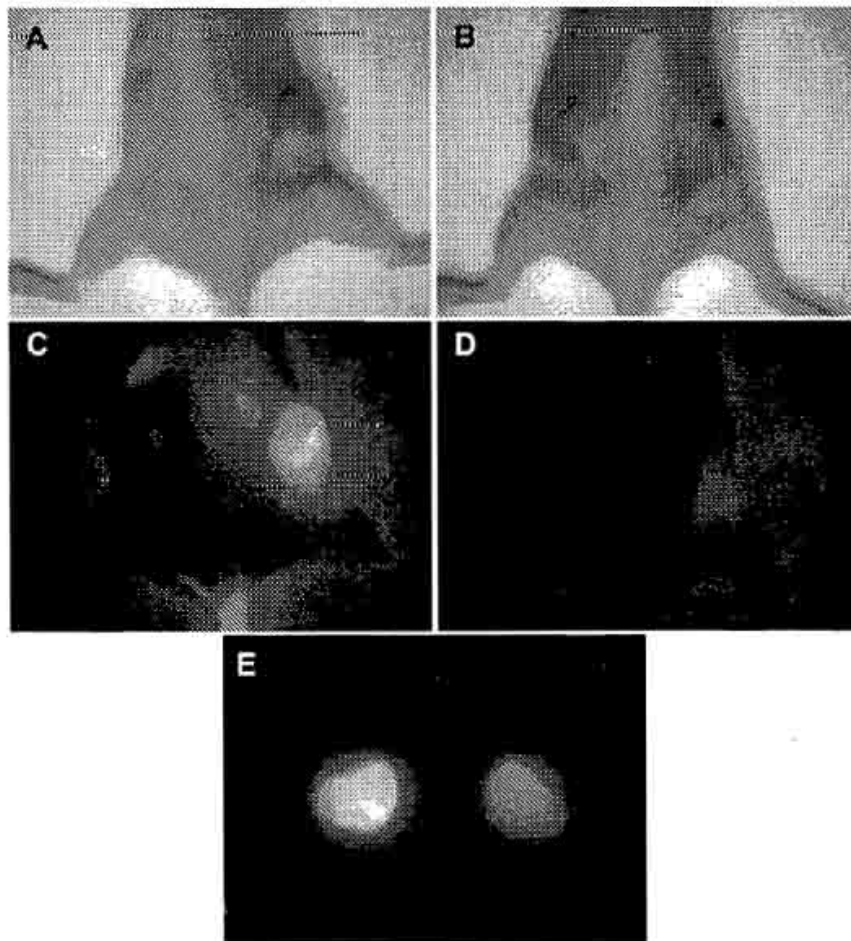




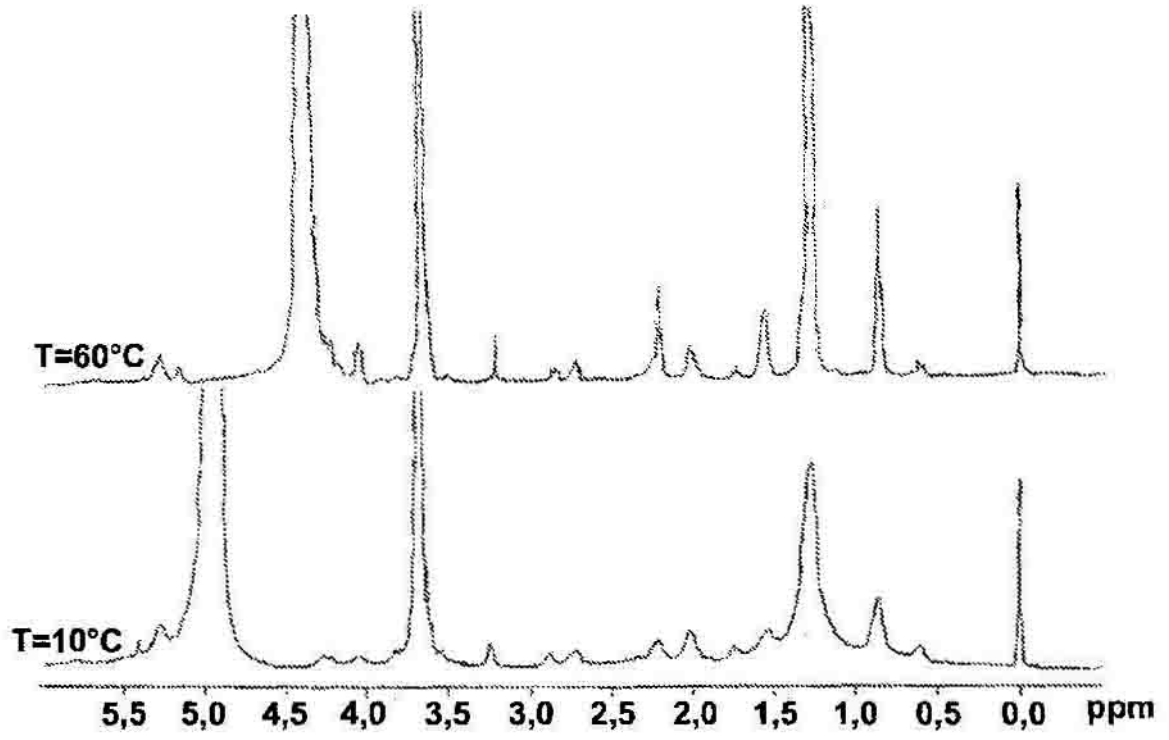
**FIG.7**



**FIG.8**

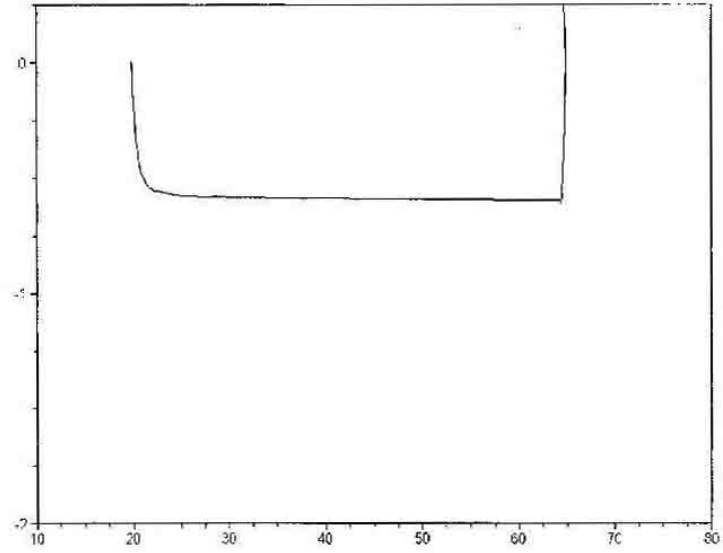


**FIG.9**

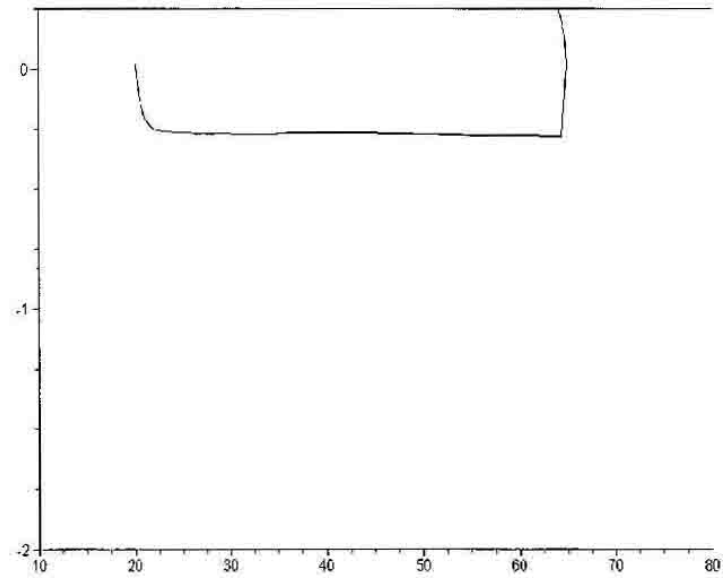


**FIG.10**

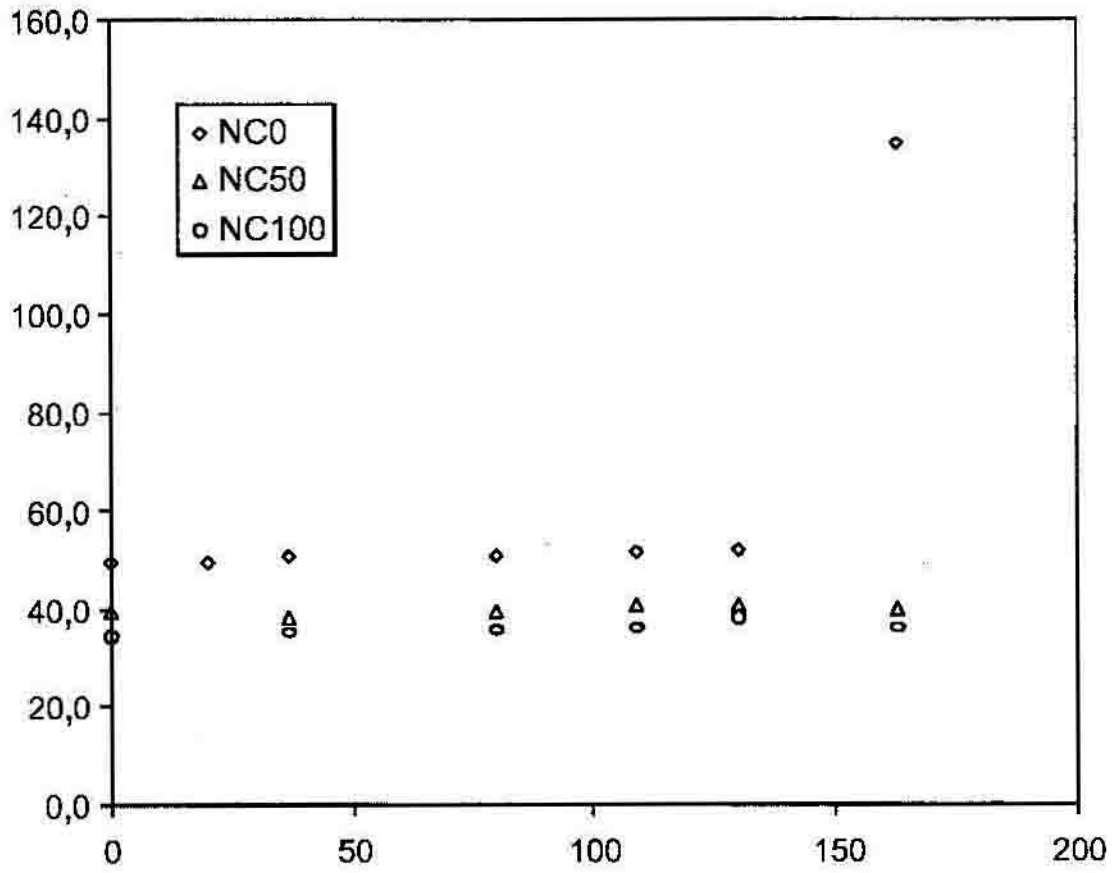
**A**



**B**



**FIG.11**



**FIG.12**