

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 942**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2008 E 08804155 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2200654**

54 Título: **Sustancias diagnósticas para un análisis por formación de imágenes óptica sobre la base de formulaciones de nanopartículas**

30 Prioridad:

14.09.2007 EP 07116409

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

01.09.2014

73 Titular/es:

**MIVENION GMBH (100.0%)
ROBERT-KOCH-PLATZ 4
10115 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

BAHNER, MALTE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 488 942 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

Sustancias diagnósticas para un análisis por formación de imágenes óptica sobre la base de formulaciones de nanopartículas.

5 La presente invención se refiere a la provisión de formulaciones de nanopartículas que comprenden un copolímero en bloque de PEG-alquilo y un colorante fluorescente de infrarrojo cercano (IRC) según se define en las reivindicaciones, la preparación de dichas formulaciones de nanopartículas, a composiciones farmacéuticas que comprenden las formulaciones de nanopartículas de la presente invención, así como a su utilización como medio de contraste.

10 Actualmente la utilización de procedimientos de formación de imágenes desempeña un papel decisivo en el diagnóstico, la terapia y la profilaxis de enfermedades. Se llevan a cabo más de 300 millones de análisis por formación de imágenes en medicina clínica cada año. Algunos procedimientos, tales como la tecnología de ultrasonidos o el análisis basado en rayos X, que resultan fáciles de llevar a cabo desde un punto de vista técnico, constituyen la mayoría de estos análisis. Otro procedimiento que resulta fácil de llevar a cabo desde el punto de vista técnico es la formación de imágenes óptica.

15 La formación de imágenes óptica es un procedimiento de formación de imágenes diagnósticas bien establecido. Aunque se utiliza luz blanca para cribar órganos (diafanoscopia) en la variación más simple de este procedimiento, los procedimientos técnicamente más sofisticados utilizan luz con propiedades espectrales claramente definidas. De esta manera, pueden reducirse las señales de fondo no específicas, incrementando simultáneamente la profundidad de penetración de la luz diagnóstica. Ambos parámetros influyen significativamente sobre la precisión diagnóstica de la formación de imágenes óptica.

20 Otra posibilidad de mejora de la especificidad y sensibilidad de la formación de imágenes óptica es la utilización de colorantes fluorescentes. Los diversos colorantes fluorescentes diagnósticos han estado disponibles durante aproximadamente tres a cuatro décadas. La clase de sustancias de los colorantes polimetina, en particular los colorantes cianina, resulta particularmente importante a este respecto. El verde indocianina (VIC) es un colorante fluorescente conocido que se utiliza ampliamente en la formación de imágenes óptica. El campo principal de aplicación del VIC es la angiografía fluorescente en oftalmología y en cirugía vascular. La utilización de VIC permite la representación de los vasos. De esta manera, el médico es capaz, por ejemplo, de detectar la nueva formación de vasos patológicos, lo que indica una enfermedad. Otra aplicación muy importante es la cirugía vascular. Mediante un colorante fluorescente puede verificarse si determinadas cirugías plásticas en un vaso presentaban los resultados deseados. Por ejemplo, en el caso de que un medio de contraste inyectado intravenosamente se escapa en una localización determinada del vaso, indica claramente al cirujano que la operación no ha tenido éxito. El VIC resulta adecuado para estas aplicaciones ya que no sale del lecho vascular y se concentra en el espacio extravascular ya que se encuentra completamente unido a las proteínas plasmáticas.

25 Sin embargo, debido a la rápida eliminación del VIC de la circulación, la intensidad de la señal diagnóstica disminuye rápidamente (Photochem. Photobiol. 72:392, 2000). De esta manera, el médico no puede representar fiablemente los vasos más pequeños a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado. Otra desventaja de VIC son sus pobres propiedades de solubilidad. Por una parte, la fuerte tendencia de las moléculas de VIC a formar agregados de moléculas interfiere con la preparación de una solución completa de la sustancia que debe administrarse. Otra desventaja es la actividad fluorescente reducida causada por las moléculas agregadas de VIC (Microvascular Res. 55, 1998; Survey Ophthalmol. 45:15, 2000). Todavía otra desventaja de VIC es la inestabilidad de la solución farmacéutica del principio activo. La desventaja de la descomposición del principio activo en solventes acuosos también se observa en otros principios activos de la clase de los colorantes polimetina. Esta propiedad desventajosa evita que proporcione una solución acuosa para la inyección, lo que supone costes de producción incrementados.

30 El experto en la materia conocerá varias maneras de superar las desventajas del frecuentemente utilizado VIC. En primer lugar, la síntesis de nuevos colorantes fluorescentes con propiedades mejoradas es conocida en la técnica. La síntesis de nuevos colorantes fluorescentes ha conducido a principios activos con propiedades de solubilidad mejoradas y un rendimiento cuántico de fluorescencia más alto que los de VIC. Sin embargo, todas las sustancias conocidas presentan la tendencia a dejar el sistema vascular tras un determinado periodo de tiempo tras la inyección y a concentrarse en el espacio extravascular (Acad. Radiol. 13:4, 2006; J. Fluoresc. 15:443, 2005). El proceso de extravasación se inicia incluso tan sólo un minuto tras la inyección intravenosa. Uno de los motivos para este comportamiento es la unión incompleta a las proteínas plasmáticas. La extravasación de VIC se evita mediante una unión completa a las proteínas plasmáticas.

35 Los colorantes fluorescentes con la tendencia a abandonar el sistema vascular conducen a un incremento de la señal fluorescente en el tejido extravascular. Esto resulta en un deterioro de la proporción de señal a fondo en comparación con VIC, aunque el rendimiento cuántico fluorescente de las sustancias conocidas ha sido mejorado.

40 Otro método para proporcionar nuevos colorantes fluorescentes con propiedades mejoradas en comparación con VIC conocido por el experto en la materia es la síntesis de conjugados de colorante-proteína (Technol. Cancer Res.

Treat. 3:393, 2004). Es conocido que el acoplamiento con una proteína de peso molecular superior a 70 kDa o la generación de estos pesos moleculares mediante la conjugación de proteínas con polietilenglicoles (Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:1261-77, 2003), reduce la eliminación renal en un grado muy elevado. De esta manera, lo expuesto anteriormente resulta directamente en un periodo de circulación ampliado. Sin embargo, este procedimiento conlleva nuevas desventajas en comparación con VIC. Una desventaja es el riesgo incrementado de efectos no deseados debido a la utilización adicional de proteínas. Es conocido que proteínas tales como las albúminas o las inmunoglobulinas, que se utilizan como parejas de acoplamiento, pueden conducir a una respuesta inmunitaria incrementada. Debido a que los procedimientos diagnósticos requieren un grado elevado de seguridad del fármaco, no resulta preferida la utilización de conjugados de colorante fluorescente-proteína. Los costes de producción significativamente más altos de un conjugado de colorante fluorescente-proteína en comparación con VIC constituyen otra desventaja.

La preparación de composiciones farmacéuticas modificadas con el objetivo de obtener propiedades mejoradas de VIC también es conocida. Se describen diversas composiciones farmacéuticas en Photochem. Photobiol. 71:347, 2000 (Rajagopalan *et al.*), documento WO 2007/025768 (Fischer *et al.*), Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: Biodistribution in healthy mice, Int. J. Pharm. 278:93-301, 2004; Saxena V. *et al.*, Enhanced photo-stability, thermal stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems, J. Photochem. Photobiol. B. 74:29-38, 2004, documento WO 2004/064751.

La patente US nº 6.424.857 menciona derivados de PEG-alquilo, tales como éteres de PEG con residuos alquilo en un método de generar información de un cuerpo animal humano o no humano vivo mediante la administración de un material fisiológicamente tolerable capaz de absorber, dispersar o emitir luz a una longitud de onda comprendida en el intervalo de entre 300 y 1.300 nm, sometiendo por lo menos una parte de dicho cuerpo a irradiación de ultrasonidos, detectar luz en el intervalo de longitudes de onda de entre 300 y 1.300 nm de dicha parte de dicho cuerpo y la manipulación de la luz detectada para generar dicha información.

El documento US2005/214378 enseña nanopartículas lipídicas con componentes núcleo y cubierta que constituyen la nanopartícula, con surfactantes lipófilos e hidrófilos y una diversidad de ingredientes adicionales formados mediante técnicas de emulsión.

El documento US2006/140865 se refiere a un portador nanomicelar utilizado en la detección de imágenes en el infrarrojo cercano, en el que el portador incluye nanomicelas que comprenden una pluralidad de copolímeros en bloque (polietilenglicol-policaprolactona).

El documento WO98/52609 proporciona un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia sonodinámica en la que se administra un agente sensibilizador en dicho cuerpo y dicho cuerpo se expone a ultrasonidos para conseguir un efecto citopatogénico en un sitio en el mismo, en el que dicho agente sensibilizador es una sustancia fisiológicamente tolerable que es capaz de incrementar la eficacia citopatogénica de dicha terapia sonodinámica. En dicho documento se describe una formulación liposómica para prolongar la resistencia en la reserva sanguínea de los liposomas.

Por lo tanto, era un objetivo de la presente invención proporcionar formulaciones de nanopartículas con propiedades mejoradas. Estas formulaciones de nanopartículas resultan especialmente adecuadas como medio de contraste.

La presente invención se refiere a formulaciones de nanopartículas que comprenden un copolímero en bloque de PEG-alquilo y un colorante fluorescente de IRC (infrarrojo cercano) según se define en las reivindicaciones. Los copolímeros en bloque de PEG-alquilo son sustancias anfifílicas poliméricas o agentes activos en superficie que en un medio acuoso forman estructuras moleculares definidas, en particular micelas o emulsiones. En el sentido de la presente invención las micelas son un componente de las formulaciones de nanopartículas.

De esta manera, en el contexto de la presente invención, la expresión "formulación de nanopartículas" se refiere a unidades esencialmente independientes que comprenden los componentes indicados. Las micelas son un ejemplo de dichas unidades independientes.

En el contexto de la presente invención, la expresión "medio acuoso" se refiere a una solución acuosa con un contenido de agua de por lo menos 75% en peso, preferentemente de por lo menos 90% en peso. Según la presente invención, entre los componentes adicionales del medio acuoso pueden incluirse, por ejemplo, componentes fisiológicamente compatibles, tales como sales, por ejemplo sales inorgánicas o sales orgánicas. Entre las sales inorgánicas se incluyen, por ejemplo, cloruros, carbonatos, acetatos, dihidrogenofosfatos e hidrogenofosfatos. Las sales orgánicas son, por ejemplo, hidroclouros de TRIS, HEPES, meglumina, lisina, glicina y asparagina. Las sales pueden combinarse con ácidos y bases, por ejemplo solución de hidróxido sódico, hidrogenocarbonato sódico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido ascórbico o ácido cítrico, formando sistemas tampón. Además, dichos sistemas tampón pueden comprender cosolventes, por ejemplo etanol, dietanolamina, glicerina y polietilenglicol. Entre otros componentes fisiológicamente compatibles se incluyen azúcares, por ejemplo glucosa, fructosa, sacarosa, manitol, sorbitol, dextrano y dextrosa. Puede encontrarse una descripción general de los

sistemas tampón utilizados en la presente invención en Remington's Science and Practice of Pharmacy, 21a edición, Lippincott, Williams & Wilkins.

5 En el contexto de la presente invención, los polímeros en bloque de PEG-alquilo son compuestos que comprenden polietilenglicol (PEG) o metoxipolietilenglicol como elemento estructural hidrófilo y una cadena alquilo como elemento estructural lipófilo. Según la presente invención, resultan preferidos los polietilenglicoles de 3 a 150 unidades de oxietileno (-CH₂CH₂O-), preferentemente de 3 a 50 unidades de oxietileno. Los PEG no son necesariamente uniformes sino una mezcla que consiste en un número variable de unidades de oxietileno con un peso molecular medio. Preferentemente, el peso molecular del copolímero en bloque de PEG-alquilo es de entre 250
10 y 3.000 g/mol. Resulta especialmente preferido que el peso molecular del copolímero en bloque de PEG-alquilo sea de entre 300 y 1.000 g/mol. En este caso, el copolímero en bloque de PEG-alquilo es una molécula en la que los elementos estructurales hidrófilo y lipófilo se conectan mediante un enlace covalente, y en el que el enlace es un enlace éter, éster, amida, carbamato, tiocarbamato, tioéter o urea.

15 El peso molecular medio de la formulación de nanopartículas según la presente invención preferentemente se encuentra comprendido en el intervalo de entre 100.000 y 10.000.000 g/mol. Esto se refiere al peso medio de un mol de las unidades independientes formadas en el medio acuoso.

20 La concentración micelar crítica (CMC) de la formulación según la presente invención es inferior a 1% en peso de copolímero en bloque de PEG-alquilo, preferentemente inferior a 0,1% en peso y especialmente preferentemente inferior a 0,01% en peso de copolímero en bloque de PEG-alquilo. En relación a lo expuesto anteriormente, la expresión % en peso se refiere al porcentaje en peso relativo en una formulación acuosa.

25 En el contexto de la presente solicitud, la expresión "cadena alquilo" se refiere a una cadena hidrocarburo saturada o insaturada. La cadena alquilo de la presente invención es una cadena alquilo que comprende 3 a 30 átomos de carbono que pueden monosustituirse o polisustituirse independientemente con alquilo C1-C3, hidroxilo o fenilo. Las cadenas alquilo derivadas de ácidos grasos saturados, insaturados o química/bioquímicamente modificados resultan preferentes. A este respecto, las modificaciones químicas o bioquímicas se seleccionan en particular de entre el
30 grupo que comprende las modificaciones siguientes: hidroxilaciones, epoxidaciones, acetilaciones, carboxilaciones, esterificaciones, ramificación con grupos alquilo que pueden comprender opcionalmente una de las modificaciones anteriormente indicadas.

Entre los ácidos grasos saturados se incluyen, por ejemplo, ácido butírico, ácido hexanoico, ácido docosanoico, ácido tetracosanoico, ácido hexacosanoico, ácido esteárico, ácido eicosanoico, ácido margárico, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido decanoico y ácido octanoico. Entre los ácidos grasos insaturados se incluyen, por ejemplo, ácido palmitoleico, ácido vaccémico, ácido eláidico, ácido oleico, ácido icosenoico, ácido nervónico, ácido erúcido, ácido cetoleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido timnodónico, ácido clupanodónico y ácido araquidónico. Los ácidos grasos modificados química o bioquímicamente son ácidos grasos hidroxilo o ácidos grasos arilo, por ejemplo el ácido 12-hidroxiesteárico.

40 De esta manera, son formulaciones de nanopartículas particularmente preferidas aquéllas en las que el copolímero en bloque de PEG-alquilo es un copolímero en bloque de PEG-éster de ácido graso.

45 Resulta particularmente preferido polietilenglicol-ácido 12-hidroxiesteárico.

Según la presente invención, los ácidos grasos forman un enlace con PEG con el grupo ácido o un derivado del grupo ácido. Los enlaces se seleccionan de entre los enlaces éteres, ésteres, amidas, carbamatos, tiocarbamatos, tioéteres o urea. El grupo hidroxilo terminal del PEG puede haberse convertido en una amina, tiol u otro grupo funcional. Resultan preferidos los enlaces directos del grupo ácido de los ácidos grasos con PEG. Resultan especialmente preferidos los enlaces éster.

50 La invención se refiere además a copolímeros en bloque de PEG-éster de ácido graso, en los que el glicerol como elemento estructural se une covalentemente a PEG y los ácidos grasos forman ésteres con los grupos hidroxilo del glicerol. Resulta especialmente preferido polietilenglicol-ricinoleato de poliglicerol.

55 Los colorantes fluorescentes de IRC son cromóforos o fluoróforos con fluorescencia en el infrarrojo cercano (IRC).

60 Se dan a conocer colorantes fluorescentes de IRC que son lipófilos. Los colorantes fluorescentes de IRC lipófilos en el contexto de la exposición son los portadores de como máximo dos grupos funcionales seleccionados de entre sulfonato, sulfato, carboxilo, polihidroxi-alquilo (4 a 6 grupos hidroxilo).

El colorante fluorescente de IRC de la presente invención es el verde indocianina (VIC, CardioGreen, verde IC, DiagnoGreen).

65 En la figura 8A se muestra una vista esquemática del verde indocianina.

El diámetro de la formulación de nanopartículas según la presente invención se encuentra comprendido en el intervalo de entre 1 y 1.000 nm, preferentemente de entre 5 y 500 nm, especialmente preferente de entre 5 y 50 nm.

5 La fluorescencia o la fluorescencia de IRC de las formulaciones según la presente invención se encuentra comprendida en el intervalo de entre 600 y 1.000 nm, preferentemente de entre 750 y 900 nm.

10 El rendimiento cuántico de fluorescencia de las formulaciones según la presente invención es por lo menos tan elevada como una solución de colorante en agua; sin embargo preferentemente es dos veces superior, y especialmente preferente es cuatro veces superior. Para el verde indocianina, el rendimiento cuántico de fluorescencia en la formulación de nanopartículas es de por lo menos 4%, especialmente preferentemente de por lo menos 8%.

15 En comparación con una formulación puramente acuosa, la inhibición, es decir, la reducción de la intensidad de fluorescencia al incrementarse la concentración, sólo se produce a las concentraciones más altas en el caso de las formulaciones según la presente invención. Preferentemente la inhibición no se produce hasta alcanzar una concentración superior a 0,1 mg/ml. En el caso del verde indocianina, la inhibición se produce preferentemente a una concentración 10 veces superior a la de una solución puramente acuosa.

20 Además, las formulaciones según la presente invención pueden proporcionarse a concentraciones más altas que las formulaciones puramente acuosas de los colorantes. Una concentración de por lo menos 0,5 mg/ml resulta preferente, preferentemente de por lo menos 1 mg/ml.

25 La estabilidad de almacenamiento de las formulaciones según la presente invención resulta mejorada significativamente en comparación con las formulaciones puramente acuosas y las formulaciones descritas en Saxena *et al.* Siete días después de la producción, más de 90% del colorante fluorescente de IRC formulado todavía podía detectarse en forma intacta.

30 La unión a proteínas plasmáticas del VIC en las formulaciones según la presente invención corresponde a la de VIC. Tras la incubación de una formulación de micelas en suero humano y la medición de la parte libre de VIC tras un periodo de incubación de 4 h y la separación del VIC no unido mediante ultracentrifugación, se determinó una parte libre de <5%. Este valor se obtuvo en un experimento análogo con una solución acuosa de VIC.

35 En comparación con una solución acuosa de VIC (máximo de absorción: 780 nm), el máximo de absorción de VIC en la formulación de micelas con VIC a 797 nm se encontraba desplazado a longitudes de onda más altas en 17 nm (desplazamiento al rojo). Debido a las propiedades ópticas del tejido, este desplazamiento conduce a una profundidad de penetración incrementada de la luz de excitación y, de esta manera, a una detección mejorada en los tejidos. Además, el máximo de absorción a 797 nm es próximo al máximo de absorción de VIC en el plasma sanguíneo (805 nm). Los dispositivos diagnósticos establecidos se ajustan a esta longitud de onda de manera que esta propiedad permita una utilización directa de la formulación.

40 La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una formulación de nanopartículas según la presente invención.

45 La presente invención se refiere además a una formulación de nanopartículas según la presente invención para la utilización como medio de contraste *in vivo*.

Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento para la preparación de una formulación de nanopartículas que comprende las etapas según se definen en la reivindicación 5.

50 Las etapas esenciales de la preparación de una formulación de nanopartículas son: (1) disolver el copolímero en bloque de PEG-alquilo en agua, preferentemente obteniendo una concentración de entre 0,05 y 1 g/ml, (2) añadir el colorante fluorescente a la solución para formar una formulación micelar.

55 Descripción de los dibujos

Figura 1A: espectro de absorción de VIC en agua (línea de puntos) y micelas de VIC en agua tras la preparación según el Ejemplo 1 (línea continua). Estandarización a solución de micelas=1.

60 Figura 1B: espectro de emisión de fluorescencia de VI en agua (línea de puntos) y micelas de VIC en agua tras la preparación según el Ejemplo 1 (línea continua). Estandarización a solución de micelas=1.

Figura 1C: intensidad de fluorescencia de VIC en agua (cuadrados) y de micelas de VIC en agua como función de la concentración de VIC (0,001 a 5 mg/ml).

65 Figura 1D: distribución de tamaños de partículas mediante dispersión de luz dinámica.

Figura 1E: determinación de la estabilidad mediante la medición de la absorción en el máximo de las diversas formulaciones como función del tiempo. Comparación de VIC en agua (cuadrados) y tres formulaciones de micelas de VIC; solutol al 10% (círculos), al 20% (triángulos) y al 40% (triángulos invertidos).

5 Figura 2A: espectros de absorción de VIC en agua y de micelas de citrol-IOMS de VIC.

Figura 2B: espectro de emisión de VIC en DMSO y en micelas de citrol-IOMS.

Figura 2C: estabilidad de VIC (VIC al 0,005%) en micelas de citrol-IOMS.

10

Figura 3A: espectros de absorción de VIC en agua y en micelas de VIC-Crodet S40 LD.

Figura 3B: espectro de emisión de VIC en DMSO y en micelas de Crodet S40 LD.

15 Figura 3C: estabilidad de VIC (VIC al 0,005%) en micelas de Crodet S 40.

Figura 4A: espectros de absorción de VIC en agua y en micelas de VIC-Brij[®] 58.

Figura 4B: espectro de emisión de VIC en DMSO y en micelas de Brij[®] 58.

20

Figura 4C: estabilidad de VIC (VIC al 0,005%) en micelas de Brij[®] 58.

Figura 5A: espectros de absorción de VIC en agua y en micelas de VIC-Brij[®] 58.

25 Figura 5B: espectro de emisión de VIC en DMSO y en micelas de Brij[®] 58.

Figura 5C: estabilidad de VIC (VIC al 0,005%) en micelas de Brij[®] 98.

Figura 6A: estructura del derivado de VIC NW003.5.

30

Figura 6B: espectros de absorción de NW003.5 en agua y de micelas de NW003.5-Solutol HS 15.

Figura 6C: espectro de emisión de VIC en DMSO y en micelas de NW003.5-Solutol HS 15.

35 Figura 7A: estructura del derivado de VIC IR-783.

Figura 7B: espectros de absorción de IR-783 en agua y en micelas de IR-783-Solutol HS 15.

Figura 7C: espectro de emisión de VIC en DMSO y en micelas de IR-783-Solutol HS 15.

40

Figura 7D: estabilidad de IR-783 (IR-783 al 0,005%) en micelas de Solutol HS 15.

Figura 8: vista esquemática del colorante para la utilización en la presente invención: verde indocianina (VIC).

45 La invención se describe con mayor detalle en los ejemplos siguientes:

Ejemplos

Ejemplo 1

50

Preparación de la formulación de micelas

Ejemplo 1: se calentaron 2 g de Solutol HS 15 a 65°C. Se añadieron 10 ml de agua para fines de inyección bajo agitación y la solución transparente se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se disolvieron 50 mg de VIC en la solución de micelas y se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,2 µm.

55

Ejemplo 2: se añadieron 2 g de Solutol HS 15 a 10 ml de agua con fines de inyección bajo agitación a temperatura ambiente. Se obtuvo una solución transparente. Se disolvieron 50 mg de VIC en la solución de micelas y se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,2 µm.

60

Mediciones de absorción y de fluorescencia

Se registraron los espectros de absorción en un intervalo de longitudes de onda de entre 700 y 900 nm con un espectrofotómetro UVIKON 933 (compañía Kontron) en los diversos solventes.

65

--> VIC en agua, λ_{\max} =780 nm

VIC en micelas, $\lambda_{\text{max}}=797$ nm (fig. 1A)

Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia mediante un espectrofluorímetro FluoroLog-2 (lámpara de xenón de 350 W) de la compañía Spex. Con este fin se registraron los espectros de emisión de entre 700 y 900 nm. La longitud de onda de excitación correspondía al máximo respectivo de la formulación en el espectro de absorción (VIC en agua, $\lambda_{\text{max}}=780$ nm y micelas de VIC, $\lambda_{\text{max}}=795$ nm). Debido al modo s y r del software DM 3000, pudieron considerarse en la evaluación las diferentes intensidades de lámpara de las diferentes longitudes de onda de excitación.

Se calculó el rendimiento cuántico a través del área superficial bajo la curva de emisión. Se utilizó VIC en DMSO como el estándar ($\Phi=0,13$).

--> El rendimiento cuántico de micelas de VIC era de $\Phi=0,08$, comparado con $\Phi=0,02$ del VIC en agua. La inhibición únicamente tuvo lugar a las concentraciones más altas (superiores a 0,1 mg/ml de VIC) (figs. 1B y 1C).

Análisis de estabilidad

Para el análisis de estabilidad se midió la absorción en el máximo de las diversas formulaciones como función del tiempo. Con este fin, se prepararon soluciones de VIC al 0,0005% y se almacenaron a temperatura ambiente. El almacenamiento de la formulación de VIC puramente acuosa mostró una reducción de la absorción estandarizada a menos de 10% tras sólo 7 días. Por otra parte, las formulaciones de micelas de VIC todavía mostraban más de 90% de la absorción tras 7 días de almacenamiento comparado con el valor inicial, e incluso tras 4 semanas la absorción no cayó por debajo de 70% (fig. 1E).

Tamaño de partícula

Se determinó la distribución de tamaños de partícula mediante dispersión de luz dinámica (Zetasizer NS, compañía Mal vera). La medición se llevó a cabo con un láser de He-Ne (633 nm, 4 mW) desde un ángulo de 173°. Las muestras se midieron directamente sin dilución en cubetas de cuarzo de 45 μl .

--> Las micelas de VIC presentaban un diámetro hidrodinámico de 12 nm con un IPD (índice de polidispersidad) de 0,061 (fig. 1D).

Unión a proteínas plasmáticas

Se observó el desplazamiento de longitud de onda en el espectro de absorción para determinar la unión de las proteínas plasmáticas. Con este fin se compararon los espectros de 700 a 900 nm de VIC en agua y en plasma con espectros de micelas de VIC en agua y en plasma.

--> En ambas formulaciones el máximo de absorción en plasma se desplazaba a 805 nm. El comportamiento de la unión a proteínas plasmáticas de VIC en las formulaciones de la presente invención correspondía a la de VIC en un medio acuoso.

Ensayo de hemólisis

Para el examen de la actividad hemolítica de las micelas de VIC, en primer lugar se extrajo sangre completa humana heparinizada del plasma y se lavó 3 veces con tampón de PBS. Tras la preparación de una suspensión de eritrocitos al 2% en PBS, se incubó con la formulación de micelas de VIC durante 1 h a 37°C. Se utilizó solución de PBS pura como valor de lectura de blanco (0% de hemólisis) y se utilizó solución de Triton al 2% como valor de 100% de hemólisis. Tras la incubación, se separaron los eritrocitos mediante centrifugación y se determinó fotométricamente a 540 nm la pigmentación roja en el sobrenadante.

--> Las micelas de VIC no mostraban ninguna actividad hemolítica.

Compuestos de PEG-alquilo

Ejemplo 2:

Se disolvieron 0,3 g de citrol 10 MS (estearato PEG 20) en 10 ml de agua para inyección bajo agitación a temperatura ambiente. Se obtuvo una solución transparente. Se disolvieron 50 μl de una solución de 50 mg de VIC al 1% (p/v) en la solución de micelas y se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,2 μm .

Mediciones de absorción y fluorescencia

Se registraron los espectros de absorción en un intervalo de longitudes de onda de entre 600 y 900 nm con un espectrofotómetro DU[®]530 Beckman en los diversos solventes.

5

--> VIC en agua, $\lambda_{\max}=779$ nm; micelas de VIC-Citrol 10 MS, $\lambda_{\max}=800$ nm (fig. 2A)

Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia utilizando un espectrofluorímetro FP-6500 de la compañía JASCO. Con este fin se registraron los espectros de emisión de 770 a 900 nm. La longitud de onda de excitación era de 760 nm en cada caso. Se calculó el rendimiento cuántico a partir del área bajo la curva de emisión. Como estándar se utilizó VIC en DMSO ($\Phi=0,12$).

10

--> El rendimiento cuántico de las micelas de VIC-Citrol 10 MS era de $\phi=0,08$, comparado con VIC en agua, con $\phi=0,02$ (fig. 2B).

15

Análisis de estabilidad

Para el análisis de estabilidad, se midieron los espectros de absorción de las diversas formulaciones como función del tiempo. Tras 2 meses de almacenamiento a 4°C y bajo exclusión de luz, las formulaciones de micelas de Citrol-IOMS de VIC todavía mostraban una absorción superior al 94% en comparación con el valor inicial (fig. 2C).

20

Ejemplo 3:

Se disolvieron 0,4 g de Crodet S40 LD (estearato de PEG40) en 10 ml de agua bajo agitación a temperatura ambiente con fines de inyección. Se obtuvo una solución transparente. Se disolvieron 50 μ l de una solución de VIC al 1% (p/v) en la solución de micelas y se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,2 μ m.

25

Mediciones de absorción y de fluorescencia

Se registraron los espectros de absorción en un intervalo de longitudes de onda de entre 600 y 900 nm con un espectrofotómetro DU[®]530 Beckman en los diversos solventes.

30

--> VIC en agua, $\lambda_{\max}=779$ nm
micelas de VIC-Crodet S40 LD, $\lambda_{\max}=800$ nm (fig. 3A)

35

Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia con un espectrofluorímetro FP-6500 de la compañía JASCO. Con este fin se registraron los espectros de emisión de 770 a 900 nm. La longitud de onda de excitación era de 760 nm en cada caso. Se calculó el rendimiento cuántico a partir del área bajo la curva de emisión. Se utilizó VIC en DMSO como estándar ($\Phi=0,12$).

40

--> El rendimiento cuántico de las micelas de VIC-Crodet S40 LD era de $\phi=0,07$, comparado con VIC en agua, con $\phi=0,02$ (fig. 3B).

45

Análisis de estabilidad

Para el análisis de estabilidad, se midieron los espectros de absorción de las diversas formulaciones como función del tiempo. Tras 2 meses de almacenamiento a 4°C y bajo exclusión de luz, las formulaciones de micelas de Brij[®] 58 de VIC todavía mostraban más de 97% de absorción en comparación con el valor inicial.

50

Ejemplo 5:

Se disolvió 1 g de Brij[®] 98 (oleil-éter de PEG20) en 10 ml de agua para inyección bajo agitación a temperatura ambiente. Se obtuvo una solución transparente. Se disolvieron 50 μ l de una solución de VIC al 1% (p/v) en la solución de micelas y se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,2 μ m.

55

Mediciones de absorción y de fluorescencia

Se registraron los espectros de absorción en un intervalo de longitudes de onda de entre 600 y 900 nm con un espectrofotómetro DU[®]530 Beckman en los diversos solventes.

60

--> VIC en agua, $\lambda_{\max}=779$ nm
micelas de VIC-Brij[®] 98, $\lambda_{\max}=800$ nm (fig. 5A)

65

Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia con un espectrofluorímetro FP-6500 de la compañía JASCO. Con este fin se registraron los espectros de emisión de 770 a 900 nm. La longitud de onda de excitación era de 760 nm en cada caso. Se calculó el rendimiento cuántico a partir del área bajo la curva de emisión. Se utilizó VIC en DMSO

como el estándar ($\Phi=0,12$). El rendimiento cuántico de las micelas de VIG-Brij[®] 98 LD era de $\phi=0,06$ en comparación con VIC en agua, con $\phi=0,02$ (fig. 5B).

Ensayos de estabilidad

5 Para el análisis de estabilidad se midieron los espectros de absorción de las diversas formulaciones como función del tiempo. Tras 2 meses de almacenamiento a 4°C y bajo exclusión de luz, las formulaciones de micelas de Brij[®] 98 de VIC todavía mostraban una absorción superior al 95% en comparación con el valor inicial (fig. 5C).

10 **Derivados de VIC (ejemplos de referencia)**

Ejemplo 6:

15 Se disolvió 1 g de Solutol[®] HS en 10 ml de agua para inyección bajo agitación a temperatura ambiente. Se obtuvo una solución transparente. Se disolvieron 50 μ l de una solución de NW003.5 al 1% (p/v) (fig. 6A) en la solución de micelas y se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,2 μ m.

20 Mediciones de absorción y de fluorescencia. Se registraron los espectros de absorción en un intervalo de longitudes de onda de entre 600 y 900 nm con un espectrofotómetro DU[®]530 Beckman en los diversos solventes.

--> NW003.5 en agua, λ_{\max} (monómero)=788 nm
micelas de NW003.5-Solutol[®] HS15, λ_{\max} =806 nm (fig. 6B)

25 Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia con un espectrofluorímetro FP-6500 de la compañía JASCO. Con este fin se registraron los espectros de emisión de 770 a 900 nm. La longitud de onda de excitación era de 760 nm en cada caso. Se calculó el rendimiento cuántico a partir del área bajo la curva de emisión. Se utilizó el VIC en DMSO como el estándar ($\Phi=0,12$).

30 --> El rendimiento cuántico de las micelas de NW003.5-Solutol[®] HS era de $\phi=0,12$, comparado con VIC en agua, con $\phi=0,02$ (fig. 6C).

Análisis de estabilidad

35 Para el análisis de estabilidad se midieron los espectros de absorción de las diversas formulaciones como función del tiempo. Tras 1 mes de almacenamiento a 4°C y bajo exclusión de luz, las formulaciones de micelas de Solutol HS 15 de NW003.5 todavía mostraban una absorción superior al 95% en comparación con el valor inicial.

Ejemplo 7:

40 Se disolvió 1 g de Solutol[®] HS 15 en 10 ml de agua para inyección. Bajo agitación a temperatura ambiente se obtuvo una solución transparente. Se disolvieron 50 μ l de una solución de IR-783 al 1% (p/v) (fig. 7A) en la solución de micelas y se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,2 μ m.

45 Mediciones de absorción y de fluorescencia

Se registraron los espectros de absorción en un intervalo de longitudes de onda de 600 a 900 nm con un espectrofotómetro DU[®]530 Beckman en los diversos solventes.

50 --> IR-783 en agua, λ_{\max} (monómero)=775 nm
micelas de IR-783-Solutol[®] HS 15, λ_{\max} =797 nm (fig. 7B)

55 Se llevaron a cabo mediciones de la fluorescencia con un espectrofluorímetro FP-6500 de la compañía JASCO. Con este fin se registraron los espectros de emisión de 770 a 900 nm. La longitud de onda de excitación era de 760 nm en cada caso. Se calculó el rendimiento cuántico a partir del área bajo la curva de emisión. Se utilizó VIC en DMSO como el estándar ($\Phi=0,12$).

--> El rendimiento cuántico de las micelas de IR-783-Solutol[®] HS 15 era de $\phi=0,11$, comparado con VIC en agua, con $\phi=0,02$ (fig. 7C).

60 Análisis de estabilidad

Para el análisis de estabilidad se midieron los espectros de absorción de las diversas formulaciones como función del tiempo. Tras 1 mes de almacenamiento a 4°C y bajo exclusión de luz, las formulaciones de micelas de Solutol HS 15 de IR-783 no mostraron cambios significativos de absorción en comparación con el valor inicial.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulación de nanopartículas que comprende 1) un compuesto que comprende polietilenglicol (PEG) o metoxipolietilenglicol como elemento estructural hidrófilo y una cadena alquilo como elemento estructural lipófilo, y 2) un colorante fluorescente del infrarrojo cercano,
- en la que la cadena alquilo presenta 3 a 30 átomos de carbono, que pueden encontrarse mono- o polisustituidos con alquilo C₁-C₃, hidroxilo o fenilo,
- 10 en la que los elementos estructurales hidrófilo y lipófilo se encuentran conectados mediante enlace covalente, y en la que el enlace es un enlace éter, éster, amida, carbamato, tiocarbamato, tioéter o urea, y en la que el colorante fluorescente de IRC es el verde indocianina,
- 15 en la que el diámetro de la formulación de nanopartículas se encuentra en el intervalo de 1 nm a 1.000 nm y en la que la fluorescencia de la formulación de nanopartículas se encuentra en el intervalo de 600 nm a 1.000 nm, y en la que la formulación de nanopartículas forma unas micelas en medios acuosos y en la que dicha formulación de nanopartículas puede obtenerse mediante un procedimiento según la reivindicación 5 y en la que dicha formulación de nanopartículas es una formulación de nanopartículas acuosa.
- 20 2. Formulación de nanopartículas según la reivindicación 1, en la que la cadena alquilo deriva de ácidos grasos saturados, insaturados o química/bioquímicamente modificados.
3. Formulación farmacéutica que comprende una formulación de nanopartículas según la reivindicación 1.
- 25 4. Formulación de nanopartículas según la reivindicación 1 o 2, para la utilización como medio de contraste *in vivo*.
5. Procedimiento para la preparación de una formulación de nanopartículas que es una formulación de nanopartículas acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas siguientes: (1) disolver el compuesto que comprende polietilenglicol (PEG) o metoxipolietilenglicol como elemento estructural hidrófilo y una cadena alquilo como elemento estructural lipófilo en agua, (2) añadir el colorante fluorescente a la solución para formar una formulación micelar.
- 30

Fig. 1A:

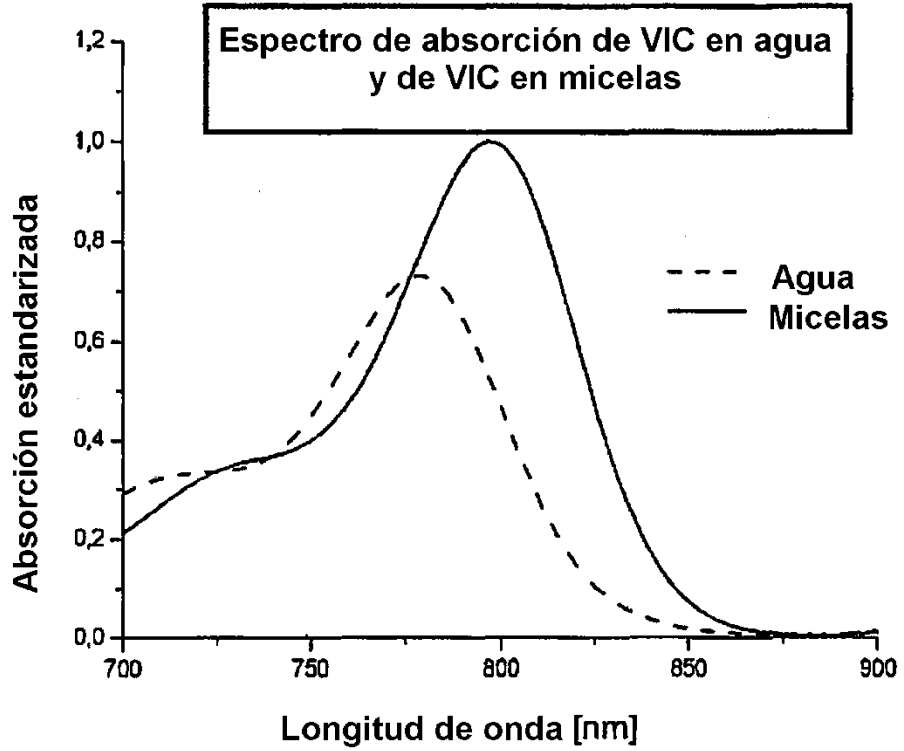


Fig. 1B:

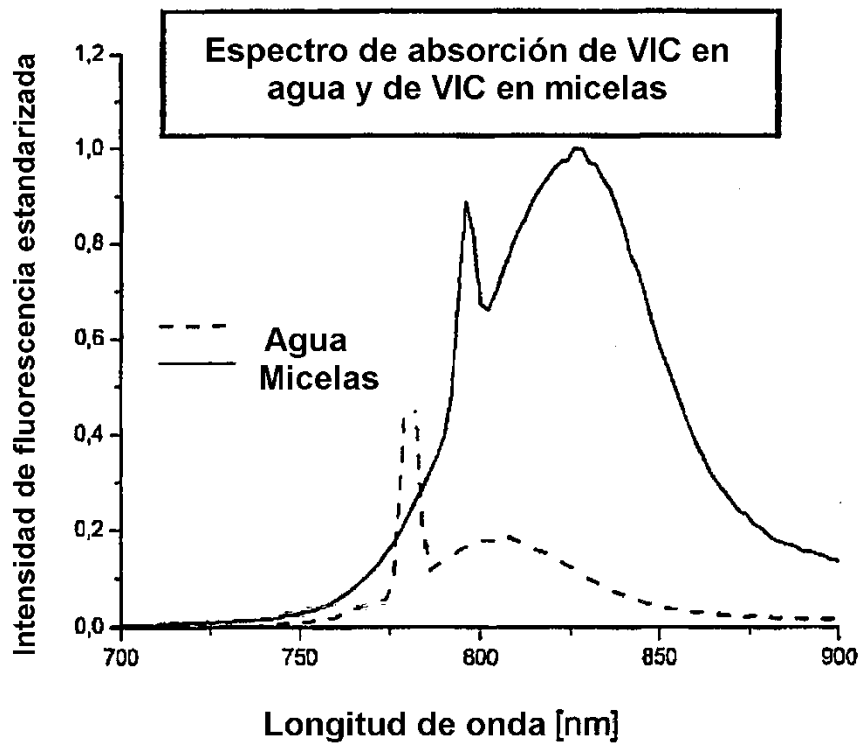


Fig. 1C:

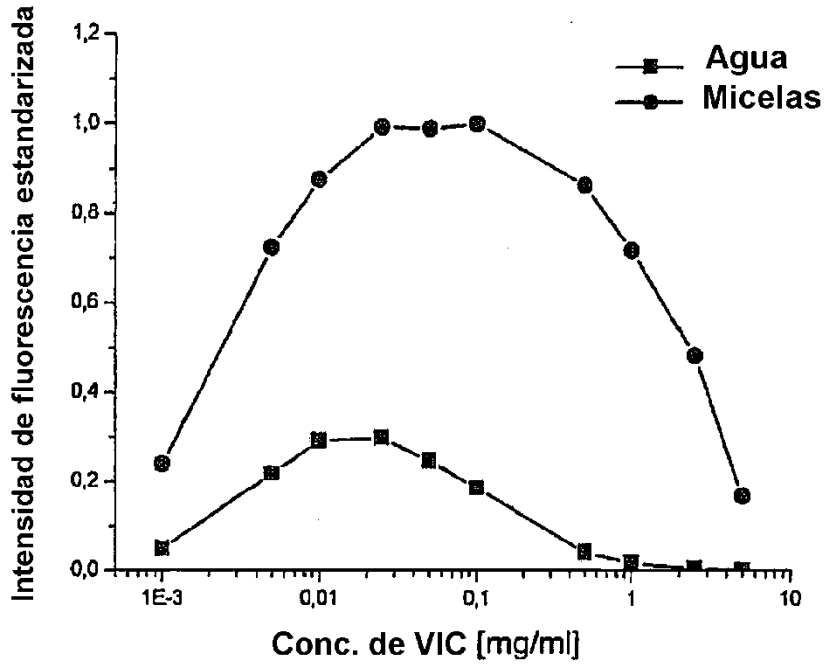


Fig. 1D:

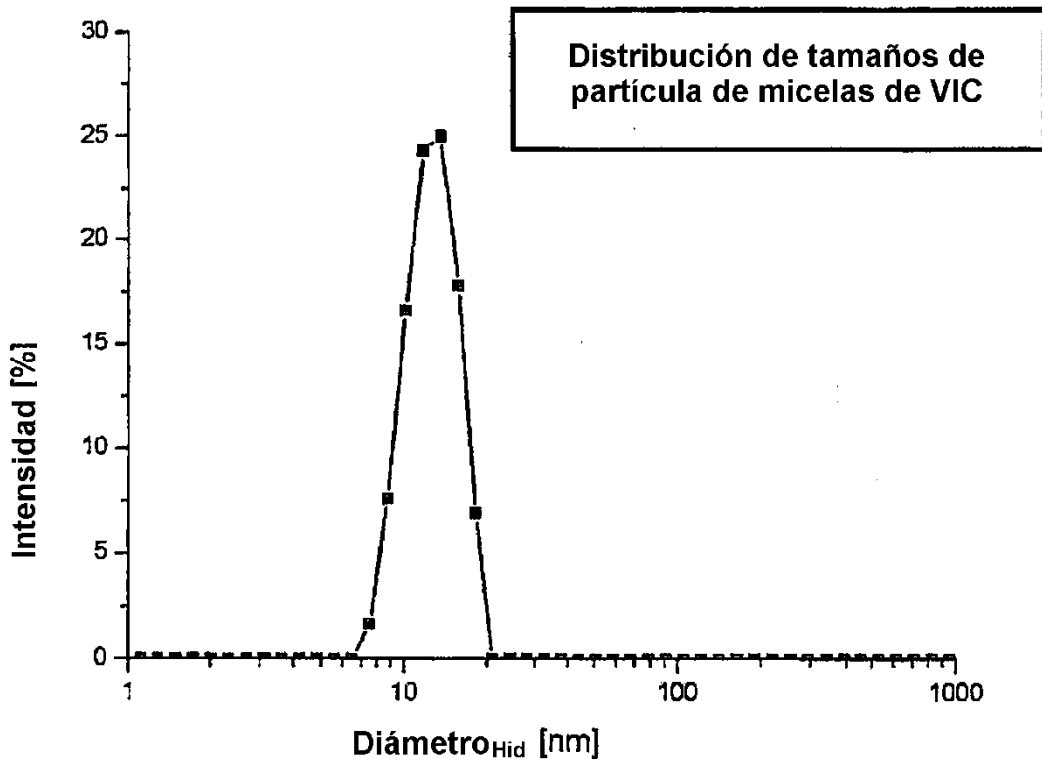


Fig. 1E:

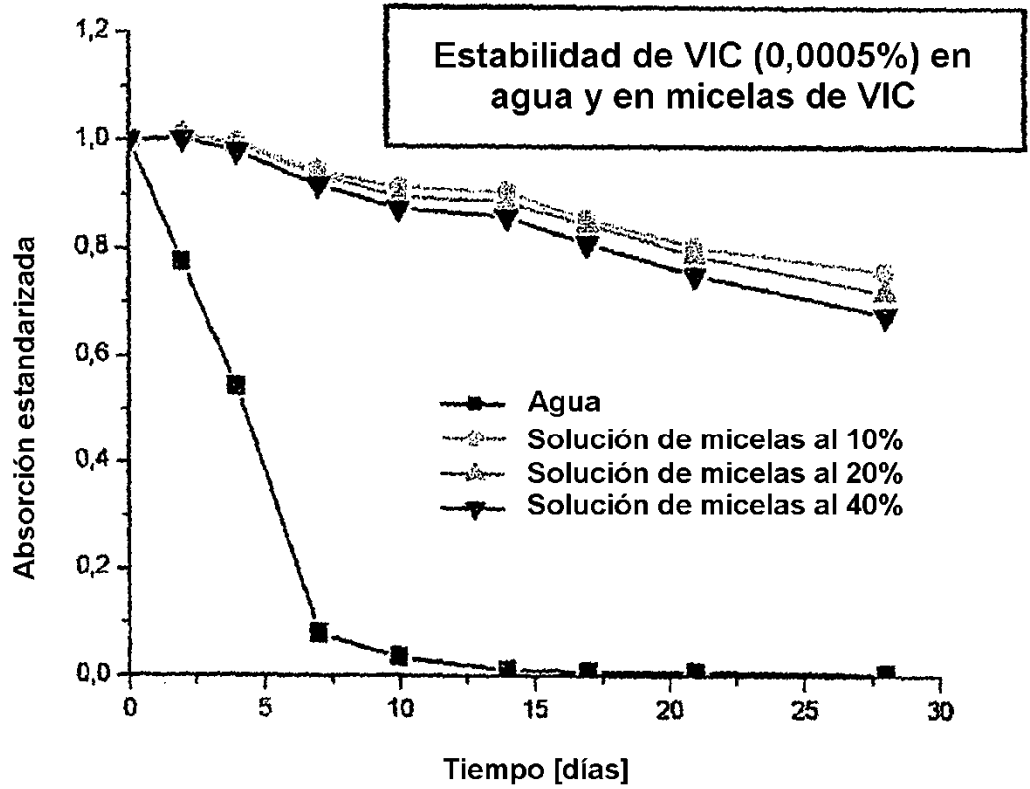


Fig. 2A:

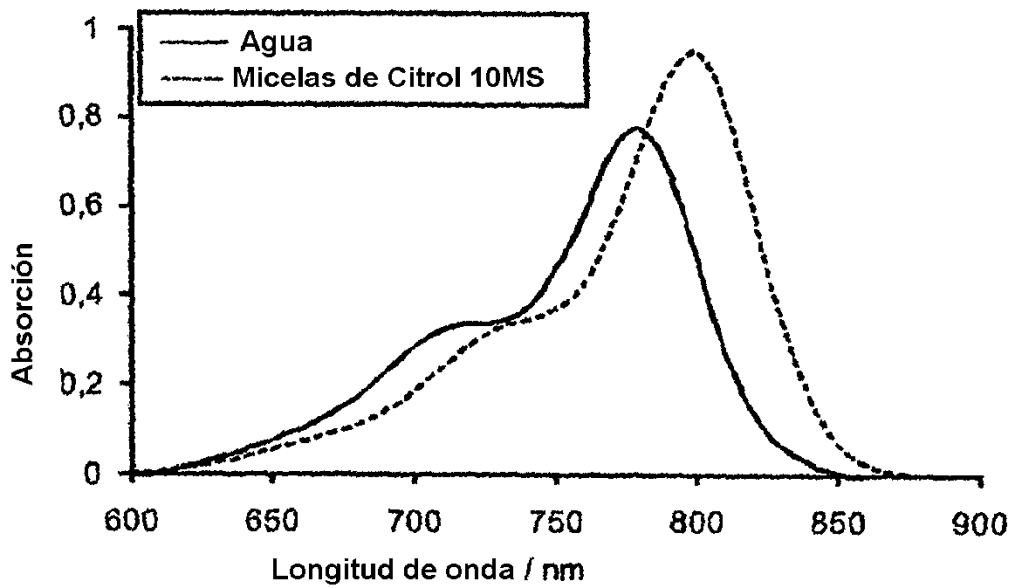


Fig. 2B:

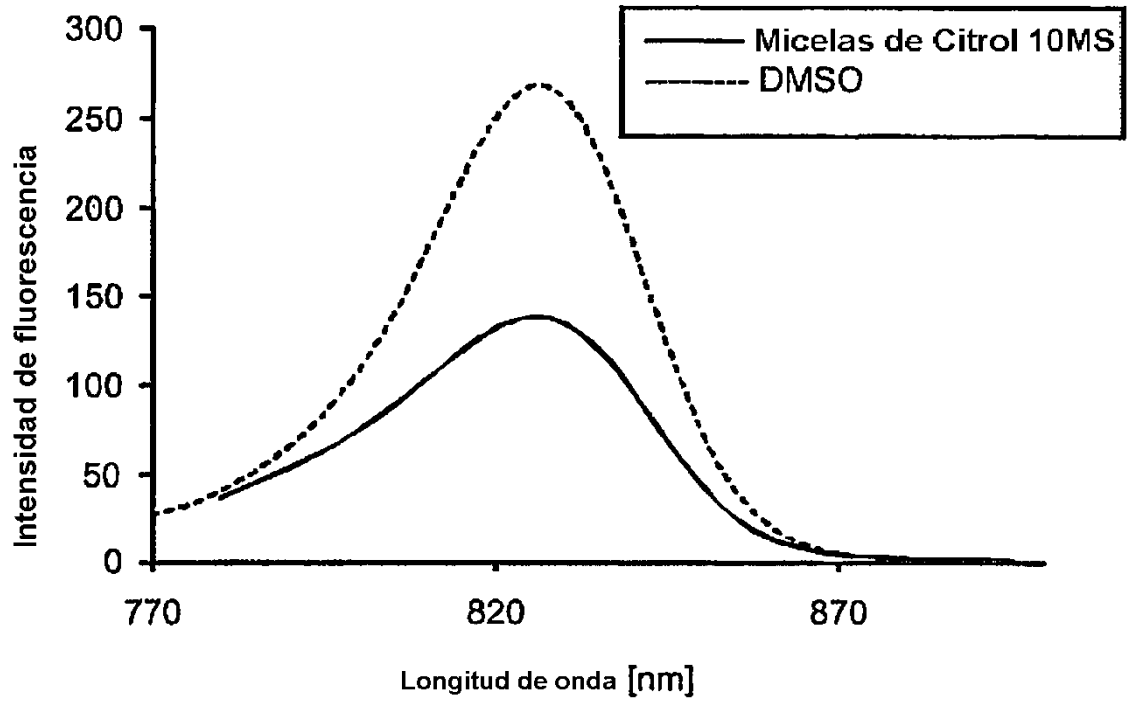


Fig. 2C:

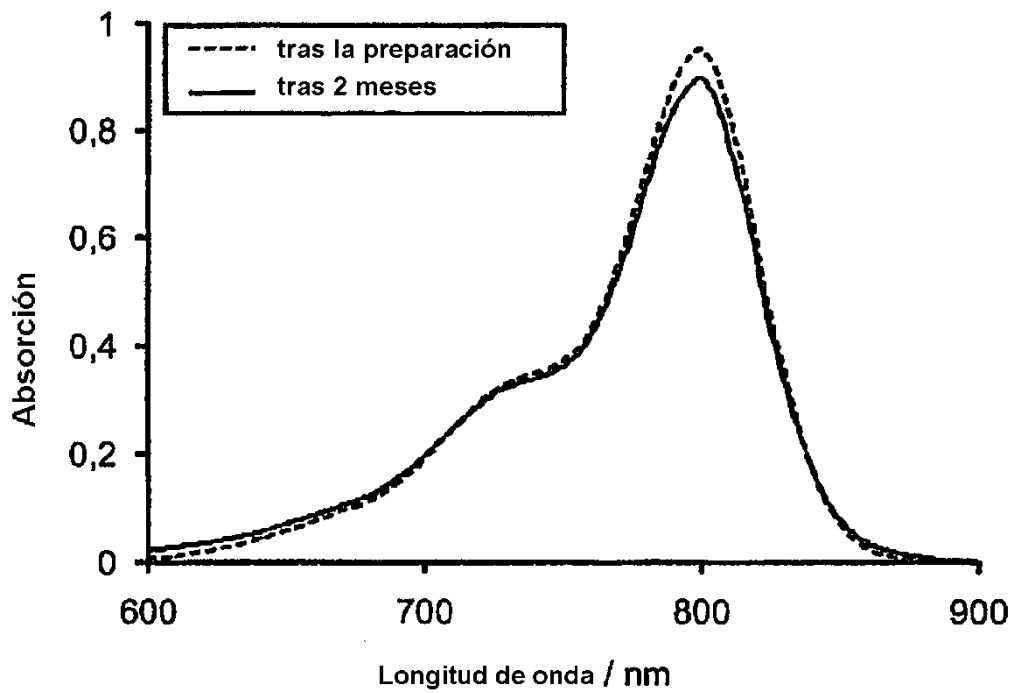


Fig. 3A:

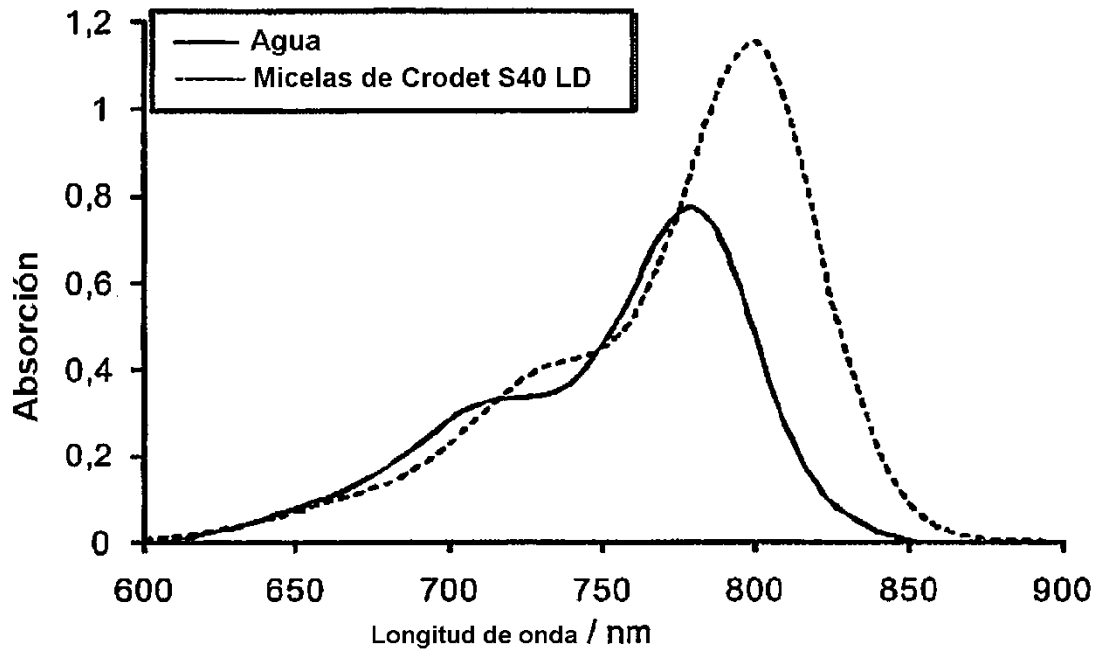


Fig. 3B:

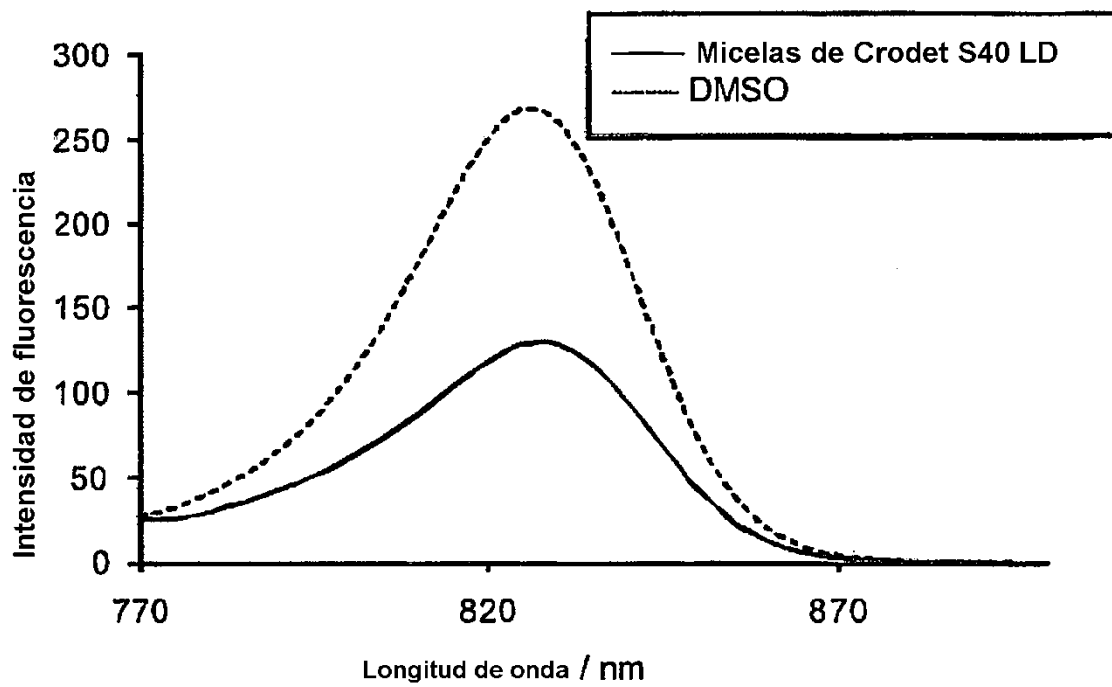


Fig. 3C:

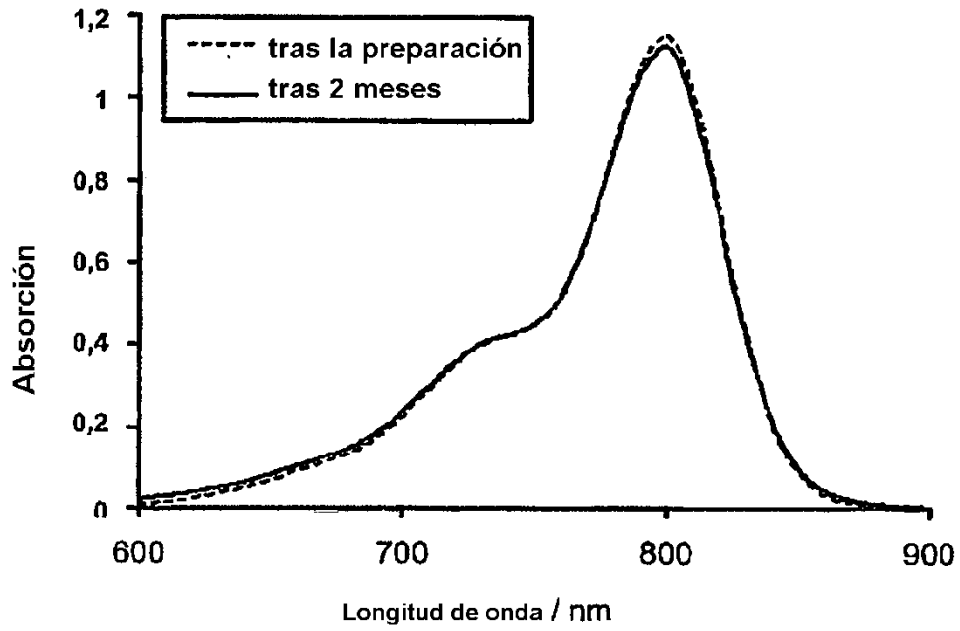


Fig. 4A:

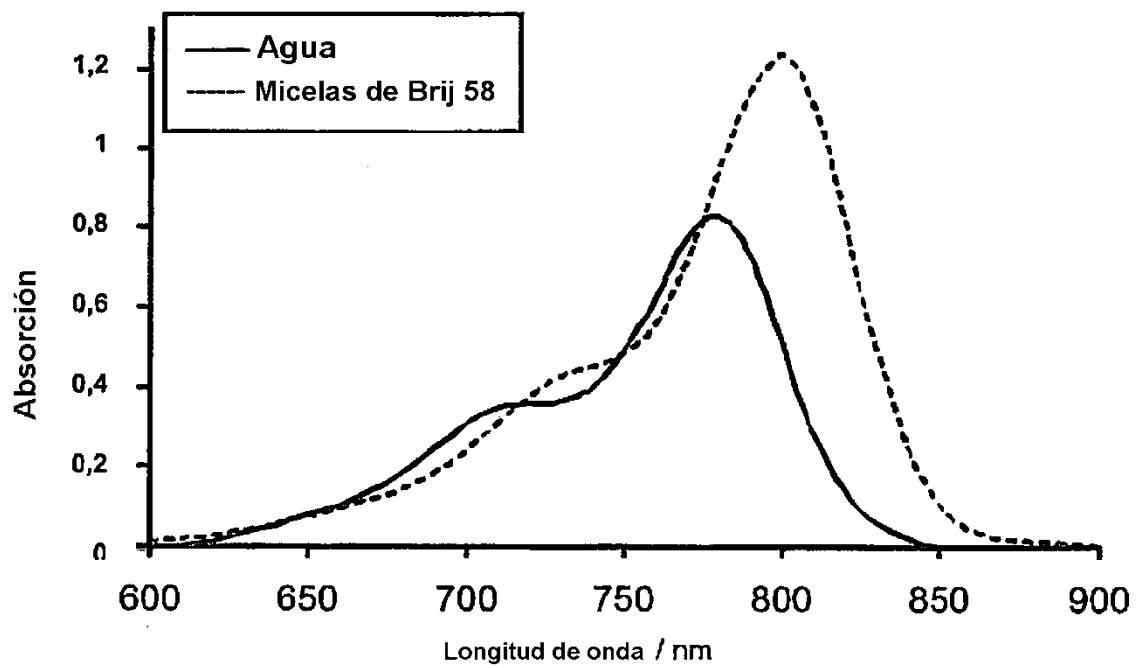


Fig. 4B:

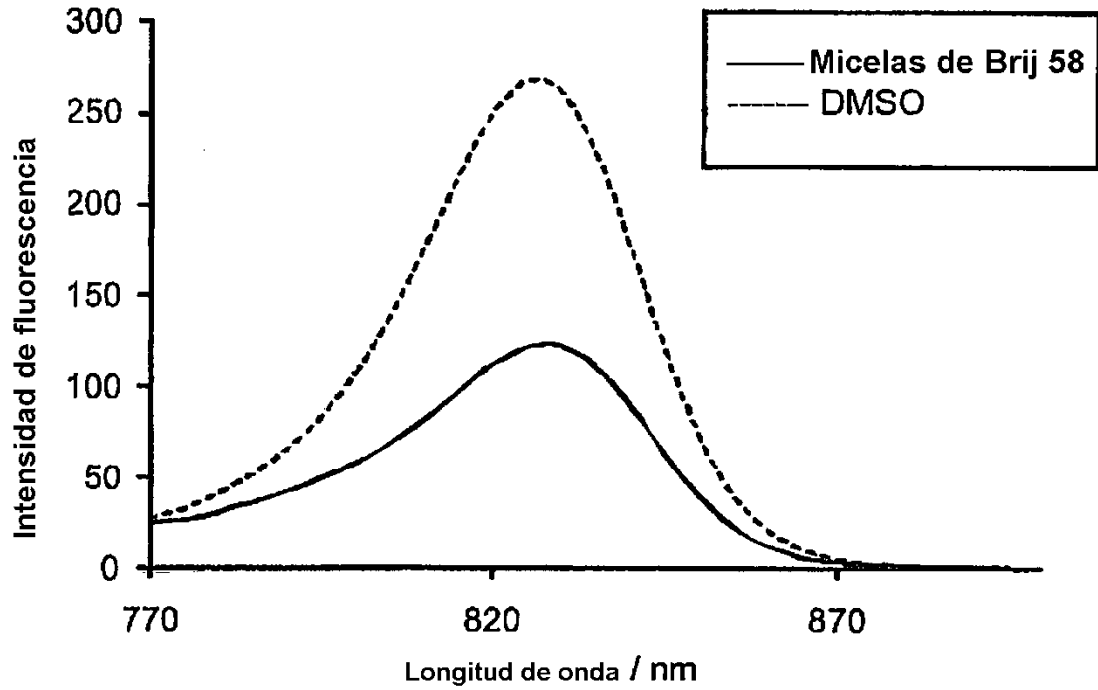


Fig. 4C:

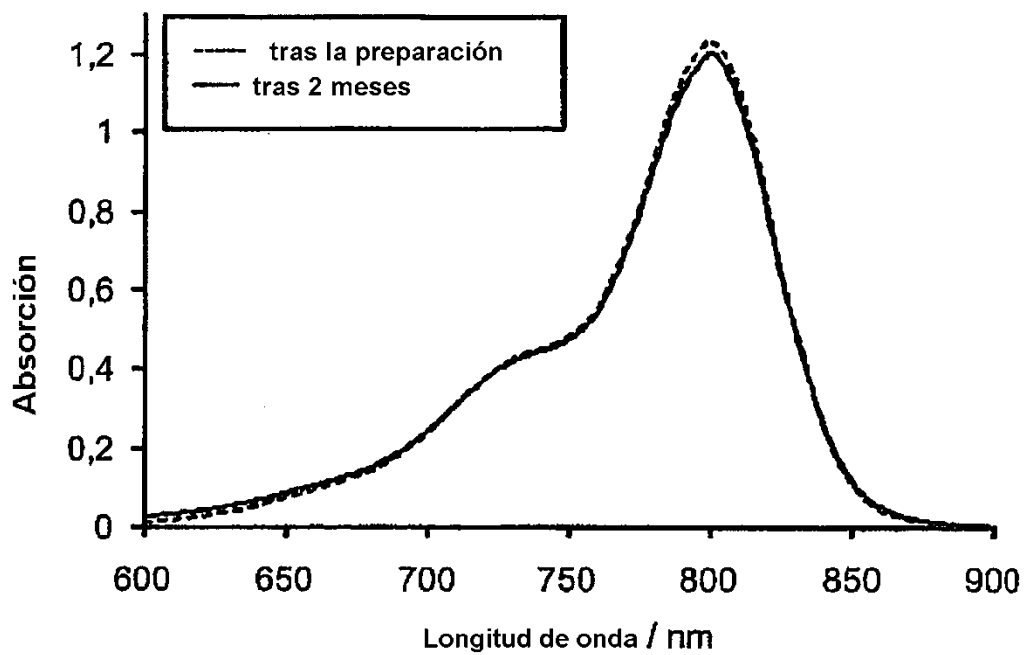


Fig. 5A:

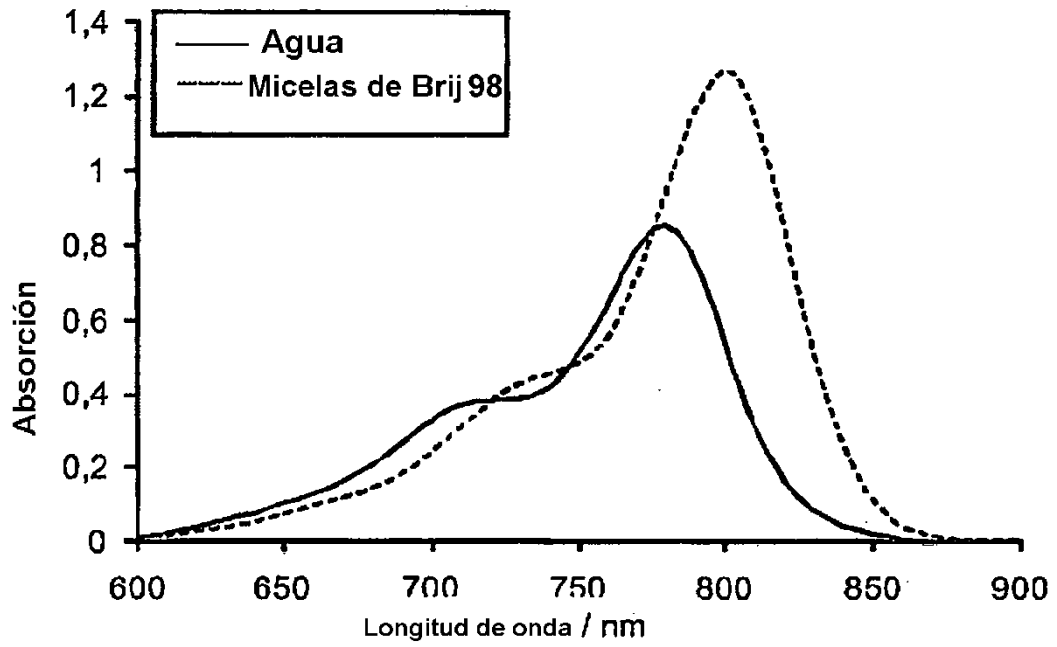


Fig. 5B:

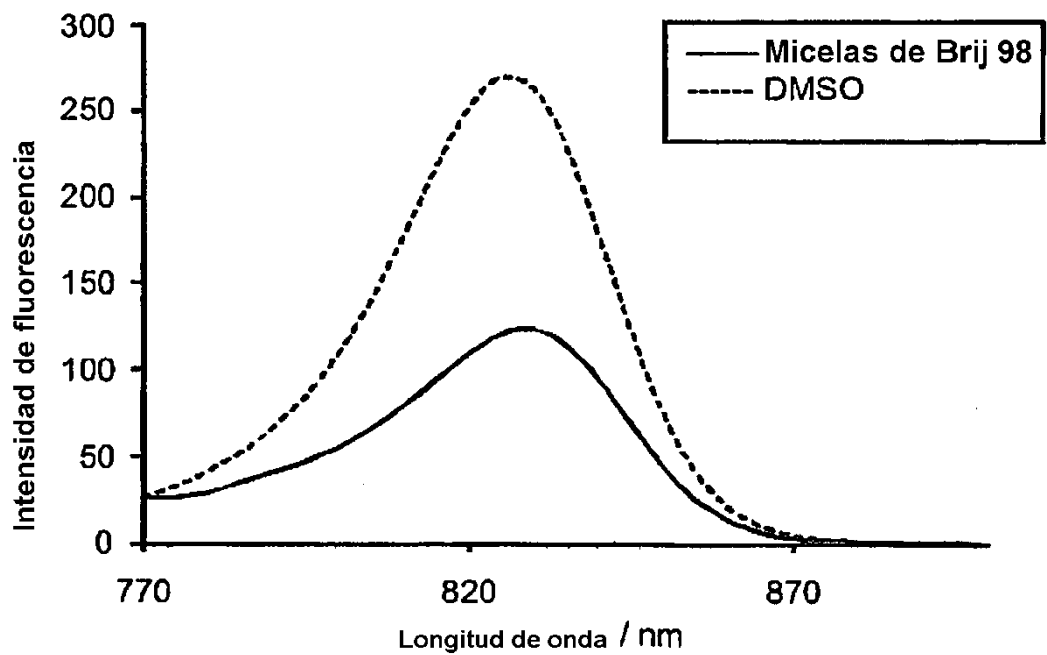


Fig. 5C:

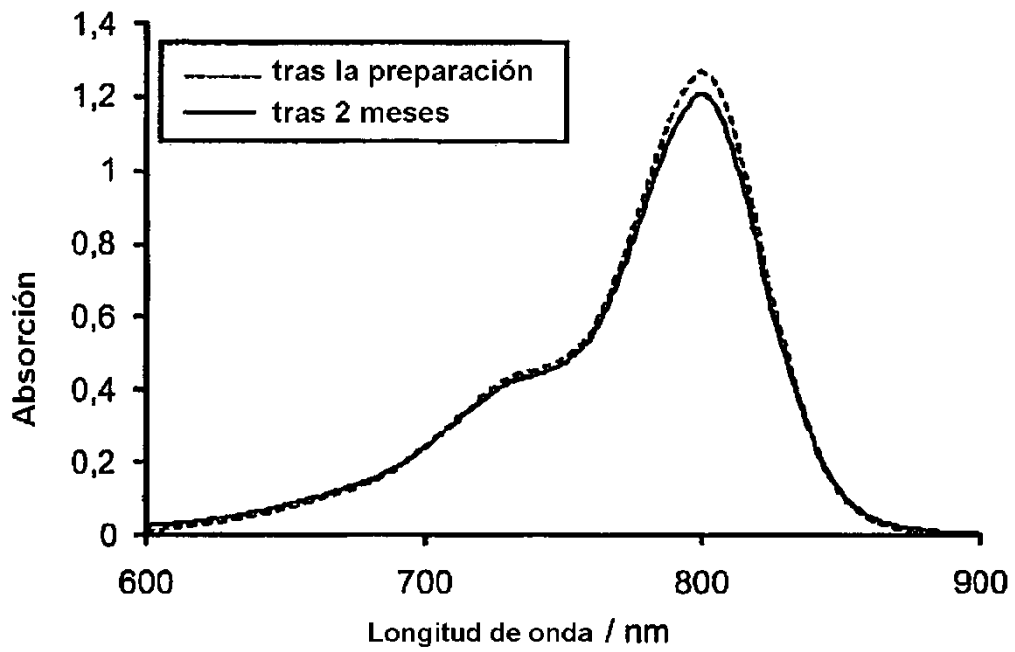


Fig. 6A:

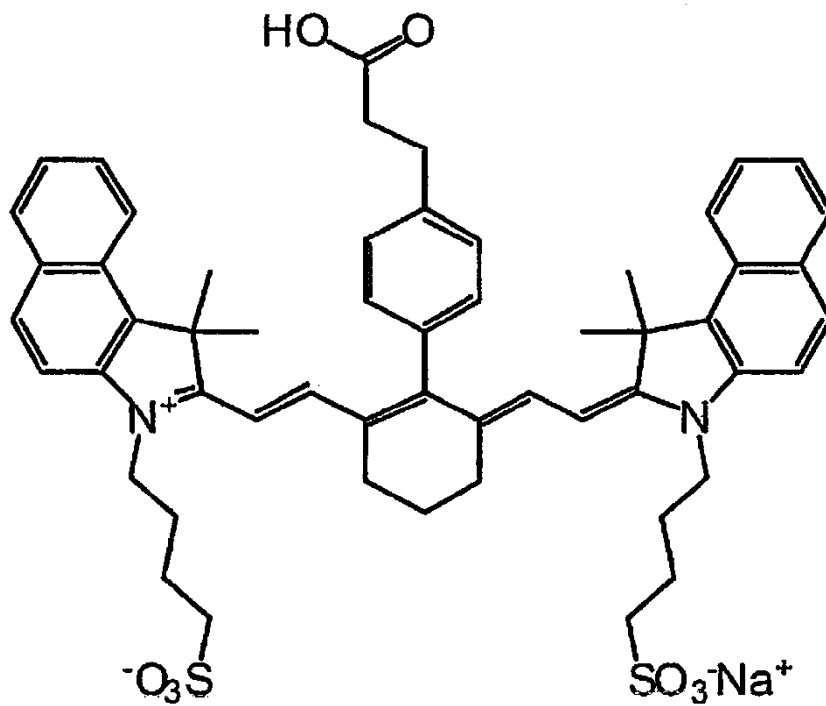


Fig. 6B:

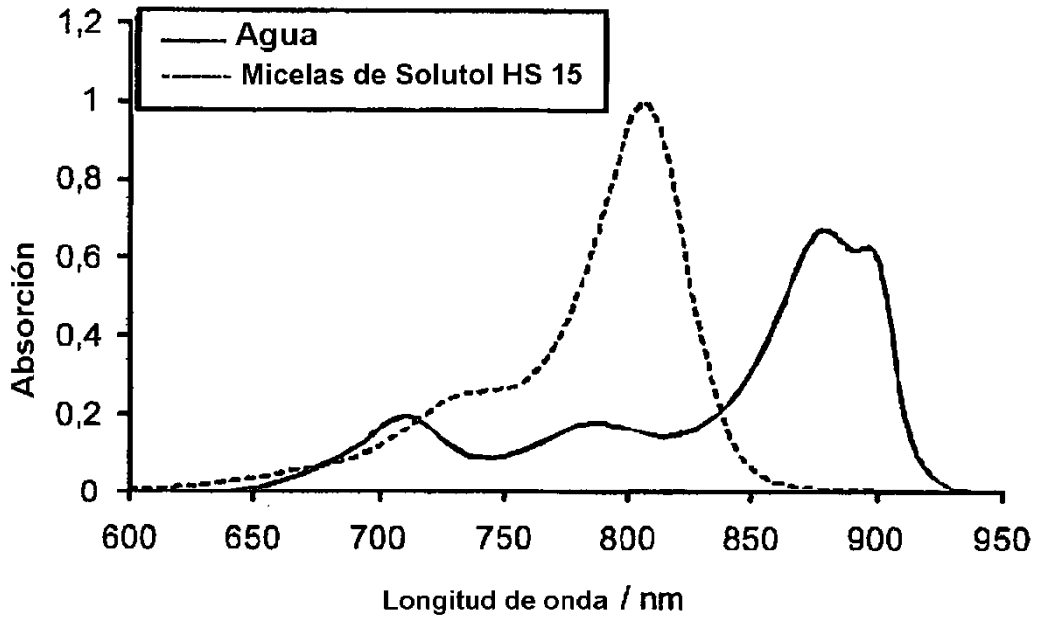


Fig. 6C:

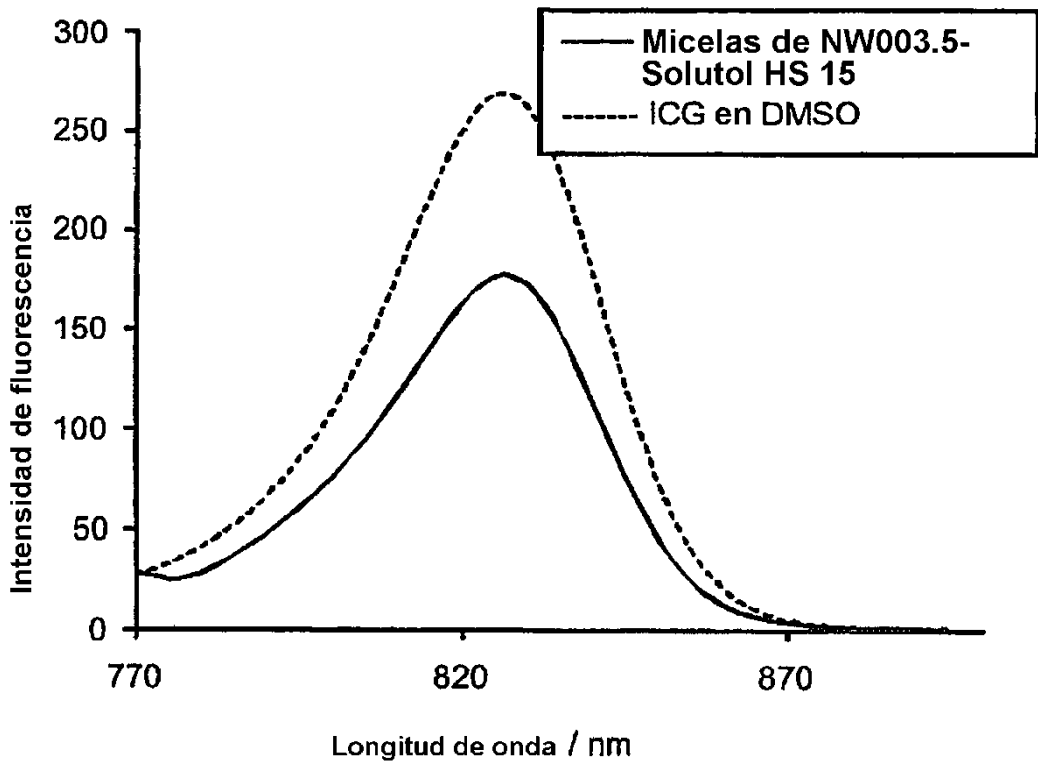


Fig. 6D:

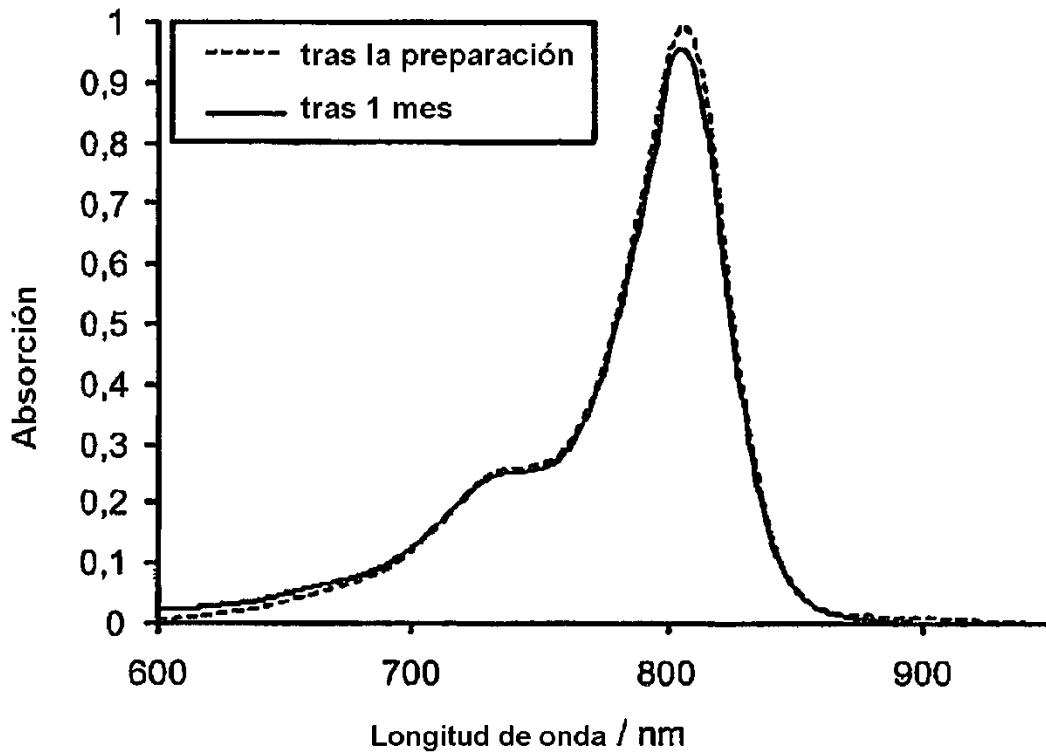


Fig. 7A:

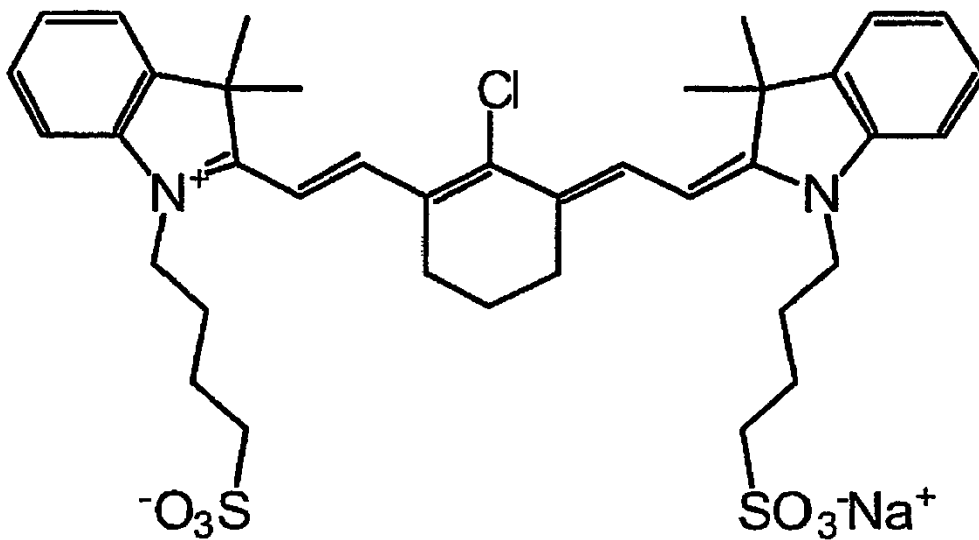


Fig. 7B:

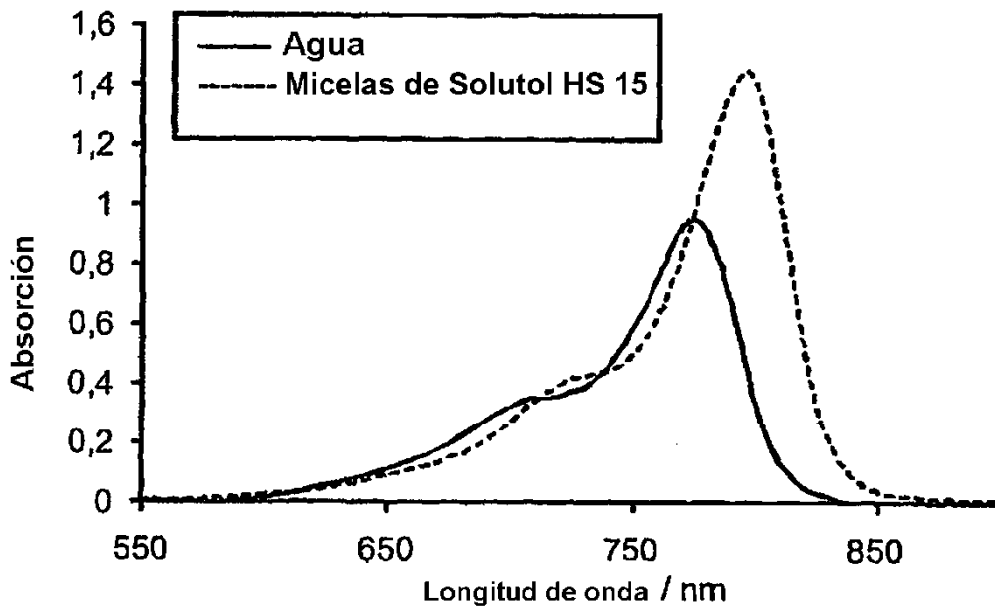


Fig. 7C:

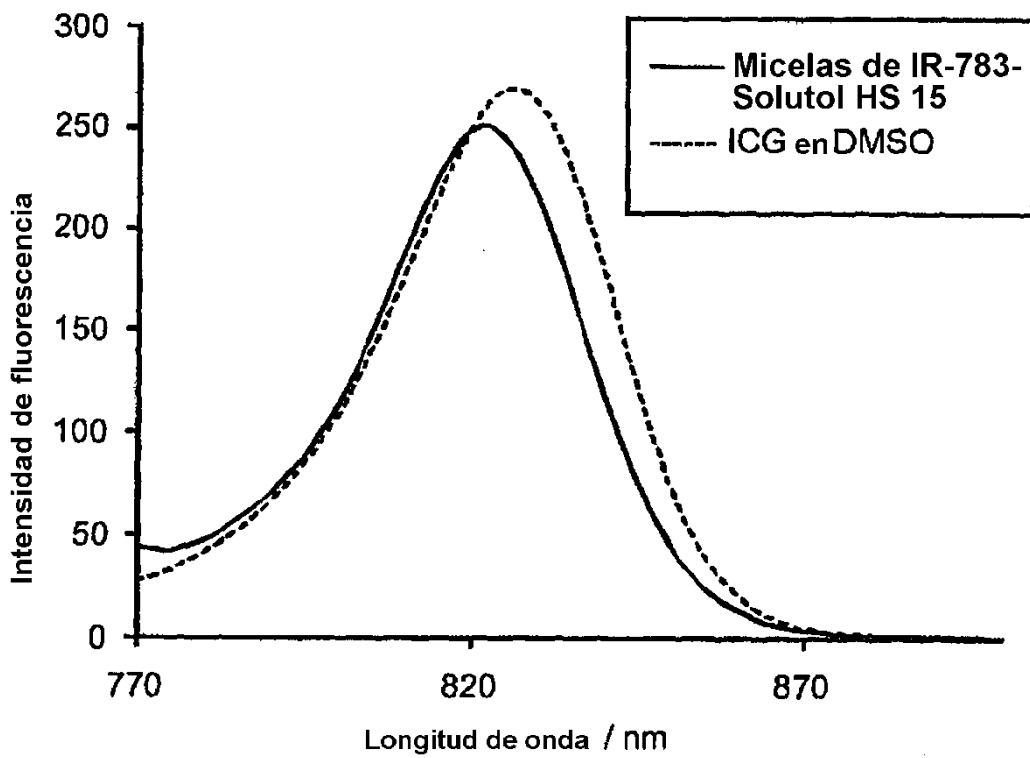


Fig. 7D:

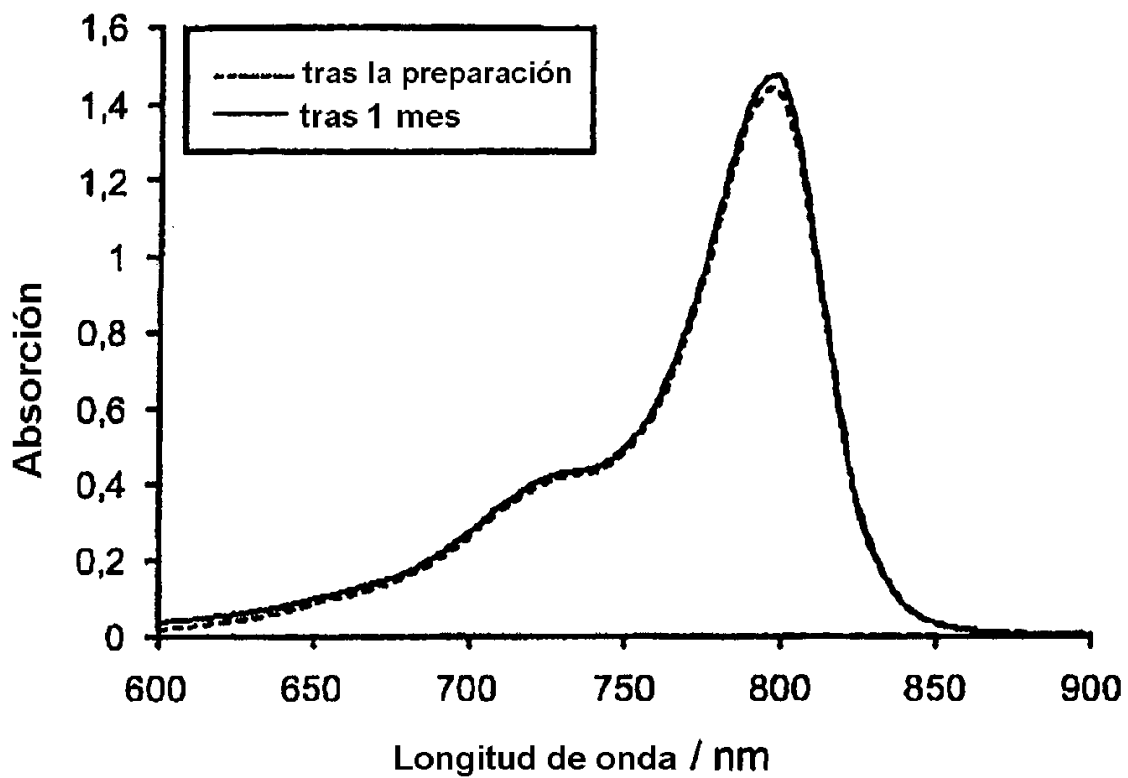


Fig. 8A:

