

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 781**

51 Int. Cl.:

A61K 49/04 (2006.01)

A61K 49/14 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

A61B 6/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2003** **E 03756863 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016** **EP 1551292**

54 Título: **Método por imágenes para administración mejorada por convección de agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

24.09.2002 US 413673 P

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

07.09.2016

73 Titular/es:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)

**The National Institute of Health Office of Technology Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, MD 20852, US**

72 Inventor/es:

**OLDFIELD, EDWARD, H.;
LONSER, RUSSELL, R.;
GARMESTANI, KAYHAN y
BRECHBIEL, MARTIN, W.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 581 781 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

Método por imágenes para administración mejorada por convección de agentes terapéuticos

Solicitudes relacionadas

5 Está reivindicada el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos No. 60/413,673, presentada el 24 de septiembre de 2002.

Campo

La invención se relaciona en general con la administración mejorada por convección (CED) de agentes terapéuticos. Más específicamente, la invención se relaciona con un método para monitorizar la distribución de agentes terapéuticos a medida que se mueven a través de tejido sólido durante la CED.

10 Antecedentes

Las enfermedades intrínsecas del sistema nervioso central (CNS), incluyendo el cerebro, el bulbo raquídeo, la médula espinal y los nervios periféricos, da como resultado frecuentemente morbilidad seria muerte o disfunción de movilidad puesto que no hay terapia quirúrgica o médica efectiva. Aunque existe un número creciente de compuestos potencialmente terapéuticos para tratar estos trastornos, la administración inadecuada de estos agentes al CNS limita su uso efectivo. Las técnicas de administración actualmente disponibles se basan en administración del fármaco sistémica o intratecal, las cuales tienen ambas una serie de limitaciones inherentes. Por ejemplo, la toxicidad sistémica y la incapacidad de muchos compuestos de cruzar desde el sistema circulatorio al CNS restringen frecuentemente la administración sistémica, e incluso si los agentes administrados sistémicamente entran efectivamente al CNS, su distribución es tanto heterogénea como no direccionada [véase, por ejemplo Langer, "New methods of drug delivery," Science, 249:1527-1533 (1990); Morrison, "Distribution models of drug kinetics," in Principles of Clinical Pharmacology, Atkinson et al (eds), Academic Press, New York, pp 93-112 (2001); y Pardridge, "Drug delivery to the brain." J Cereb Blood Flow Metab, 17:713-731 (1997)]. La penetración en el sistema nervioso después de la administración intratecal (incluyendo la inyección intratecal, la inyección intratumoral directa, instilación intracavitatoria o liberación controlada desde implantes poliméricos), así como la administración sistémica, se basa en la difusión y también produce dispersión no direccionada, heterogénea a través del CNS [vease, por ejemplo, Blasberg et al., "Intrathecal chemotherapy: brain tissue profiles after ventriculocisternal perfusion," J Pharmacol Exp Ther, 195:73-83 (1975)]. Las sustancias potencialmente terapéuticas tienen todavía que ser efectivas en el tratamiento de enfermedades intrínsecas del CNS debido a las limitaciones de estos métodos de administración.

La administración mejorada por convección (CED) puede ser utilizada para superar algunas de las restricciones asociadas con otros sistemas de administración. La CED utiliza un gradiente de presión para infundir las sustancias directamente en el espacio intersticial de un tejido sólido (infusión intersticial). Puesto que la CED se basa en un flujo en volumen (por convección), más que por difusión, puede ser utilizada para distribuir sustancias de peso molecular tanto pequeño como grande en volúmenes clínicamente relevantes dentro de tejido sólido [véase, por ejemplo, Morrison et al., "Focal delivery during direct infusion to brain: role of flow rate, catheter diameter, and tissue mechanics," Am J Physiol, 277: R1218-1229 (1999) and Morrison et al., "High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics," Am J Physiol, 266: R292-305 (1994)]. Adicionalmente, las sustancias son administradas a una concentración relativamente constante a través del volumen de distribución.

Los factores que influyen en la administración del agente terapéutico por CED incluyen el tipo de tejido infundido (por ejemplo, materia blanca o gris) y las propiedades de enlazamiento al tejido, metabolismo y permeabilidad microvascular del agente. Además, la rata de flujo volumétrico, duración de la infusión y el tamaño de la cánula (o catéter) utilizado para administrar una infusión puede afectar la distribución de agentes terapéuticos administrados por CED.

De particular preocupación durante la CED es el flujo retrógrado (retroflujo) a lo largo del eje de la cánula que se utiliza para administrar la infusión a un tejido. El retroflujo puede producir que los agentes terapéuticos infundidos alcancen tejido no buscado, y produzcan subexposición del objetivo previsto. Los estudios teóricos de los factores que afectan el retroflujo indican que puede ser minimizado utilizando una cánula de diámetro pequeño, y que puede mantenerse un retroflujo mínimo compensando un incremento en la rata de flujo con un descenso similar en el radio de la cánula. Sin embargo, el control de retroflujo sigue siendo una preocupación, particularmente si la CED se utiliza en una instalación clínica.

Adicionalmente, a la vez que una serie de estudios de la CED han demostrado que hay una relación apenas lineal entre el volumen de infusión administrado (volumen de infusión) y el volumen sobre el cual la infusión es distribuida finalmente (volumen de distribución), también muestran que otros factores que influyen en la distribución de un agente administrado por CED puede no siempre ser conocida para un sujeto dado. Estos factores incluyen la existencia de

rutas preferenciales para el flujo de fluido en la región diana (por ejemplo, tractos de fibra en materia blanca) que puede llevar a la distribución asimétrica del agente, densidad receptora de células variable que puede afectar la temporización y el grado de distribución de un agente, y volúmenes diana grandes que pueden requerir largos tiempos de infusión o múltiples sitios de administración.

- 5 Se ha aplicado la tomografía computarizada de emisión de fotones individual (SPECT) para visualizar la distribución de un agente administrado por CED, pero el método no ofrece resolución suficiente para proveer detalles de distribución del agente [véase, por ejemplo Laske et al., "Chronic interstitial infusion of protein to primate brain: determination of drug' distribution and clearance with single-photon emission computerized tomography imaging," J. Neurosurgery, 87: 586-594 (1997)]. Como tal, el SPECT provee solamente un estimativo del volumen de distribución
10 y no da información detallada acerca de la forma de la envoltura de infusión en el tejido.

Mardor Y et al., Mardor Y et al "Monitoring response to convection-enhanced taxol delivery in brain tumor patients using diffusion-weighted magnetic resonance imaging" Cancer Research 20010701 US Vol 61, no 13, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 4971-4973 ISSN: 0008-5472 divulga el uso de MRI pesado por difusión (DWMRI) para monitorizar los efectos de la CEDD intramural en los pacientes con tumor cerebral tratados con Taxol.

- 15 La WO 00/07652 A1, divulga un dispositivo y método para administración direccionado de fármaco, y especialmente la infusión intracraneana o administración de fármaco por retroperfusión utilizando estereotaxis magnética no lineal en combinación con imágenes por resonancia magnética y/o visualización por rayos X.

- Lonser Russel R et al "Direct convective delivery of macromolecules to peripheral nerves" Journal of Neurosurgery, American Association of Neurological Surgeons, US, vol 89, no 4, 1 October 1998 (1998-10-01), pages 610-615, ISSN: 0022-3085 divulga un método de administración por convección intraneural de macromoléculas que provee una
20 distribución homogénea, direccionada, reproducible y segura de la infusión a nervios periféricos.

- Puesto que muchos agentes terapéuticos, especialmente los utilizados para destruir tejidos, tales como tejido canceroso, son altamente tóxicos, el control en el sitio de la administración durante la CED es especialmente importante en la instalación clínica, donde la minimización de los efectos colaterales es una preocupación. Un método
25 que permita un control más preciso sobre el proceso de CED ayudaría a asegurar la administración apropiada de agentes terapéuticos a regiones diana de tejidos sin exposición del tejido circundante a los agentes. Tal método llenaría una necesidad largamente sentida y hasta ahora no satisfecha en el arte.

Resumen de la divulgación

- 30 La invención está definida en las reivindicaciones anexas. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico es divulgado para la manufactura de una solución de medicamento, caracterizado porque las imágenes se adquieren mediante una técnica de imágenes por MRI o CT y porque el trazador es

(i) un quelato metálico de un ión de metal paramagnético conjugado a una molécula portadora que consiste de una albúmina, un dendrímero de polialquilenimina o un dendrímero de poliamidoamina; o

(ii) un agente de contraste para CT yodado; o

- 35 (iii) un agente de contraste para CT yodado conjugado al agente terapéutico o a una albúmina.

- Se divulgan métodos para administrar un agente terapéutico y generar imágenes exacta y rápidamente de la distribución y/o la concentración del agente terapéutico a medida que se mueve a través del tejido cerebral sólido durante la administración mejorada por convección (CED). Los métodos demuestran proveer administración controlada y direccionada de agentes terapéuticos a sustancialmente solo la región diana prevista de tejido, por lo tanto, por ejemplo, incrementando la seguridad con la cual los agentes terapéuticos altamente tóxicos pueden ser administrados a tejidos sensibles en el cerebro. En una realización, un trazador, el cual es detectable por imágenes de resonancia magnética y/o tomografía computarizada por rayos X, es coinfundido con un agente terapéutico y utilizado para monitorizar la distribución y/o concentración del agente terapéutico a medida que se mueve a través del tejido sólido. El movimiento del trazador puede ser monitorizado para detectar administración no deseada del agente
40 terapéutico por fuera de un volumen diana dentro de un tejido cerebral sólido, y verificar que el agente terapéutico está alcanzando la diana a la concentración apropiada. En algunas realizaciones, el trazador está conjugado directamente al agente terapéutico. Alternativamente, un trazador separado que se distribuye a través del tejido a una rata que puede ser correlacionada exactamente con la distribución del agente terapéutico funciona como subrogado para seguir la distribución del agente terapéutico. En cualquier caso, la velocidad con la cual las imágenes pueden ser generadas, acoplada con una correlación inesperadamente exacta entre la distribución del trazador y la distribución del agente
45 terapéutico, hace posible administrar agentes terapéuticos sustancialmente solo a la región de tejido diana, por ejemplo, sustancialmente solo a la región de un tejido ocupada por un tumor. Adicionalmente, también se demuestra una correlación exacta entre la intensidad de señal de las imágenes y la concentración del agente terapéutico,
50

haciendo posible confirmar la administración del agente terapéutico a una región direccionada de tejido cerebral sólido en una concentración deseada.

Cualquier descripción aquí que caiga por fuera del alcance de las reivindicaciones anexas representa el arte anterior útil para emprender la invención reivindicada.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una fotografía que muestra un sistema de cánula para CED. La cánula externa (por debajo de la moneda) y la cánula de infusión interna (por encima de la moneda) se muestran separadamente.

10 La figura 2 es una serie de imágenes de resonancia magnética sopesadas T1 obtenidas inmediatamente después de la terminación de la infusión de 120 μ l de albúmina enlazada a gadolinio en el puente troncoencefálico. Las imágenes sagital (A), axial (B), y de corona (C) a través de la región del bulbo raquídeo demuestran claramente la región de infusión (área blanca), y casi el llenado completo del puente troncoencefálico.

15 La figura 3 es una serie de imágenes de resonancia magnética sopesadas T1 en tiempo real en los planos de corona (A) y sagital medio (B-H) en diversos puntos del tiempo durante la infusión por CED de albúmina-(Gd-1B4M)₅ en las regiones pontino y de cerebro medio del bulbo raquídeo (volumen total de infusión 85 μ l). La imagen de corona (A) demuestra la posición de la punta de la cánula de infusión interna (flecha) justo antes de iniciar la infusión de albúmina-(Gd-1B4M)₅, y las imágenes sagitales media (B-H) revelan que la región infundida con albúmina-(Gd-1B4M)₅ (área blanca) se incrementó a medida que la infusión avanzó. Los diversos volúmenes totales de infusión mostrados aquí como ejemplos incluyen 7.5 μ l (B), 15 μ l (C), 30 μ l (D), 40 μ l (E), 50 μ l (F), 65 μ l (G), y 85 μ l (H).

20 La figura 4 es una gráfica que muestra la relación lineal ($R^2=0.94$) entre el volumen de infusión (V_i) y el volumen de distribución (V_d) en primates infundidos con albúmina-(Gd-1B4M)₅. La relación $V_d:V_i$ observada fue 8.7 ± 1.2 (media $\pm$ S.D.). Los círculos negros, los cuadrados abiertos y los triángulos negros representan separadamente los datos derivados de tres animales.

25 La figura 5 es una gráfica que muestra que la CED de la albúmina-(Gd-1B4M)₅ permite la correlación de volumen predecible de distribución (V_d) (determinado por imágenes en resonancia magnética en tiempo real) con respecto a la relación de volumen de infusión (V_i) en los primates a lo largo de diversos volúmenes de infusión. La línea horizontal representa la relación $V_d:V_i$ media global de 8.7 ± 1.2 (media $\pm$ S.D.).

La figura 6 es una imagen de resonancia magnética sopesada T1 de corona en un animal infundido con albúmina-(Gd-1B4M)₅, que muestra la línea a través de la región infundida a lo largo de la cual se inhibió la intensidad de la imagen para generar la gráfica de la figura 7.

30 La figura 7 es un perfil de línea que demuestra el patrón de intensidad inesperadamente en forma de cuadrado (a través de la línea mostrada en la figura 6) indicativo de una concentración relativamente uniforme sobre la región de infusión, y una caída aguda en la concentración en los bordes de la región infundida.

35 La figura 8 es una gráfica que muestra el cambio en volumen de distribución desde inmediatamente después de la infusión (día 0) a puntos más distantes en el tiempo en dos animales diferentes (círculos abiertos y cuadrados negros). El incremento en el día 1 postinfusión en volumen de distribución fue de 35% para el animal 2 y 41% para el animal 3.

40 La figura 9 muestra imágenes de CT axial (superior) y de corona (inferior) de ácido iopanoico-BSA infundidos. Los volúmenes discretos están localizados en y a través del putamen diana. La forma de las infusiones sigue contornos anatómicos, con alguna dispersión hacia la materia blanca adyacente. La intensidad de la señal es relativamente uniforme a, a-130 μ l de infusión, b-200 μ l de infusión, y c-235 μ l de infusión. Todas las infusiones fueron llevadas a cabo a 1 μ l/min.

45 La figura 10 muestra imágenes de MRI axial (superior) y de corona (inferior) después de la infusión de gadolinio-DTPA:HSA. Con una resolución incrementada de la imagen, las distribuciones dentro del putamen se ven claramente. A volúmenes mayores de infusión se perfusiona la materia blanca circundante. La intensidad de la señal es relativamente uniforme a través de una infusión de a-130 μ l, infusión de b-185 μ l e infusión de c-235 μ l. Todas las infusiones fueron llevadas a cabo a 1 μ l/min.

La figura 11 muestra imágenes de MIR de corona que muestran que el área perfusionada de la figura 10 no se extiende hacia el tracto óptico. En los dos animales mostrados, la infusión alcanzó el aspecto inferior del putamen y rodeo, pero no penetró, el tracto óptico (flechas).

50 La figura 12 muestra la distribución uniforme del trazador subrogado ácido iopanoico:albúmina sobre CT. Nótese las formas comparables sobre las regiones perfusionadas sobre QAR y las imágenes CT (a y b). Los perfiles de línea

vertical (c) y horizontal (e) de la sección QAR (a) muestra un patrón típico, el cual está caracterizado por una línea base plana, una pendiente por etapas en el borde, y una meseta de intensidad de señal de pico dentro del área de infusión, e indica la concentración uniforme de ^{14}C -albúmina en el área perfusionada. Perfiles de línea similares (d, f) a través de la imagen CT (b) también muestran el gradiente por etapas en los bordes de la región perfusionada.

5 La figura 13 muestra la distribución uniforme del trazador subrogado gadolinio:albúmina en una región cerebral diana. Los perfiles de línea vertical (e, f) y horizontal (c, d) de las imágenes coincidentes de QAR (a) y MRI (b) muestran un patrón de onda cuadrado típico, indicativo de la distribución uniforme del trazador de ^{14}C -albúmina y gadolinio-albúmina en el área perfusionada.

10 Nótese las formas similares de los perfiles de línea para las dos modalidades de imágenes. El eje vertical ha sido truncado como se muestra.

La figura 14 es una gráfica que muestra la correlación de la concentración de yodo y la intensidad de señal en CT. Utilizando estándares de homogenizado de cerebro *in vitro* que contienen tanto el trazador de albúmina marcado con ^{14}C y el subrogado, la correlación entre las unidades Hounsfield de CT y la radioactividad fue lineal con un valor de r^2 que excedía de 0.995.

15 Descripción detallada

La discusión y ejemplos que siguen se entenderán mejor con referencia a las siguientes abreviaturas y términos.

I. Abreviaturas

CED – administración mejorada por convección

MRI – imágenes de resonancia magnética

20 CT – tomografía computarizada de rayos X

1B4M – ácido 2-(p-isotiocianatobencil)-6-metildietilentríamina pentaacético.

QAR – autorradiografía cuantitativa

HSA-(Gd-1B4M)₅ – albúmina de suero humano conjugada a 5 quelatos de gadolinio de ácido 2-(p-isotiocianatobencil)-6-metildietilentríamina pentaacético.

25 BSA-(Gd-1B4M)₅ – albúmina de suero bovino conjugado a 5 quelatos de gadolinio de ácido 2-(p-isotiocianatobencil)-6-metildietilentríamina pentaacético.

DAB-Am-64-(1B4M-Gd)₆₄ – dendrímero de polipropileno tetrahexacontaamina con un núcleo de diaminobutano conjugado a 64 quelatos 1B4M-Gd.

VI – volumen de infusión

30 Vd – volumen de distribución

GFAP – anticuerpo de proteína fibrilarmente ácida anti-glial

II. Términos

35 Al menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende normalmente por una persona de experiencia normal en el arte al cual pertenece esta invención. Los términos singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente indique otra cosa. De la misma manera, la palabra “o” se entiende con la inclusión de “y” a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

“Que comprende A o B” indica que incluye A o B o incluye A y B a menos que se indique otra cosa.

40 El término “sujeto” se refiere a animales, incluyendo mamíferos. Ejemplos de sujetos incluyen humanos y animales veterinarios tales como perros, gatos, reses, ovejas, caballos etc.

El término “imágenes” se refiere a cualquier técnica para formar una representación de estructuras anatómicas dentro de un cuerpo. Ejemplos de técnicas de imágenes incluyen técnicas sónicas (tales como ultrasonido) y técnicas electromagnéticas, por ejemplo, metodologías radiológicas que utilizan rayos X (tales como rayos X por CT o convencionales), o un campo magnético en combinación con ondas de radio (por ejemplo, MRI).

- 5 El término “solución” se refiere a una composición que comprende un solvente y un soluto, e incluye soluciones y suspensiones verdaderas. Ejemplos de soluciones incluyen un sólido, líquido o gas disuelto en un líquido y partículas o micelas suspendidas en un líquido.

10 Tal como se utiliza aquí, el término “infusión intersticial por convección” se refiere a administración mejorada por convección. La infusión intersticial por convección es un método de microinfusión a alto flujo que provee una administración mejorada por convección de agentes terapéuticos. El método involucra posicionar la punta de un catéter de infusión dentro de una estructura de tejido y suministrar una solución que comprende un agente terapéutico a través del catéter a la vez que se mantiene un gradiente de presión desde la punta del catéter durante la infusión. Después de que el catéter de infusión ha sido posicionado en el sitio del tejido, se conecta a una bomba que administra una solución y mantiene un gradiente de presión deseado a lo largo de la administración del agente. La administración
15 mejorada por convección está descrita, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,720,720. El término “infusión” se refiere a una solución administrada por infusión intersticial por convección.

20 Tal como se utiliza aquí, “agente terapéutico” se refiere a cualquier molécula que puede ser administrada a un tejido sólido para tratar una condición del tejido. Agentes terapéuticos incluyen agentes antineoplásicos, compuestos radiyodados, toxinas (incluyendo toxinas proteínicas), fármacos citostáticos o citolíticos, vectores genéticos y virales, factores neurotróficos, citoquinas, enzimas y agentes para apuntar a lesiones de sitios específicos. Los agentes terapéuticos también incluyen cualquier molécula terapéutica que está direccionada selectivamente hacia una célula que expresa un antígeno particular, por ejemplo, inmunotoxinas (véase, por ejemplo, Laske et al., "Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors," Nature Medicine, 3: 1362-1368, 1997).

25 El término “trazador” se refiere a una sustancia que es detectable por técnicas de imágenes, tales como imágenes basadas en resonancia magnética o rayos X, por ejemplo, MRI o CT (en algunos ejemplos, un trazador es una molécula que contiene al menos una unidad estructural para imágenes). En ejemplos particulares, el trazador es o no es un agente terapéutico en sí mismo. En otros, el trazador está conjugado a un agente terapéutico. Un trazador y un agente terapéutico, aunque separados, también pueden ser administrados juntos por infusión intersticial por
30 convección y el trazador puede ser monitorizado para seguir el proceso de infusión. El término “trazador subrogado”, cuando se usa, se refiere a una molécula diferente a un agente terapéutico y no conjugada al mismo que es detectable por imágenes, por ejemplo, por MRI o CT.

35 Una “unidad estructural para imágenes” se refiere a un grupo de átomos detectables en una técnica de imágenes, por ejemplo, en una técnica basada en resonancia magnética o rayos X, tal como MRI o CT. “Unidad estructural de contraste para MR” se refiere a un grupo de átomos detectable en un experimento por MRI en virtud de un contraste diferencial con respecto a los tejidos o estructuras circundantes. “Unidad estructural de contraste para rayos X” se refiere a una unidad estructural para imágenes que es detectable por una técnica de imágenes por rayos X (tal como CT) en virtud del contraste diferencial con respecto a los tejidos o estructuras circundantes. Desde luego, algunas unidades estructurales para imágenes pueden ser tanto una unidad estructural para contraste por MR, y una “unidad
40 estructural para contraste por rayos X”.

45 El término “tejido diana” se refiere a una diana física (usualmente anatómica), por ejemplo, en el cerebro. Ejemplos de tales tejidos diana incluyen un tumor, tal como un tumor cerebral, un quiste, un foco de apoplejía en el cerebro para ser sometido a ablación, o una subestructura neuroanatómica particular (tal como el puente troncoencefálico, el cerebro medio, el tálamo, el tracto óptico o el córtex occipital). El tejido objetivo puede ser una diana física completa o una porción de la misma a la cual se desea administrar el agente terapéutico.

50 La expresión “sustancialmente solo al tejido diana” se refiere a la administración de un agente terapéutico a un tejido diana sin administración significativa del agente por fuera del tejido diana, lo cual está caracterizado por una caída por pasos en la concentración del agente terapéutico (según se refleja, por ejemplo, mediante una caída por pasos en una señal debida a un trazador utilizado para seguir la distribución del agente terapéutico) en la periferia del tejido diana. Por ejemplo, la administración sustancialmente solo al tejido diana puede ser reflejada por una gota en la concentración de agente terapéutico (o una intensidad de señal del trazador) de más de 75% (tal como más de 85% o 95%) sobre una distancia de unos pocos milímetros (tal como una distancia de 1-4 mm) desde la periferia del tejido diana.

55 El acto de “monitorizar” se refiere a obtener imágenes en serie del trazador a medida que se distribuye (junto con o en proporción a la distribución del agente terapéutico) dentro de un tejido sólido. Monitorizando la distribución del trazador, la localización y volumen de distribución de la infusión dentro del tejido puede determinarse en cualquier momento durante el proceso de infusión. Las imágenes en series pueden ser obtenidas a cualquier rata máxima que el instrumento de MRI o CT pueda obtener imágenes. Por ejemplo, pueden obtenerse imágenes en serie a intervalos

que varían desde unos pocos milisegundos hasta horas, pero más típicamente a intervalos de minutos, tales como intervalos de 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 30 minutos. El intervalo entre imágenes en serie puede variarse durante la infusión. En algunos casos, puede ser deseable obtener imágenes a intervalos cortos (por ejemplo, cada 5, 10 o 15 segundos) al comienzo del proceso de infusión para detectar retroflujo a lo largo de la cánula, o para verificar que la infusión está entrando al tejido diana deseado. Una vez que se ha confirmado la administración al sitio apropiado, el intervalo entre las imágenes puede ser alargado, y las imágenes pueden ser utilizadas para seguir el proceso de infusión, por ejemplo, para determinar si la infusión está alcanzando tejido por fuera del área diana o si el volumen deseado de distribución ha sido alcanzado. Cuando se requieren infusiones múltiples para completar el tratamiento de una región en particular de tejido sólido, el volumen de distribución de la primera infusión (e infusiones subsecuentes antes de la última), puede utilizarse para guiar la colocación de la cánula de tal manera que las porciones no tratadas de la región de tejido sólido puedan ser tratadas efectivamente mediante una infusión subsecuente.

La expresión “un volumen de distribución predeterminados” se refiere a una región de un tejido sólido en la cual se desea administrar un agente terapéutico. Por ejemplo, el volumen predeterminado puede corresponder con el volumen ocupado por un tumor, o el volumen predeterminado puede ser una región particular del cerebro que está direccionada para la destrucción (por ejemplo, el globus pallidus medio). El volumen predeterminado de distribución puede ser “sustancialmente similar” al volumen de distribución observado para un trazador que está siendo monitorizado para seguir la infusión. “Sustancialmente similar” se refiere a una diferencia en volumen o movilidad de menos de 20%, tal como menos de 10% o menos de 5%, entre los volúmenes de distribución o movilidades del trazador y el agente terapéutico. El volumen predeterminado de distribución también puede ser más pequeño o más grande que el volumen de distribución observado del trazador, en cuyo caso, puede utilizarse una correlación entre el volumen de distribución del trazador y el volumen de distribución del agente terapéutico para convertir la distribución del trazador observada a una distribución de agente terapéutico. Así, monitorizando la distribución del trazador, puede cesarse la infusión cuando el volumen predeterminado de distribución es alcanzado, independientemente de las movilidades relativas del trazador y el agente terapéutico en el tejido. Una determinación de si el trazador tiene o no una movilidad que es sustancialmente similar a un agente terapéutico, o una determinación de cómo el volumen de distribución de un trazador se correlaciona con el volumen de distribución del agente terapéutico puede ser determinada, por ejemplo, por estudios en animales que comparan el volumen de distribución de un agente terapéutico radiomarcado (determinado, por ejemplo, por QAR) con respecto al volumen de distribución determinado por MRI o CT para un trazador coinfundido (véanse, Ejemplos 1 y 2).

El término “proteína” se refiere a proteínas, polipéptidos y fragmentos de los mismos. Ejemplos de proteínas incluyen albúminas, tales como albúmina de suero humano o bovino; inmunoglobulinas tales como IgG; metaloproteínas tales como ferritina, hemoglobina y mioglobina; glicoproteínas, lipoproteínas; transferrina; proteínas de recubrimiento viral; y enzimas tales como acetiltransferasas.

Los materiales, métodos y ejemplos divulgados son solamente ilustrativos. Se divulgan aquí los siguientes Ejemplos.

III. Ejemplos

Se divulga un método para administración mejorada por convección de un agente terapéutico que provee una solución que comprende el agente terapéutico y un trazador, administrando la solución a un tejido sólido por infusión intersticial por convección, monitorizando la distribución del trazador a medida que se mueve a través del tejido sólido, y cesando la administración de la solución al tejido sólido cuando el agente terapéutico está distribuido en un volumen determinado dentro del tejido sólido. El movimiento del trazador a través del tejido sólido puede ser monitorizado por una técnica de imágenes tal como imágenes por resonancia magnética (tal como MRI) o rayos X, por ejemplo, tomografía computarizada (CT). Si se puede asumir, o se sabe que el trazador tiene una movilidad en el tejido sólido que es sustancialmente similar al agente terapéutico, la administración puede cesar cuando se observa que el trazador alcanza un volumen o región de distribución predeterminados, o alcanza o excede las fronteras del tejido diana. La administración también puede cesarse antes de que las fronteras del tejido objetivo sean alcanzadas por el trazador si se espera o se sabe que el agente terapéutico tiene una movilidad mayor en el tejido que el trazador. Por ejemplo, cuando se ha establecido una correlación entre las movilidades del trazador y el agente terapéutico, la administración puede ser cesada cuando la distribución observada del trazador corresponde con una distribución deseada del agente terapéutico.

Si el trazador no tiene una movilidad que sea sustancialmente similar al agente terapéutico, o no puede asumirse que tiene una movilidad sustancialmente similar al agente terapéutico (por ejemplo, porque el agente es altamente tóxico y la administración del agente dañará tejidos sensibles tales como tejido cerebral por fuera del tejido diana) el volumen de distribución del trazador que se observa puede ser convertido a un volumen de distribución del agente terapéutico utilizando una correlación entre los dos previamente establecida. Así, la monitorización del volumen de distribución para el trazador puede ser utilizada para determinar si el agente terapéutico ha alcanzado el volumen predeterminado de distribución, y, por ejemplo, se ha administrado sustancialmente solo al tejido diana.

El trazador puede comprender un quelato metálico, en un ejemplo, el trazador comprende un quelato metálico conjugado al agente terapéutico, y, en otros, el trazador comprende un quelato metálico conjugado a una molécula

portadora. Aunque la conjugación típicamente se refiere a la formación de un enlace covalente entre el quelato metálico y el agente terapéutico o la molécula portadora, otros tipos de enlaces (por ejemplo, iónico, dipolo-dipolo o van der Waals) pueden ser suficientes en algunos ejemplos.

Un quelato metálico es un complejo de un ión metálico y un grupo quelatante de metales (un grupo de átomos que sirve para enlazar el ión metálico). Ejemplos de grupos quelatantes incluyen aminas naturales y sintéticas, porfirinas, ácidos aminocarboxílicos, ácidos iminocarboxílicos, éteres, tioles, fenoles, glicoles y alcoholes, poliaminas, ácidos poliaminocarboxílicos, ácidos poliiminocarboxílicos, ácidos aminopolicarboxílicos, ácidos iminopolicarboxílicos, ácidos nitrilicarboxílicos, ácidos dinitrilopolicarboxílicos, ácidos polinitrilopolicarboxílicos, etilendiaminatetraacetatos, dietilendiaminapenta o tetraacetatos, poliéteres, politioles, criptandos, poliéter fenolatos, poliéter tioles, éteres de tioglicoles o alcoholes, poliaminofenoles, bien sea acíclicos, macrocíclicos, cíclicos, macrobíclicos o policíclicos, u otros ligandos similares que producen quelatos o ciplatos metálicos estables (incluyendo sepulcratos, sacrofaginas y éteres corona).

Ejemplos específicos de grupos quelantes de metales incluyen ácido 1,4,7,10-tetraazaolododecanotetraacético (DOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (DO3A), ácido 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecano-triacético (DOXA), ácido 1,4,7-triazaciclononanetriacético (NOTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecanotetraacético (TETA), DOTA-N(2-aminoetil)amida y DOTA-N(2-aminofenetil)amida, BOPTA, HP-DO3A, DO3MA, DTPA, y diversos derivados de los mismos. Se proveen ejemplos adicionales en Caravan et al., Chem. Rev., 99: 2293-2352 (1999) y Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,246,692, 5,292,868 y 5,434,287. Un ejemplo particularmente divulgado de un grupo quelante de metales es ácido 2-(p-isotiocianotobencil)-6-metildietilenetriamina pentaacético (1B4M). Puesto que es ventajoso para la generación de imágenes en vivo seleccionar un grupo quelante de metales capaz de enlazarse fuertemente a un ión metálico, se desea una alta constante de estabilidad para el quelato metálico.

Iones metálicos de los quelatos metálicos pueden ser iones paramagnéticos si el agente para la generación de imágenes va a utilizarse como un agente de contraste para MRI. Iones metálicos adecuados incluyen los que tienen números atómicos de 22-29 (inclusive), 42, 44 y 58-70 (inclusive) y tienen estados de oxidación de +2 o +3. Ejemplos de tales iones metálicos son cromo (III), manganeso (II), hierro (II), hierro (III), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), praseodimio (III), neodimio (III), samario (III), gadolinio (III), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III) e iterbio (III).

Si el agente de generación de imágenes macromolecular va a utilizarse como un agente de contraste para rayos X, el ión metálico puede ser seleccionado de los iones de W, Bi, Hg, Os, Pb, Zr, lantánidos, y combinaciones de los mismos. Si se desea un agente de contraste combinado para MRI/rayos X, el ión metálico puede ser seleccionado de los iones lantánido paramagnético. Si se desea un agente de generación de imágenes radiográficas, el metal puede ser radioactivo, tal como los isotopos radioactivos de In, Tc, Y, Re, Pb, Cu, Ga, Sm, Fe, o Co.

Pueden utilizarse agentes quelantes bifuncionales para formar conjugados de un quelato metálico y un agente terapéutico o una molécula portadora. Un agente quelante bifuncional es una molécula capaz de formar un enlace con otra molécula, tal como una proteína o un dendrímero, y también capaz de formar un quelato metálico enlazándose a un ión metálico. Agentes quelantes bifuncionales apropiados incluyen por lo tanto un grupo reactivo y un grupo quelante metálico, tal como los descritos previamente.

El grupo reactivo de un agente quelante bifuncional es un grupo de átomos que experimentará una reacción con otra molécula para formar un enlace, tal como un enlace covalente. Ejemplos de grupos reactivos incluyen grupos de ácido carboxílico, grupos amina diazotiazable, N-hidroxisuccinimidilo, ésteres, aldehídos, cetonas, anhídridos, anhídridos mixtos, haluros de acilo, maleimidas, hidracinas, benzimidatos, nitrenos, isotiocianatos, azidas, sulfonamidas, bromoacetamidas, yodoacetamidas, carbodiimidas, sulfonilcloruros, hidróxidos, tioglicoles, o cualquier grupo reactivo conocido en el arte como útil para la formación de conjugados. Si, por ejemplo, el agente terapéutico o molécula portadora es una proteína o un dendrímero que tiene grupos amino de superficie, el grupo reactivo puede ser un grupo funcional capaz de experimentar reacción con un grupo amina.

Ejemplos específicos de agentes quelantes bifuncionales incluyen derivados bifuncionales de ácido dietilenetriaminapentaacético (DTPA) tales como los divulgados en la Patente de los Estados Unidos No. 5,434,287 de Gansow et al. Otros ejemplos incluyen quelatos de ácido dietilenetriaminapentaacético polisustituido tales como los descritos por Gansow et al., en la Patente de los Estados Unidos No. 5,246,692. También son útiles agentes quelantes que comprenden ácido 1,4,7,10-Tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) y sus derivados. Ejemplos de derivados de DOTA bifuncionales se proveen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,428,154 de Gansow et al. y referencias en la misma.

Pueden prepararse trazadores haciendo reaccionar una molécula terapéutica o una molécula portadora con el grupo reactivo de un agente quelante bifuncional y luego hacer reaccionar el grupo quelante de metales del agente quelante bifuncional con un ión metálico.

Alternativamente, se hace reaccionar un ión metálico con el grupo quelante de metales del agente quelante bifuncional antes de hacer reaccionar el grupo reactivo del agente quelante bifuncional con un grupo de superficie del dendrímero. La quelación de metales se lleva a cabo típicamente en una solución, y de manera deseable evita el uso de ácidos o bases fuertes.

- 5 Los métodos para hacer reaccionar agentes quelantes bifuncionales con otras moléculas (tales como proteínas, agentes terapéuticos y dendrímeros) para formar conjugados, y para formar quelantes metálicos de los mismos, son bien conocidos. Por ejemplo, métodos para formar conjugados de quelatos metálicos de proteína se divulgan en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,246,692, 5,292, 868, 5,364,613, 5,434,287 y 6,274,713, y en la Patente Europea EP0882454. Métodos para formar conjugados de quelatos metálicos de dendrímeros se divulgan, por
10 ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,834,020 y en la Publicación PCT WO 93/06868.

- En otras realizaciones, donde se utiliza generación de imágenes por rayos X (tal como CT) para monitorizar CED, el trazador puede comprender un material radioopaco. Los materiales radioopacos también pueden ser utilizados para marcar proteínas (tales como albúminas) y dendrímeros (tales como dendrímeros DAB). Los materiales radioopacos adecuados son bien conocidos y se incluyen compuestos de yodo, compuestos de bario, compuestos de galio, compuestos de talio. Ejemplos específicos de materiales radioopacos incluyen bario, diatrizoato, aceite etiodizado, citrato de galio, ácido iocármico, ácido iocetámico, iodamida, iodipamida, ácido iodoxámico, iogulamida, iohexol, iopamidol, ácido iopanoico, ácido ioprocémico, ácido iosefámico, ácido iosérico, iosulamida meglumina, ácido iosumético, iotasul, ácido iotétrico, ácido iofalámico, ácido iotróxico, ácido ioxáglico, ácido ioxotrizoico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodona y cloruro talioso.

- 20 Cuando el trazador comprende una molécula portadora, la molécula portadora puede ser cualquier molécula diferente al agente terapéutico. En algunos ejemplos, la molécula portadora se selecciona de tal manera que el trazador tendrá una movilidad (u otra propiedad relacionada con el movimiento y eliminación desde el tejido) en un tejido sólido que es comparable al agente terapéutico. Ejemplos de moléculas portadoras adecuadas incluyen proteínas y dendrímeros.

- Ejemplos particulares de proteínas incluyen albúminas tales como albúmina de suero humano y albúmina de suero bovino.

- Los dendrímeros son moléculas altamente ramificadas, frecuentemente esféricas sintetizadas por secuencias de reacción reiterativas que empiezan a partir de una molécula núcleo que tiene múltiples grupos reactivos. Tipos particulares de dendrímeros incluyen dendrímeros de polialquilenimina y dendrímeros de poliamidoamina. Ejemplos y métodos particulares para producir dendrímeros de poliamidoamina, entre otros tipos, se proveen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,507,466, 4,558,120, 4,568,737, 4,694,064, 4,737,550 y 4,837,599.

- Los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Aldrich (Milwaukee, WI). Ejemplos de dendrímeros de polialquilenimina incluyen polipropilenimina, polibutilenimina, u otros dendrímeros que tienen ramificaciones de cadena alquilo C3 o superiores, tales como ramificaciones de cadenas alquilo C3-C10, que se extienden desde una molécula central. Ejemplos de moléculas centrales adecuadas incluyen amoníaco, etilendiamina, propilendiamina, diaminobutano y otras poliaminas tales como tris-aminoemilamina, cicleno, hexaazaciclooctadecano, 1,5-diaminopentano, tetilenetramina, trietileneteframina, 1,4,8,11-tetraazaundecano, 1,5,8,12-tetraazaundodecano, y 1,5,9, 13-tetraazatridecano.

- Un ejemplo particular de un dendrímeros de polipropilenimina es un dendrímero de polipropilenimina con un núcleo diaminobutano (dendrímero DAB). Ejemplos de dendrímeros de polipropilenimina incluyen aquellos con moléculas centrales tales como amoníaco, etilendiamina, propilendiamina, o alguna otra poliamina. Típicamente, la superficie del dendrímero de polipropilenimina tendrá uno o más grupos amino. Sin embargo, algunos o todos los grupos amino de superficie pueden ser modificados, por ejemplo, para proveer otros grupos reactivos o grupos cargados, hidrofílicos y/o hidrófobos sobre la superficie.

- Un ejemplo particular de un dendrímero DAB es el dendrímero de polipropilenimina tetraamina, Generación 1 [DAB-Am-4; N,N,N',N'-tetrakis(3-aminopropil)-1,4-butanediaminapolypropilenimine tetramina]. La DAB-Am-4 denota un dendrímero de polipropilenimina con núcleo de diaminobutano que tiene 4 grupos amino sobre su superficie. Ejemplos adicionales incluyen dendrímero de polipropilenimina octaamina, Generación 2.0 [DAB-Am-8; 4,17-bis(3-aminopropil)-8,13-bis[3-bis(3-aminopropil)-amino] propil]-4, 8,13,17-tetrazaeicosane-1,20-diamina], que tiene 8 grupos amino sobre su superficie; dendrímeros de polipropilenimina hexadecaamina, Generación 3.0 [DAB-Am-16; [-CH₂CH₂N(CH₂)₃N[(CH₂)₃NH₂]₂]₂]₂], que tiene 16 grupos amino sobre su superficie; dendrímero de polipropilenimina dotriacontaamina, Generación 4.0 [DAB-Am-32; [-CH₂CH₂N(CH₂)₃N[(CH₂)₃NH₂]₂]₂]₂]₂], que tiene 32 grupos amino sobre su superficie; dendrímero de polipropilen tetrahexacontaamina, Generación 5.0 [DAB-Am-64; [-CH₂CH₂N(CH₂)₃N[(CH₂)₃NH₂]₂]₂]₂]₂], que tiene 64 grupos amino sobre su superficie; y dendrímeros DAB-Am de generación superior tal como DAB-Am-128, DAB-Am-256, y DAB-Am-512.

- Los dendrímeros DAB-Am de generaciones 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 están disponibles comercialmente en Aldrich

(Milwaukee, WI). Los dendrímeros DAB-Am también pueden ser sintetizados a partir de un núcleo iniciador de diaminobutano de acuerdo con los métodos divulgados en Womer, y Mulhaupt, *Angew Chem., Int. Ed. Engl.* 32: 1306-1308, 1993. También se describen métodos similares en de Brabander-van den Berg y Meijer (*Angew Chem., Int. Ed. Engl.* 32: 1308, 1993). Los dendrímeros de polipropilenimina que tienen otros núcleos iniciadores, tales como amoníaco, etilendiamina, propilendiamina, y otras poliaminas pueden ser sintetizados de acuerdo con estos métodos. Pueden utilizarse esquemas similares para sintetizar dendrímeros de polibutilenimina y polialquilenimina superiores.

Agentes terapéuticos incluyen agentes antineoplásicos, compuestos radioyodados, toxinas (incluyendo toxinas proteínicas), fármacos citostáticos o citolíticos, factores neurotróficos, citoquinas, enzimas y agentes para lesiones diana de sitios específicos. Los agentes terapéuticos también incluyen cualquier molécula terapéutica que es direccionada selectivamente a una célula que expresa un antígeno en particular, por ejemplo, una inmunotoxina (véase, por ejemplo, Laske et al., "Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors," *Nature Medicine*, 3: 1362-1368, 1997). Ejemplos de agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen: aminoglutetimida, azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfan, carmustina, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabidina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, taxol, etopósido, fluorouracilo, interferón-alfa, lomustina, mercaptopurina, metotrexato, mitotano, procarbazona HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina.

Las inmunotoxinas combinan la toxicidad de proteínas vegetales y bacterianas naturales con la capacidad de enlazamiento específica del tejido a los anticuerpos, más particularmente anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, toxinas tales como proteína antiviral de fitolaca, toxina del cólera, toxina pertusis, ricina, gelonina, abrina, exotoxina de la difteria, o exotoxina de las *Pseudomonas* pueden ser conjugadas a un anticuerpo. Las unidades estructurales de toxinas también pueden ser radionúclidos emisores de alta energía tales como cobalto-60.

Se han establecido numerosas técnicas adecuada para enlazar diversas moléculas (incluyendo toxinas y unidades estructurales para imágenes por MR o CT) a anticuerpos. La yodación, por ejemplo, puede ser lograda utilizando el método de la cloramina-T descrito por S. Mills, et al., ¹²³I-Radiolabeling of Monoclonal Antibodies for In Vivo Procedures, *Hybridoma* 5: 265-275 (1986). Esta técnica puede ser utilizada para efectuar la yodación para hacer que el anticuerpo sea radioopaco, o para unir un radionúclido, tal como ¹²⁵I o ¹³¹I. Existe una serie de técnicas para enlazar diversas moléculas, tales como moléculas pequeñas, enzimas y proteínas, a anticuerpos. Por ejemplo, pueden conjugarse muchos compuestos que contienen ácido carboxílico (tales como metotrexato) a inmunoglobulinas a través de un intermediario de éster activo, formado, por ejemplo, haciendo reaccionar el compuesto con N-hidroxisuccinimida y diciclohexilcarbodiimida (véase, por ejemplo, Deguchi, et al., "Effect of Methotrexate-Monoclonal Anti-Prostatic Acid Phosphatase Antibody Conjugate on Human Prostate Tumor," *Cancer Res.* 46: 3751-3755 (1986)). Otros agentes terapéuticos, tales como clorambucil, se enlazarán directamente a los anticuerpos a pH bajo (véase, por ejemplo, Ghose, et al., "Immunochemotherapy of Human Malignant Melanoma with Chlorambucil-Carrying Antibody," *Europ. J. Cancer* 11: 321-326 (1975)). Fármacos que contienen aminoazúcares tales como adriamicina y daunomicina pueden ser enlazados covalentemente a anticuerpos por oxidación con peryodato del fármaco, seguida por enlazamiento del fármaco oxidado a la inmunoglobulina y reducción subsecuente del producto con borohidruro de sodio [véase, por ejemplo, Hurwitz, et al., "The Covalent Binding of Daunomycin and Adriamycin to Antibodies," *Cancer Res.* 35: 1175-1181 (1975)].

También existen técnicas convencionales para enlazar otras proteínas a anticuerpos. Por ejemplo, pueden introducirse grupos tiol libres al anticuerpo haciendo reaccionar el anticuerpo con N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) para introducir grupos disulfuro de 2-piridilo, los cuales pueden ser reducidos entonces con ditiotritol para dejar grupos tiol libres. La proteína que va a ser enlazada del anticuerpo es incubada entonces con SPDP. Al mezclar la proteína modificada con SPDP con el anticuerpo que contiene los grupos tiol libres, se enlazan los dos materiales.

Pueden emplearse otras técnicas conocidas, tales como el uso de espaciadores de dextrano T-10 para incrementar el número de unidades estructurales de fármaco enlazadas a moléculas de anticuerpo, así como pueden mezclarse métodos de anhídrido para conjugación de fármacos. El compuesto 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (ECDI) puede ser utilizado para enlazar fármacos que contienen amino a grupos carboxilo de anticuerpos. Alternativamente, puede utilizarse glutaraldehído para entrecruzamiento entre grupos amino libres del anticuerpo y grupos amino en el compuesto que va a ser conjugado al mismo.

También pueden enlazarse radionúclidos y unidades estructurales para imágenes a los anticuerpos haciendo reaccionar los agentes quelantes bifuncionales discutidos más arriba con un anticuerpo. Aún otras técnicas adecuadas incluyen el método de yodógeno divulgado en M. Pimm, et al., "In Vivo Localization of Anti-Osteogenic Sarcoma 791 T Monoclonal Antibody," *Int. J. Cancer* 30: 75 (1982), y yodación directa con yoduro de sodio radioactivo.

Independientemente de si el trazador está comprendido del agente terapéutico o de una molécula portadora, el trazador se administra en una cantidad suficiente para producir diferencias detectables en la intensidad de la imagen del tejido sólido utilizando bien sea MRI o CT o ambos. Para MRI, tales diferencias pueden ser detectadas en una imagen sopesada T₁ o T₂ tomada algún tiempo después de que se administra el agente para imágenes. La diferencia puede ser debida bien sea a un incremento o a un descenso en la intensidad del tejido sólido con respecto al tejido

circundante cuando se compara a una imagen del tejido sólido obtenida antes de la administración del agente. En ejemplos particulares, puede proveerse una diferencia detectable en la intensidad de imagen por MRI administrando entre aproximadamente 0.001 mmol Gd/kg y aproximadamente 0.10 mmol Gd/kg, por ejemplo, administrando entre aproximadamente 0.003 mmol Gd/kg y aproximadamente 0.03 mmol Gd/kg. La generación de imágenes puede comenzar en cualquier momento desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 2 horas después de la administración, tal como entre aproximadamente 3 minutos y 60 minutos después de la administración.

Durante la CED, la solución administrada al tejido sólido puede ser administrada a una rata entre 0.1 µL/minuto y 15 µL/minuto.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la preparación y caracterización de un trazador que comprende una proteína conjugada a un quelato metálico, y su uso en la siguiente CED, en tiempo real e *in vivo*, en el bulbo raquídeo de primates utilizando MRI.

Se conjugó ácido 2-(p-isotiocianotobenzil)-6-metildietilén amina pentaacético (1B4M) [véase, Brechbiel y Gansow, Bioconjug Chem, 2:187-194 (1991)] a albúmina de suero humano (HSA) por modificación de un método descrito previamente [véase, Mirzadeh et al., "Radiometal labeling of immunoproteins: covalent linkage of 2-(4-isotiocyanatobenzil) dietilénetriaminapentaacético acid ligands to immunoglobulin," Bioconjug Chem 1:59-65 (1990)]. En resumen, se disolvieron de 100 a 150 mg de HSA en 20 ml de bicarbonato de sodio 50 mM, NaCl 0.15 M a pH 8.5. A esta solución, se agregaron 45 mg de 1B4M disueltos en 1 ml de H₂O (relación inicial de ligando a HSA de 30). La mezcla de reacción se hizo rotar a temperatura ambiente durante la noche. El ligando sin reaccionar o libre fue separado entonces del conjugado de HSA por centrifugación. La relación del ligando final a HSA (CL/HSA)_f fue determinada entonces espectrofotométricamente [véase, Pippin et al., "Spectrophotometric method for the determination of a bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates," Bioconjug Chem 3:342-334 (1992)]. El volumen final del HSA-1B4M purificado fue ajustado para administrar una concentración de aproximadamente 10 mg/mL de HSA.

Se hizo reaccionar entonces Gd (III) con el HSA-1B4M a una relación molar inicial de 2:1 (Gd/1B4M) utilizando una solución estándar de Gd (III) [Gd(NO₃)₂] a 6.42x10⁻³ M. El pH de la solución de Gd (III) fue ajustada a 4.5 hasta 5.0 utilizando NH₄OAc 5 M y fue agregado al HSA-1B4M gota a gota con mezcla de la reacción. La mezcla se dejó transcurrir durante 5 a 6 horas a temperatura ambiente con rotación. El Gd (III) sin reaccionar fue eliminado agregando 0.5 ml de solución 0.1 M de EDTA, seguida por centrifugación. La concentración final de albúmina fue determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm. El porcentaje de incorporación de Gd (III) fue determinado repitiendo la medición del número de agentes quelantes sobre la proteína y tomando nota del descenso debido a su ocupación por Gd (III). Cada molécula de HSA estaba enlazada a 5 moléculas de Gd. Una solución madre del conjugado de Gd-albúmina (28 mg/ml) en solución salina regulada con fosfato fue infundida entonces a los animales. Se cree que la fórmula del conjugado es albúmina-(Gd-1B4M)₅.

La relativa carencia de toxicidad del conjugado Gd-albúmina fue demostrada en ratas. Todas las investigaciones con animales fueron llevadas a cabo de acuerdo con las guías de los National Institutes of Health sobre el uso de animales en investigación, y fueron aprobadas por el Animal Care and Use Committee of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Se anestesiaron ratas masculinas adultas (Sprague-Dawley; n = 12) que pesaban entre 300 a 400 gramos con isoflurano (2%) y se colocaron en un marco estereotáctico Kopf. Se hizo una incisión sagital a través de la piel a nivel del cráneo. Se colocó una broca de perforación sobre la región frontal derecha. Se colocó estereotácticamente una cánula de calibre 32 unida a una jeringa Hamilton de 25 µl llena con albúmina enlazada a Gd en el estriato derecho. Las coordenadas para la colocación de la punta de la cánula en el estriato fueron 0.5 mm antes del bregma, 2.8 mm a la derecha de la línea media, y 5 mm por debajo del nivel de la duramadre.

Para distribuir la infusión utilizando convección, se utilizó un aparato de infusión no normalizado, hermético a gases que había sido descrito en detalle previamente (véase, Lonser et al., "Direct convective delivery of macromolecules to the spinal cord," J Neurosurg 89:616-622 (1998)). En resumen, el aparato consiste de una bomba de jeringa Harvard que genera un gradiente de presión continuo que es transmitido a través de una guía hidráulica que está unida al émbolo de la jeringa de infusión. Utilizando este sistema, se administraron 10 µL de Gd-albúmina a una rata de 0.5 µL/minuto en el estriato.

Después de terminar la infusión, los animales se dejaron despertar. Se observaron diariamente en cuanto a déficits clínicos y se sometieron a eutanasia al final del período de observación (3 a 60 días). Después de la eutanasia, los cerebros fueron retirados inmediatamente y congelados a -70°C. Los cerebros fueron cortados entonces en corona en secciones en serie de 20 µm de espesor sobre un criostato a -18°C hasta -20°C. Se cortaron secciones de tejido a través del cerebro completo. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina, azul rápido de Luxol y Nissl. Se llevó a cabo inmunohistoquímica para la proteína fibrilarmente ácida del glial.

Las características en MRI del conjugado de Gd-albúmina también fueron demostradas en primates. De nuevo, toda la investigación en animales fue llevada a cabo de acuerdo con las guías del National Institutes of Health sobre el uso de animales en investigación, y fue aprobada por el Animal Care and Use Committee of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Tres primates Rhesus adultos (*Macaca mulatta*) experimentaron la CED del conjugado Gd-albúmina a la región pontino del bulbo raquídeo. Después de que la anestesia había sido inducida en los animales, fueron intubados, y recibieron anestesia endotraqueal general con halotano. Se monitorizaron la temperatura del animal, el ritmo cardíaco, la saturación de oxígeno, las respuestas electrocardiográficas y el PCO₂ tidal final. La cabeza del animal fue asegurada entonces en un marco de estereotaxia Kopf. Utilizando una técnica estéril, se hizo una incisión en la piel en línea media desde el aspecto anterior al posterior del vértex del cráneo del animal. Se colocaron retractores autorretenedores dentro de la herida para exponer el cráneo subyacente. Se colocó una broca de perforación (1.0 cm) sobre el punto de entrada determinado estereotáticamente, y se hizo una incisión en la duramadre subyacente. La cánula de guía externa (véase, figura 1; diámetro externo 0.027 pulgadas; diámetro interno 0.020 pulgadas) fue colocada estereotáticamente a través de la abertura en la duramadre a lo largo de la trayectoria diana hasta un nivel de 1.5 cm por encima de la diana en el pontino deseada. La cánula de guía externa fue asegurada en su lugar con metilmetacrilato. La cánula interna (véase, figura 1; diámetro externo 0.014 pulgadas; diámetro interno 0.006 pulgadas), después de ser conectada al aparato de infusión, fue colocada entonces a través de la cánula de guía externa a la diana (véase, figura 1). El animal fue colocado entonces en el escáner de MR para estudios de generación de imágenes durante la infusión.

De nuevo, para distribuir la infusión hacia el bulbo raquídeo utilizando convección, se utilizó un sistema de administración fuera de norma que era hermético a gases sin volumen muerto. Se utilizó una bomba de jeringa Harvard para generar presión continua a lo largo de la infusión. Durante la infusión, la presión fue transmitida desde la bomba hasta una jeringa Hamilton de vidrio, hermética a gases, llena con la infusión (250 µL de volumen total) que estaba conectada a una tubuladura de poliéterétercetona (PEEK) (diámetro externo 0.23; diámetro interno 0.050 pulgadas). La tubuladura PEEK fue conectada directamente a la cánula de infusión interna que estaba colocada directamente dentro de la región pontino del bulbo raquídeo. Las infusiones fueron llevadas a cabo a ratas entre 0.25 a 1.0 µl/minuto.

Se llevó a cabo el MRI en tiempo real del conjugado Gd-albúmina (véase figura 3). Después de la colocación de la cánula de infusión, se obtuvieron imágenes de MR sopesadas T1 en corona para determinar la localización precisa de la cánula interna (figura 3A). Una vez que se confirmó la colocación de la cánula, se iniciaron las infusiones y se obtuvieron imágenes de MR sopesadas en T1 (1.5 Tesla) (espesor de la sección de 1 a 1.5 mm; espaciado de 0 mm) en 3 planos (sagital, axial, y en corona) a intervalos de aproximadamente 20 a 40 minutos hasta terminar las infusiones (figura 3B-H). Las imágenes de MR fueron analizadas en una Sun Workstation. Se calcularon volúmenes tridimensionales de distribución (Vd) utilizando como un umbral para segmentación las desviaciones estándar del valor 2 de intensidad de señal por encima de la señal de línea base media de la región anatómica no infundida circundante (figuras 4 y 5). Para determinar la homogeneidad de la infusión sobre la Vd infundida, se obtuvieron perfiles de línea a través del centro de la infusión como se ve en las imágenes de corona (figuras 6 y 7). La validez y exactitud de estos métodos para calcular Vd y la homogeneidad a partir de imágenes de MR fueron confirmadas utilizando autorradiografía cuantitativa (QAR) como se describe en el Ejemplo 2 más adelante.

También se llevó a cabo la generación de imágenes postinfusión. Dos primates experimentaron imágenes de MR en los días 0, 1, 2, 4, y 7 después de la infusión de Gd-albúmina (véase, por ejemplo, la figura 8 que muestra las imágenes del día 0, 1 y 2). Se obtuvieron las imágenes de MR sopesadas T1 (1.5 Tesla) (espesor de sección 1 mm; espaciado de 0 mm) en 3 planos (sagital, axial, y de corona). Se calculó la Vd tridimensional y se determinó la homogeneidad de la infusión como se describió previamente.

Los primates también fueron observados a diario con respecto a dificultades médicas o neurológicas a lo largo del período de estudio (18 a 35 días). Cada animal fue sometido a grabación en vídeo postoperatorio durante las 48 horas siguientes a la terminación de la infusión y durante las 24 horas del sometimiento a eutanasia.

Después del sacrificio, los cerebros de los animales fueron perfusionados con solución salina regulada con fosfato seguida por formalina al 10%. Los bulbos raquídeos fueron cortados de manera coronaria en secciones en serie de 20 µm de espesor. Las secciones de tejido a lo largo del bulbo raquídeo completo fueron procesadas histológicamente, y se tiñeron secciones representativas de cada bloque de tejido con hematoxilina y eosina, azul rápido de Luxol y Nissl. Se llevó a cabo inmunohistoquímica para la proteína fibrilarmente ácida de glial.

Se llevaron a cabo análisis estadísticos con Stat View 5.0 (Abacus, Berkley, CA).

El HSA utilizado en este ejemplo fue obtenido de Sigma (St. Louis, MO). El Gd (III) fue obtenido de Aldrich (Milwaukee, WI). La bomba de jeringa (modelo 22) fue obtenida de Harvard Apparatus (S. Natick, MA). La jeringa Hamilton, y la tubuladura PEEK fueron obtenidos de Thompson Instruments (Springfield, MA). Las cánulas de sílica y metilmetacrilato fueron obtenidas de Plastics One (Roanoke, VA). El marco de estereotaxia (modelo 1504) fue obtenido de Kopf (Tujunga, CA). La Sun Work Station y el software fueron adquiridos de Sun Microsystems, Inc. (Palo Alto, CA). El software Stat View 5.0 fue obtenido de Abacus Concepts (Berkeley, CA).

A la vez que el Gd es una unidad estructural para imágenes excelentes para MRI, es neurotóxico en su estado libre. Así, un constructo estable en el cual el Gd está unido permanentemente a la albúmina (u otra proteína, dendrímero o agente terapéutico) es deseable. Después de la síntesis, se encontró que el conjugado Gd-albúmina permanecía soluble, no se agregaba, y el Gd permanecía completamente enlazado.

- 5 Los experimentos con ratas confirmaron la seguridad de este compuesto (n=12). Como se describió más arriba, cada rata fue sometida a CED de 10 μ l de albúmina enlazada a Gd al estriato unilateralmente. Ninguno de los animales exhibió déficits clínicos con observación extendida (hasta 60 días), y el análisis histológico reveló arquitectura de tejidos normales con gliosis mínima limitada a la región inmediata circundante a la cánula de infusión después de la infusión (n=12).
- 10 Para demostrar la factibilidad de distribuir de manera predecible una molécula grande en un volumen relevante clínicamente al bulbo raquídeo a la vez que se utiliza la generación de imágenes de MR para monitorizar su distribución *in vivo*, los cerebros de los primates Rhesus (*Macaca mulatta*; n=3) (Tabla 1) fueron sometidos a generación de imágenes durante la administración por convección de albúmina enlazada a Gd a la región de pontino.

Tabla 1. Administración mejorada por convección de albúmina enlazada a gadolinio al bulbo raquídeo de primate

Animal número	Volumen total infundido (μ L)	Período de supervivencia (días)
1	85	35
2	110	25
3	120	18

15 Las imágenes en tiempo real (a intervalos de 20 a 40 minutos) durante la administración de la infusión mostró que la región anatómica infundida con albúmina enlazada a Gd era claramente distinguible del tejido no infundido circundante (figura 2). La región de pontino que circunda la punta de la cánula llenada de manera balanceada con el volumen creciente de infusión (Vi) hasta la región anatómica circundante estaba casi llena con la infusión (figura 3).

- 20 Los análisis volumétricos de la región infundida a diversos puntos en tiempo durante la infusión revelaron que el volumen de distribución (Vd) de la albúmina enlazada a Gd se incrementó linealmente con Vi ($R^2=0.94$) (figura 4), y la relación Vd:Vi con respecto a los volúmenes infundidos fue de 8.7 ± 1.2 (media $\pm$ S.D.) (figuras 4 y 5). La concentración de la infusión administrada en el tejido fue homogénea. Los perfiles de línea en sección transversal a través de la región infundida (figura 6) formaron un patrón en forma de cuadrado (figura 7), indicativa de una concentración relativamente uniforme a lo largo de la región con una caída de gradiente aguda en los bordes (figura 6). Por lo tanto,
- 25 la imagen observada representa una administración uniforme de una infusión a una región bien definida y demuestra que la imagen puede ser utilizada para determinar cuándo un agente terapéutico ha sido administrado de manera uniforme a sustancialmente solo el tejido diana, bien sea directamente (por ejemplo, cuando el trazador está unido al agente terapéutico) o a través de alguna correlación entre el volumen de imagen observado y el volumen en el cual el
- 30 agente terapéutico está distribuido (por ejemplo, cuando el trazador y el agente terapéutico no están enlazados y las movibilidades del trazador y del agente terapéutico son disímiles).

Para determinar las características de la infusión en puntos en el tiempo después de la terminación de la infusión, se llevaron a cabo MRI postinfusión (en los días 1, 2, 4 y 7 después de la infusión; n=2). Los MRI de la región infundida revelaron un incremento en Vd (comparado con el Vd inmediatamente después de la terminación de la infusión) partiendo en el día 1 postinfusión (figura 8). El incremento en el día 1 postinfusión en Vd fue de 35% para el animal 2 y 41% para el animal 3. Estos incrementos permanecieron relativamente estables hasta que la intensidad del conjugado Gd-albúmina se confundió con el de los tejidos normales circundantes (días 7 postinfusión, no mostrado). Los perfiles de línea en sección transversal a través de la región infundida sobre las imágenes de MR postinfusión (días postinfusión 1 y 2) continuo teniendo un patrón en forma de cuadrado (datos no mostrados) indicativo de una

35 concentración uniforme continuada en la región de infusión.

40

Como se mencionó anteriormente, se establecieron la seguridad y potencial para la toxicidad a los tejidos de CED de conjugados de Gd-albúmina en el bulbo raquídeo. Los primates infundidos fueron seguidos mediante exámenes clínicos en serie (hasta 35 días) y fueron sometidos a análisis histológicos de la región infundida en el momento de la eutanasia. Ningún animal tenía déficit neurológico detectable después de la infusión a través del periodo de observación. El examen somero del cerebro y el bulbo raquídeo reveló peso normal y ninguna evidencia de edema. Las secciones del bulbo raquídeo teñidas con azul rápido Luxol, Nissl y hematoxilina y eosina, reveló arquitectura normal de tejido. La tinción de proteína ácida fibrilarmente de glial reveló gliosis mínima limitada a la región que circunda inmediatamente el tracto de la cánula.

45

Tal como se describe en los antecedentes, la administración por CED se basa en un flujo en volumen para distribuir sustancias dentro de los espacios intersticiales del CNS. A diferencia de la administración intraventricular, que se basa en la difusión, la convección no está limitada por el peso molecular, concentración o difusividad de la infusión. Además, debido a que la administración por convección distribuye directamente las moléculas dentro del parénquima puede ser utilizada para dirigirse a regiones seleccionadas del CNS de manera que evita la barrera sangre-bulbo raquídeo, la cual limita la distribución y eficacia de agentes administrados por vía sistémica. Estudios previos han demostrado que las propiedades de la administración por convección pueden ser utilizadas para distribuir moléculas pequeñas y grandes de manera homogénea en volúmenes clínicamente relevantes de una manera segura y reproducible dentro de la médula espinal y el cerebro. Este ejemplo demuestra que el MRI puede ser combinado con CED para proveer un método novedoso para la administración de fármacos que incluye monitorización en tiempo real *in vivo* de la distribución de la infusión dentro del bulbo raquídeo para alcanzar la administración a sustancialmente solo el tejido diana.

Las imágenes por MR en tiempo real revelaron que Vd se incrementó linealmente ($R^2=0.94$) con un Vi creciente, y la relación Vd:Vi global fue de 8.7 ± 1.2 . Esta relación refleja la distribución de sustancias dentro de los espacios intersticiales, y es significativamente más alta que los estudios previos que utilizaron CED de sustancias similares dentro de la materia gris del cerebro (Vd:Vi; 5.0 ± 0.2) y los tractos de materia blanca de la médula espinal (Vd:Vi; 4.4 ± 0.5). Esto indica que el espacio intersticial del bulbo raquídeo es pequeño en comparación con aquellas otras regiones del CNS, puesto que la distribución está relacionada inversamente con el tamaño del espacio extracelular de la región infundida. Una reducción del espacio intersticial puede ser un resultado de los tractos de materia blanca densamente empacados que existen en esta región del CNS. Aprovechando la ventaja de la disposición apretada de fibras en esta región y la relación Vd:Vi grande, porciones clínicamente relevantes de tejido en esta región fueron llenadas rápidamente.

Las imágenes por MR revelaron la expansión de Vd en el día 1 postinfusión, y la estabilización del Vd expandido en estudios por imágenes subsecuentes (infusión visible a lo largo del día 4 postinfusión). Aparentemente, la distribución por convección de la infusión puede continuar después de la terminación de la administración de la infusión, puesto que la expansión no puede ser explicada por fuerzas difusoras para el trazador de albúmina de alto peso molecular. Adicionalmente, la expansión de la distribución continúa aparentemente solo hasta que el gradiente de presión que impulsa la infusión se disipa, puesto que la expansión observada en las primeras imágenes postinfusión permanece estable en tiempos posteriores.

La distribución de la infusión fue homogénea. El análisis de la intensidad de la infusión sobre las imágenes de MR revelaron uniformidad y una caída aguda en los bordes de la región infundida. Este perfil de concentración en forma de cuadrado se mantuvo a lo largo del período de mejora fuerte visible en las imágenes de MR postinfusión (a lo largo del día 2 postinfusión) (figura 7). Esto subraya la capacidad de la técnica divulgada para proveer la distribución controlable de moléculas en una concentración altamente uniforme sustancialmente dentro de la región diana, manteniendo esta uniformidad a lo largo de un período extendido de tiempo (con este compuesto trazador), y evitando la administración no direccionada, heterogénea de compuestos asociados con la administración sistémica o intratecal. En otras palabras, la administración controlable a sustancialmente solo el tejido diana es posible.

Se cree que la CED de macromoléculas al bulbo raquídeo seguida por MRI tiene una aplicación amplia en la investigación y tratamiento de condiciones del bulbo raquídeo. Un ejemplo de un trastorno específico que puede ser tratado con CED de agentes terapéuticos es los gliomas en pontino difusos. Estos neoplasmas afectan primariamente a niños jóvenes, y son uniformemente fatales puesto que no son seccionables quirúrgicamente, y los agentes quimioterapéuticos no pueden ser administrados de manera exitosa utilizando técnicas convencionales debido a las limitaciones de estos métodos. La CED acoplada con MRI (u otras técnicas de imágenes) permiten la administración directa y predecible de agentes terapéuticos a estas u otras lesiones del bulbo raquídeo. La capacidad demostrada de coinfundir trazadores para imágenes subrogados o directamente compuestos terapéuticos marcados permite visualización en tiempo real de la administración de fármacos en esta y otras regiones del CNS. Así, la administración en regiones empleando CED de esta manera se demostraría útil en el estudio y tratamiento de una variedad de trastornos del CNS.

Ejemplo 2

La administración mejorada por convección (CED) permite la distribución de agentes terapéuticos en volúmenes grandes de cerebro en concentraciones relativamente uniformes. Este modo de administración de fármacos ofrece gran potencial para el tratamiento de muchos trastornos neurológicos, incluyendo tumores cerebrales, enfermedades neurodegenerativas y trastornos de ataques. La eficacia del tratamiento y la prevención de toxicidad indeseada utilizando la metodología de CED, sin embargo, depende de que el agente terapéutico infundido sea distribuido de una manera direccionada a la región diana, a la vez que se minimiza la administración a tejido no diana, y en concentraciones que están en el rango terapéutico. Como se demostró más arriba en el Ejemplo 1, se pueden utilizar MRI para visualizar el proceso de CED.

En este ejemplo, se confirma y monitoriza en tiempo real la administración exacta y uniforme de agentes terapéuticos

durante CED con la técnica de imágenes no invasiva de tomografía computarizada de rayos X (CT). La técnica CT también es comparada a la técnica por MRI. Los trazadores que comprenden albúmina conjugada a ácido iopanoico para CT y a un quelato con metal gadolinio para MRI fueron preparados e investigados en cuanto a su utilidad como trazadores subrogados durante la distribución por convección de una macromolécula. Los trazadores fueron infundidos a los hemisferios cerebrales de monos, y se midieron los volúmenes de distribución utilizando CT y MRI. Los volúmenes de distribución medidos por imágenes fueron comparados con los volúmenes de tejido medidos por autorradiografía cuantitativa (QAR) utilizando ^{14}C -albúmina infundida con los trazadores. La correlación de concentración del trazador en los estándares de homogenizado de cerebro y unidades Hounsfield de CT también demostraron que el CT puede ser utilizado para cuantificar la concentración de la infusión durante CED. De manera similar, se demostró la utilidad de MRI para cuantificar la concentración de infusión en tejido. Los efectos a largo plazo del trazador subrogado para CT (ácido iopanoico-albúmina) sobre el comportamiento del animal, histología de los tejidos y toxicidad parenquimal después de la infusión cerebral también fueron establecidos.

Los ejemplos descritos más adelante demuestran que la distribución controlada y predecible de una macromolécula a volúmenes significativos clínicamente en el cerebro es posible utilizando CDE en combinación con generación de imágenes, tales como generación de imágenes en serie. También confirman que las dimensiones espaciales de la distribución en tejidos pueden ser definidas con exactitud *in vivo* durante la infusión utilizando trazadores subrogados y técnicas de generación de imágenes convencionales, y demuestran que el uso de trazadores subrogados radiográficos es un método práctico y seguro para establecer volúmenes de tratamiento durante la microinfusión intersticial a flujo alto del CNS. El método divulgado puede ser utilizado para monitorizar, en tiempo real, la geometría del volumen distribuido y para revelar baja resistencia del tejido y flujo preferencial a lo largo de tractos de fibra y retroflujos asociados con ratas de infusión rápidas y tamaños de catéter más grandes, los cuales pueden producir una administración no uniforme del agente terapéutico y administración por fuera del tejido diana. El uso de un trazador para determinar de manera no invasiva las concentraciones en tejido *in vivo* también provee información importante que puede ser utilizada para establecer eficacia y neurotoxicidad dependientes de la dosis.

Se conjugó ácido iopanoico (una unidad estructural para generación de imágenes por rayos X) a BSA (IPA-BSA) y HSA (IP-HSA) (Sigma Chemical Co.) mediante la adición lenta del éster activo de N-hidroxisulfosuccinimida del ácido iopanoico en DMSO (1.5 mL de solución de 140 mg/mL) a 10 mL de BSA (10 mg/mL en HEPES 0.07M, pH 8.5). Después de mezclar aproximadamente durante 5 horas a temperatura ambiente, se retiró el precipitado por centrifugación. El sobrenadante fue filtrado (0.22 μm), purificado por diafiltración contra solución salina regulada con fosfato (PBS) (pH 7.2, NaCl 0.15 M) utilizando una cámara provista con una membrana YM10 (Amicon, Millipore Corp., Bedford, Massachusetts), y concentrado por centrifugación (Centricon 10K) hasta aproximadamente 70 mg/mL con una relación típica IP:albúmina de 40-45 (determinada midiendo las absorbancias en UV a 315 nm vs. 280 nm).

Se sintetizó un conjugado de albúmina-Gd-DTPA como se describió previamente en Ogan et al, "Albumin labeled with Gd-DTPA: An intravascular contrast-enhancing agent for magnetic resonance blood pool imaging: preparation and characterization," Invest Radiol 22:665-671 (1987) [published erratum appears in Invest Radiol 1988 Dec;23(12):961]. Esta preparación tenía 26 ligandos de DTPA enlazado cada molécula de albúmina y tenía un peso molecular calculado de 78 kDa.

El putamen en seis monos Rhesus adultos (8-10 kg) fue escogido para la convección unilateral de IPA-BSA (n=3) o albúmina-Gd-DTPA (n=3). La anestesia fue inducida con ketamina (10 mg/kg), xilazina (0.5 mg/kg), y tiopental sódico (1 mg/kg). Los animales fueron asegurados en un marco de estereotaxia para monos (Kopf Instruments, Tujunga, California). Una aguja de punta roma metálica Hamilton de calibre 32 conectada a una jeringa Hamilton de 250 μL (Thompson Instruments, Chantilly, Virginia) fue insertada estereotácticamente en el centro del putamen derecho (anteroposterior 15.5 mm, mediolateral 12 mm y dorsoventral 24.5 mm con respecto a los canales timpánicos y el seno sagital medio)¹⁵. Después de un retraso de 90 minutos, la infusión comenzó a 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Para CT, se infundieron 130 μL , 200 μL y 235 μL de la mezcla de trazadores IPA-BSA/ ^{14}C -BSA (35-55 de ácido iopanoico/BSA, 61.3-80.4 mg/mL de ^{14}C -BSA). Para MRI, se infundieron 130 μL , 185 μL y 230 μL de una mezcla de albúmina-Gd-DTPA (Gd (III) 0.76 mM, HSA 0.03 mM) y ^{14}C -BSA. Después de la infusión, los animales se sometieron a generación de imágenes por CT o MRI, e inmediatamente después de ello fueron sometidos a eutanasia mediante sobredosis de pentotal. Los cerebros completos fueron retirados y almacenados a -80°C durante una semana antes del análisis.

La generación de imágenes por CT fue llevada a cabo en una unidad Helical CT (General Electric Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin). El IPA-BSA de imágenes utilizando un DFOV de 13.0-19.0 cm, 120 kV, 200-280 mA, un espesor de sección de 3.0 mm, y una matriz 512.

El MRI se llevó a cabo en una unidad de 1.5-Tesla (General Electric Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin). Las imágenes de corona y de axial fueron obtenidas a una relación TR/TE de 15.4/6.3 mseg, un FOV de 10 x 10 mm, un espesor de sección de 1.0 mm con un espaciado de 0.0 mm y una matriz nex 256 x 192/4.

Se coinfundió BSA metilado en ^{14}C (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St Louis, Missouri) con cada trazador.

Después del sacrificio, el cerebro fue congelado a -70°C , se obtuvieron secciones en criostato de $20\text{ }\mu\text{m}$ de espesor sobre láminas de vidrio recubiertas con colágeno, y se expusieron a una placa de imágenes fosforescentes (Fuji Medical Systems, Stamford, Connecticut) junto con estándares de plástico de ^{14}C (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, Missouri) a temperatura ambiente. Después de una semana, la placa de generación de imágenes fue barrida digitalmente en el FujiFilm BAS5000 Bio-imaging Analyzer. Las imágenes fueron calibradas utilizando una correlación previamente establecida entre los estándares plásticos de ^{14}C y secciones de cerebro de rata de $20\text{ }\mu\text{m}$ que contenían ^{14}C . El volumen de tejido de distribución (Tvd) fue definido como el volumen que contenía $>10\%$ de la radioactividad pico en el sitio de infusión. Las áreas de secciones que abarcan la región perfundida fueron sumadas y multiplicadas por el espaciamiento entre las secciones. Se obtuvieron perfiles del ^{14}C -BSA a través de la infusión en secciones correspondiente al centro de la infusión.

Las imágenes de CT y MRI fueron analizadas en el paquete de software MEDx (Sensor Systems, Inc., Sterling, Virginia) ejecutado en una Sun Worstation (Sun Microsystems, Inc., Palo Alto, California). Los volúmenes tridimensionales (3D) de distribución, V_d , fueron definidos como la relación del volumen de tejido perfundido dividido por el volumen de infusión. Fueron medidas mediante segmentación de volúmenes utilizando dos umbrales diferentes. $V_d(1)$ fue calculado como el volumen de distribución de CT y MRI que contenía al menos 10% del incremento total en la intensidad de señal debida a la adición del agente de contraste. Una región rectangular de interés (ROI) sobre el área de infusión fue definida y en el sitio correspondiente en el hemisferio contralateral, y se midió la intensidad de señal máxima perfundida (pico) y la intensidad de señal máxima no perfundida (fondo). Se utilizó una intensidad de señal de línea base más 10% de esta diferencia para obtener el valor de umbral para la segmentación de volumen. Para definir una técnica más simple para calcular el volumen sometido a generación de imágenes, se calculó $V_d(2)$ usando, como el umbral para segmentación, el valor de intensidad de señal que era dos desviaciones estándar por encima de la intensidad de señal de línea base media. Para determinar la homogeneidad del contraste en el volumen de distribución, se obtuvieron perfiles de línea a través del centro de la infusión como se ve en las imágenes de corona.

Se prepararon estándares *in vitro* como sigue. Se homogenizó cerebro de rata en PBS (1:1 v/v) y gelatina al 2% . Se agregaron ^{14}C -albúmina e ioxilano (Oxilan-R) en diversas concentraciones. Los estándares fueron congelados durante la noche a -80°C , barridos utilizando CT y seccionados a $20\text{ }\mu\text{m}$. Se barrieron las secciones en el sistema de imágenes de fósforo tal como se describe más arriba. Utilizando una rejilla 3×3 -e superpuesta sobre la imagen CT y la correspondiente imagen QAR, se generaron pares coincidentes de valores de densidad de señal CT Hounsfield y QAR en cada concentración y se llevó a cabo un análisis por regresión.

La seguridad y toxicidad del trazador de CT fue investigada en ratas Sprague-Dawley ($n=3$ por grupo) que fueron infundidas en un marco estereotáctico (Kopf Instruments, Tujunga, California) con $5\text{ }\mu\text{l}$ de IPA-HSA (81.3 mg/ml , $35\text{--}45\text{ IPA}$ por HSA) a $0.5\text{ }\mu\text{l/min}$ en el putamen (A 0.5 mm , L 3.5 mm , y D 5.5 mm con respecto a la bregma y a la duramadre), y se sacrificaron después de 7, 14 y 39 días o cuando aparecieron signos de toxicidad. Los animales fueron examinados diariamente en cuanto a evidencia en el comportamiento producida por toxicidad. En el momento del sacrificio, se recolectaron los cerebros, se congelaron, se seccionaron a $20\text{ }\mu\text{m}$ y se tiñeron con hematoxilina y eosina y anticuerpo de proteína ácida fibrilarmente anti-glial (GFAP).

Para establecer la aparición de trazadores subrogados utilizando barrido por CT o MRI, los animales fueron sometidos a barrido inmediatamente después de la CED de los trazadores al putamen. Las áreas perfundidas fueron visibles claramente sobre CT y MRI después de las infusiones (figuras 9 y 10). La forma de la infusión siguió las fronteras anatómicas de los ganglios basales, con alguna dispersión hacia la materia blanca adyacente de la corona radiata después de volúmenes mayores de infusión. Las infusiones no se extendieron hacia el tracto óptico contiguo (figura 11). Las regiones perfundidas, particularmente aquellas sobre MRI tenían perfiles de distribución relativamente uniformes y gradientes de concentración por etapas en la interfase entre el volumen de infusión y el parénquima circundante (figura 13). La resolución anatómica fue superior con MRI, con el cual la distribución en los núcleos y en los tractos de materia blanca transversos pudo ser identificada. Hubo más variabilidad de intensidad de señal dentro de los volúmenes CT (figura 12), indicando que sería posible incrementar la concentración de IPA:BSA para diferenciar mejor entre cerebro no perfundido y perfundido.

Para demostrar que el volumen sometido a generación de imágenes refleja exactamente el volumen distribuido en el tejido, los volúmenes con generación de imágenes fueron comparados a los medidos por autorradiografía cuantitativa (QAR). Primero, el volumen de perfusión radiactiva sobre QAR fue definido como aquel que contenía al menos 10% de la radioactividad pico en las áreas perfundidas. A continuación, se calcularon los volúmenes de distribución desde CT y MRI con base en aquellas porciones de la imagen que contenía al menos 10% del incremento total en la intensidad de señal debido a la adición del agente de contraste [$V_d(1)$]. Los volúmenes de distribución de [$V_d(2)$] también fueron calculados contando solamente aquellos vóxeles que tienen valores de intensidad de señal mayores a dos desviaciones estándar por encima de la intensidad de vóxel media en el cerebro no perfundido. Los $V_d(1)$ y $V_d(2)$ medios para el trazador CT fueron 3.44 ± 0.74 y 4.51 ± 1.31 , respectivamente, comparados con 4.26 ± 0.24 utilizando los resultados de QAR. Las $V_d(1)$ y $V_d(2)$ medias para el trazador MRI fueron 2.55 ± 0.44 y 2.62 ± 0.28 , respectivamente, en comparación con la distribución en tejido de 3.86 ± 1.05 medida por QAR.

También se demostró la distribución uniforme. La uniformidad en las concentraciones en las regiones perfundidas fue

similar entre las mediciones de QAR y las derivadas de CT y MRI. Los perfiles de línea a través de las áreas en sección transversal (figuras 12 y 13) muestran una concentración relativamente uniforme en la región perfundida con gradientes por etapas en sus bordes, demostrando de nuevo la capacidad del método divulgado para administrar infusiones a sustancialmente solo el tejido diana.

Para demostrar que la concentración en tejido de la albúmina (y los agentes terapéuticos) puede predecirse sobre la base de las imágenes de CT, se estableció la relación entre las unidades Hounsfield sobre imágenes CT y la concentración de albúmina marcada con ^{14}C . Utilizando un homogenizado de cerebro en estándares *in vitro* que contenían tanto la albúmina marcada con ^{14}C y el trazador subrogado, la relación entre unidades Hounsfield de CT y la radioactividad fue lineal con un valor de r^2 que excede de 0.995 (figura 14). Esta gráfica demuestra que si la concentración relativa de un agente terapéutico y un trazador CT son conocidas, la concentración de agente terapéutico en una porción particular del tejido perfundido puede determinarse a partir de la intensidad en la imagen (en unidades CT Hounsfield) del trazador en esa porción.

La carencia relativa de neurotoxicidad del trazador subrogado ácido iopanoico-albúmina fue demostrada después de una infusión por convección sencilla en el cerebro de rata. No hubo cambios en comportamiento a 7, 14 y 39 días después de la infusión. Los animales sometidos a autopsia, fueron visibles marcas en el trazo de la aguja a 7 y 14 días, pero habían desaparecido a los 39 días. Se notó edema en el sitio de infusión en 1/3 animales sacrificados después de 7 días pero estaba resuelto completamente a los 14 días. No se presentó hemorragia en el sitio de infusión. La tinción con GFAP fue mínima en el borde de la infusión y a lo largo del trazo de la aguja a 14 días, pero no hubo diferencia en la tinción con GFAP entre los hemisferios tratado y no tratado a los 39 días. Particularmente, no hubo evidencia de proliferación astrocítica reactiva circundando el área infundida.

Se demostró la distribución y visualización predecible y controlable de una molécula administrada a volúmenes significativos clínicamente en el cerebro de primates utilizando convección. Después de la coinfusión de una mezcla de albúmina marcada con ^{14}C y albúmina marcada para visualización sobre CT o MRI, las imágenes de CT y MRI mostraron volúmenes discretos de perfusión por contraste en el estriato y la geometría de las regiones perfundidas correspondientes cercanamente a la distribución que era evidente a partir de las imágenes de QAR correspondientes demostrando que la administración a sustancialmente solo el tejido diana puede alcanzarse a través de la monitorización de la infusión con una técnica por imágenes. La distribución de la perfusión en tejidos cubrió la región diana (el estriato). A volúmenes de infusión más grandes (230 μL y 235 μL) se detectó flujo hacia los tractos de materia blanca adyacentes por ambas técnicas de imágenes, pero no se detectó flujo inferiormente en el tracto óptico por MRI. Los volúmenes radiográficos de distribución obtenidos por CT fueron similares a los volúmenes obtenidos por QAR para todos los volúmenes testados, mientras que los volúmenes de distribución medios por MRI fueron consistentemente más pequeños. Así, puede ser deseable cesar la administración en un tiempo más temprano cuando se sigue una infusión utilizando la técnica de MRI. Independientemente, una vez que se establece una correlación entre la distribución observada por MRI y la distribución observada por QAR, la correlación puede ser utilizada para determinar cuándo una infusión ha alcanzado el tejido diana. Además, estos resultados demuestran que la distribución uniforme mostrada en los perfiles de línea CT/MRI se correlaciona con la distribución de concentración uniforme mostrada por QAR, y que las imágenes por CT/MRI por sí mismas pueden ser utilizadas para monitorizar la concentración de los agentes terapéuticos durante la CED.

La administración de agentes terapéuticos a volúmenes diana grandes (y sustancialmente solo a aquellos volúmenes diana) del cerebro ofrece gran potencial para el tratamiento de muchos trastornos neurológicos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, trastornos de ataques y tumores cerebrales. Para enfermedades tales como enfermedad de Parkinson y esclerosis temporal mesial, en los cuales los volúmenes de putamen humano, caudata, amígdalas e hipocampos normales varían de 1.5 a 7.5 ml, las áreas diana potenciales pueden ser perfundidas completamente infundiendo 0.4 ml durante un período de 7 horas, o 1.9 ml durante el transcurso de 32 horas, asumiendo una rata de flujo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ y un volumen de distribución igual a 4. Mientras que la administración intratumoral de macromoléculas ha sido llevada a cabo con seguridad en humanos con astrocitomas de grado alto, la naturaleza infiltrante difusamente de los astrocitomas requiere áreas grandes de direccionamiento de la terapia del cerebro, tal vez hemisferios completos. Esto puede ser logrado teóricamente combinando la distribución anatómica de catéteres de infusión múltiple para direccionar efectivamente un área perfundida mucho más grande. En tal situación, los métodos divulgados que incorporan imágenes pueden ser utilizados para seguir la administración y ayudar a confirmar que todas las áreas fueron perfundidas, y evitar algunas áreas que reciben dosis múltiples desde los catéteres múltiples.

Para demostrar la efectividad de cualquier agente utilizando convección, deseablemente se confirma que la concentración del agente está en el rango terapéutico. Dadas las concentraciones uniformes después de la administración por convección y la correlación lineal entre la concentración de yodo y las unidades Hounsfield, es ventajoso utilizar CT para medir la concentración de trazador en cada vóxel de tejido, la cual desde luego puede ser correlacionada con la concentración del agente terapéutico. Sin embargo, la intensidad de la mejora en el tejido (por ejemplo, por Gd-DTPA) no siempre puede ser una predicción completamente exacta de la concentración, puesto que la relación de la concentración de gadolinio al grado de mejora es compleja y bimodal, con una intensidad de señal que se eleva hasta un pico y luego cae a medida que la concentración de gadolinio se incrementa (véase, Wang et al,

"Magnetic resonance imaging contrast enhancement versus tissue gadolinium concentration," Invest Radiol 25 Suppl 1:S44-45 (1990)). Sin embargo, en la práctica, como aquí, el rango de concentración de gadolinio durante la administración por convección era limitado, y dentro de este rango se espera una relación aproximadamente lineal entre la concentración de gadolinio y la intensidad de la señal.

Una ventaja de la administración regional directa es la capacidad de direccionar áreas anatómicas específicas del cerebro, así como el potencial de direccionar la terapia a poblaciones celulares específicas. Adicionalmente, diferencias estructurales en el tejido (materia gris versus materia blanca adyacente) conforman la distribución lograda con convección a las estructuras anatómicas no esféricas de interés. Sin embargo, incluso con un direccionamiento anatómico óptimo utilizando técnicas neuroquirúrgicas estereotácticas modernas, la anisotropía del cerebro puede llevar a una distribución por convección del fármaco en áreas por fuera de la diana prevista. También es posible que pueda ocurrir el escape de fármaco de regreso a lo largo del trazo de la aguja con altas ratas de infusión (retroflujo). La administración inadvertida de fármaco hacia el CSF puede ocurrir si el movimiento retrogrado del fármaco alcanza el espacio subaracnoide. La distribución de la monitorización del trazador (tales como trazadores subrogados) durante la infusión de fármaco permite la identificación de distribución inesperada o fuga retrograda a lo largo del catéter, permitiendo medidas correctivas tales como el ajuste de la rata de infusión o el reposicionamiento de la punta del catéter. Por estas razones, un método radiográfico o por resonancia magnética para seguir la distribución de la perfusión durante la convección, de tal manera que los parámetros de infusión puedan ser optimizados para perfundir solamente la región direccionada, es útil. Adicionalmente, la medición de los volúmenes de distribución en diferentes regiones del cerebro o tumor provee datos útiles para modelar la anisotropía del cerebro y su influencia sobre la distribución del fármaco durante la CED. Tales mediciones de volúmenes de distribución se utilizan subsecuentemente para predecir patrones de la administración del fármaco por CED en sujetos que están recibiendo terapia.

En principio, la administración por convección de macromoléculas que no interactúan con las superficies celulares o la matriz extracelular viajará dentro del espacio extravascular independientemente del peso molecular y se distribuirán extensamente a una concentración de tejido uniforme. La desaparición de la molécula con el tiempo representa los efectos combinados del reconsumo capilar, degradación biológica, y pérdida por convección natural y difusión lenta. La distribución medida por la coinfección del trazador subrogado con una macromolécula terapéutica, si ambas son similares en tamaño, representa una indicación confiable de la distribución de esa macromolécula. Sin embargo, las diferencias en carga eléctrica, conformación molecular, enlazamiento al receptor, consumo celular y degradación en el espacio extracelular afectan la distribución final de cada molécula. No obstante, el conocimiento del movimiento en el tejido de un fármaco con respecto al movimiento del trazador subrogado (una correlación) permite el cálculo de la distribución del fármaco a partir del conocimiento de la distribución del trazador subrogado.

La seguridad del trazador por CT fue examinada, y no se observó evidencia de toxicidad directa o reacción inmunológica en los cerebros de las ratas perfundidas por convección con IPA-HAS. El ácido iopanoico ha sido utilizado para generación de imágenes de la vesícula biliar, y solamente se ha asociado con efectos colaterales raros (insuficiencia renal aguda, trombocitopenia aguda) [véase, Berk et al, "Oral cholecystography with iopanoic acid," N Engl J Med 290:204-210 (1974); Curradi et al. "Acute thrombocytopenia following oral cholecystography with iopanoic acid," Clin Toxicol 18:221-224 (1981)]. El ácido iopanoico no es conocido por ser neurotóxico en el tratamiento clínico [véase, Rapoport and Levitan, "Neurotoxicity of X-ray contrast media: Relation to lipid solubility and blood-brain barrier permeability," Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med 122:186-193 (1974)]. Sin embargo, el iopanoato de sodio utilizado en cultivo de tejidos a 1 mM produjo la muerte inmediata de explantes de ganglios simpáticos, mientras que a 0.1 mM produjo la vacuolización de fibroblastos. No se presentó toxicidad con ácido iopanoico a 0.01 mM (Korman and Hervonen, "Use of tissue culture to examine neurotoxicity of contrast media," Radiology 120:727-729 (1976)). Si se disocia completamente el conjugado IPA:HSA utilizado aquí tendría una concentración de ácido iopanoico de aproximadamente 0.017 mM. Sin embargo, el enlace amida que une el ácido iopanoico a la albúmina es susceptible de degradación solamente por procesamiento intracelular, y por lo tanto, no se considera que libere ácido propanoico libre hacia el parénquima. La ausencia de neurotoxicidad en los animales perfundidos con el conjugado de IPA:HSA indica que la disociación del compuesto no ocurre, u ocurre tan lentamente que no plantea un riesgo sustancial de toxicidad parenquimal.

La capacidad de visualizar la distribución por convección y de determinar la concentración en tejido de un trazador en la región perfundida mejora grandemente la utilidad potencial de la CED. El análisis de la eficacia y toxicidad del tratamiento utilizando esta metodología de administración se beneficia de la confirmación de que la infusión está localizada en la región diana, y que las concentraciones están en el rango terapéutico, y no en el tóxico. Adicionalmente, el seguimiento en tiempo real, no invasivo del volumen de infusión permite el control de la infusión sustancialmente solo a la región de interés (por ejemplo, el tejido diana). Como se demuestra aquí, los agentes de contraste radiográficos y para resonancia magnética, utilizados como trazadores subrogados en las modalidades de generación de imágenes por CT y MRI estándar, proveen una herramienta práctica para establecer volúmenes de tratamiento durante la microinfusión a alto flujo. La correlación altamente lineal entre unidades Hounsfield en imágenes CT y la concentración de agente generador de imágenes por CT en estándares de tejido cerebral demuestra un medio para la determinación de concentraciones *in vivo* a partir de imágenes por CT obtenidas durante la CED en pacientes.

Ejemplo 3

En este ejemplo, se demuestra la CED que incorpora el uso de un trazador subrogado basado en yodo e imágenes por (CT) tomográficas computarizadas.

Cuatro primates (*Macaca mulatta*) experimentaron la CED de diversos volúmenes (volumen total de 90 a 150 μ l) de iopamidol (777 Da) en la materia blanca cerebral combinada con la generación de imágenes por CT durante y después de la infusión (hasta 5 días postinfusión), así como autorradiografía cuantitativa (QAR). Se utilizaron la observación clínica (≤ 20 semanas) e histopatología para evaluar la seguridad y la toxicidad.

La generación de imágenes por CT en tiempo real del trazador durante la infusión reveló una región claramente definida de perfusión. El volumen de distribución (V_d) se incrementó linealmente ($R^2=0.97$) con volumen creciente de infusión (V_i). La relación global $V_d:V_i$ fue de 4.1 ± 0.7 (media $\pm$ S.D.). La distribución de la infusión fue homogénea. La QAR reconfirmó la exactitud de la distribución en las imágenes para una molécula pequeña (sacarosa; 359 Da) y una grande (dextrano; 70 kDa). La distribución de infusión fue identificable hasta 72 horas después de la infusión. Ninguno de los animales tuvo evidencia clínica o histopatológica de toxicidad.

La generación de imágenes por CT *in vivo*, en tiempo real, de CED utilizando iopamidol parece ser segura, factible y adecuada para monitorizar la administración por convección de moléculas tanto pequeñas como grandes.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe la preparación y caracterización de un trazador que comprende un dendrímero conjugado a un quelato metálico, y su uso en seguir, en tiempo real e *in vivo*, la CED en el bulbo raquídeo de primates utilizando MRI.

Se sintetizó un dendrímero DAB-Am64-(1B4M-Gd)₆₄ de acuerdo con el método descrito en Kobayashi et al., Cancer Research, 61: 4966-4970, 2001. Se obtiene un dendrímero de polipropilenimina diaminobutilo (DAB), Generación 5.0 (DAB-Am-64) de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Este dendrímero tenía 64 grupos amino primarios terminales y un peso molecular de 7,168. El dendrímero es concentrado a 10 mg/ml y diafiltrado contra regulador de fosfato 0.1 M a pH 9. El dendrímero de DAB-Am-64 se hace reaccionar con un exceso de 64 veces de 1B4M a 40°C, y la solución de reacción se mantiene a pH 9 con NaOH 1M durante un tiempo de reacción de 48 horas. Se agregó una cantidad igual adicional de 1B4M después de 24 horas en forma de sólido. La preparación se purifica entonces por diafiltración utilizando Centricon 30 (Amicon, Cambridge MA).

Aproximadamente 3 mg de DAB-Am-64-(1B4M-Gd)₆₄ se mezclan con 10 μ mol de Gd(III) citrato (Nakarai, Tokyo, Japón) en regulador de citrato 0.3 M durante 2 horas a 40°C. Se elimina el exceso de Gd(III) en DAB-Am-64-(1B4M)₆₄ por diafiltración utilizando Centricon 30 a la vez que simultáneamente se cambia el regulador a PBS 0.05 M a pH 7.4.

La toxicidad del conjugado Gd-dendrímero es investigado en ratas. Se anestesian ratas macho adultas (Sprague-Dawley; n=12) con pesos entre 300 a 400 gramos con isofluorano (2%) y se colocan en un marco estereotáctico Kopf. Se hace una incisión sagital a través del cuero cabelludo hasta el nivel del cráneo. Se coloca una broca de perforación sobre la región frontal derecha. Una cánula de calibre 32 unida a una jeringa Hamilton de 25 μ l llena con el conjugado Gd-dendrímero se coloca estereotácticamente en el estriato derecho. Las coordenadas para la colocación de la punta de la cánula en el estriato son 0.5 mm anterior al bregma, 2.8 mm a la derecha de la línea media, y 5 mm por debajo del nivel de la duramadre.

Para distribuir la infusión utilizando convección, se usa un aparato fuera de norma, hermético a gases para infusión que fue descrito en el Ejemplo 1. Utilizando ese sistema, se administran 10 μ L de Gd-albúmina a una rata de 0.5 μ L/minuto en el estriato.

Después de la terminación de la infusión, los animales se dejaron despertar. Se observaron diariamente en cuanto a déficits clínicos, y se sometieron a eutanasia al final del período de observación (3 a 60 días). Después de la eutanasia, los cerebros son retirados inmediatamente y congelados a -70°C. Los cerebros son cortados entonces en corona en secciones en serie de 20 μ m de espesor sobre un criostato a -18°C hasta -20°C. Se cortan las secciones de tejido a lo largo del cerebro completo. Las secciones son teñidas con hematoxilina y eosina, azul rápido de Luxol y Nissl. Se lleva a cabo inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrilarmente glial.

Las características por MRI del conjugado Gd-dendrímero se investigan en primates. Varios primates Rhesus adultos (*Macaca mulatta*) experimentaron CED del conjugado Gd-dendrímero en la región pontina del bulbo raquídeo. Después de que se indujo anestesia en los animales, son intubados, y se da anestesia endotraqueal general con halotano. La temperatura del animal, la rata cardíaca, la saturación de oxígeno, las respuestas electrocardiográficas y el PCO₂ tidal final son monitorizados. La cabeza del animal es asegurada entonces en un marco de estereotaxia Kopf. Utilizando una técnica estéril, se hace una incisión de piel en la línea media desde el punto anterior al posterior del vértex del cráneo del animal. Se colocan retractores autorretenedores dentro de la herida para exponer el cráneo subyacente. Se coloca una broca de perforación, (1.0 cm) sobre el punto de entrada determinado estereotácticamente, y se hace una incisión sobre la duramadre subyacente. La cánula de guía externa (véase, figura 1; diámetro externo

0.027 pulgadas; diámetro interno 0.020 pulgadas.) se coloca estereotácticamente a través de la abertura dural a lo largo de la trayectoria diana a un nivel de 1.5 cm por encima del pontino diana deseado. La cánula de guía externa es asegurada entonces en su lugar con metilmetacrilato. La cánula interna (véase, figura 1; diámetro externo 0.014 pulgadas; diámetro interno 0.006 pulgadas.), después de ser conectada al aparato de infusión, se coloca entonces a través de la cánula de guía externa hacia la diana (véase, figura 1). El animal es colocado entonces en el escáner de MR para estudios de generación de imágenes durante la infusión.

De nuevo, para distribuir la infusión dentro del bulbo raquídeo utilizando convección, se utilizó el sistema de administración fuera de norma que fue descrito arriba. Se ejecuta la MRI en tiempo real del conjugado Gd-dendrímico. Después de la colocación de la cánula de infusión, se obtienen imágenes de MR sopesadas T1 de corona para determinar la localización precisa de la cánula interna. Una vez que se confirma la colocación de la cánula, se inician las infusiones y se obtienen imágenes de MR sopesadas T1 (1.5 Tesla) (espesor de sección de 1 a 1.5 mm; espaciamiento de 0 mm) en 3 planos (sagital, axial, y de corona) a intervalos de aproximadamente 20 a 40 minutos hasta que se termina la infusión. Las imágenes de MR son analizadas en una Sun Workstation. Se calculan volúmenes tridimensionales de distribución (Vd) utilizando un umbral para segmentación que es 2 veces la desviación estándar del valor de intensidad de señal por encima de la señal de línea base media para la región anatómica no infundida circundante. Para determinar la homogeneidad de la infusión sobre la Vd infundida, se obtienen perfiles de línea a través del centro de la infusión como se ve en las imágenes de corona. La validez y exactitud de estos métodos para calcular Vd y la homogeneidad a partir de imágenes de MR se confirman utilizando autorradiografía cuantitativa (QAR) como se describió en el Ejemplo 2.

También se lleva a cabo la generación de imágenes postinfusión. Varios primates experimentaron generación de imágenes por MR en los días 0, 1, 2, 4, y 7 después de la infusión del conjugado Gd-dendrímico. Se obtuvieron imágenes de MR sopesadas T1 (1.5 Tesla) (espesor de sección 1 mm; espaciamiento de 0 mm) en 3 planos (sagital, axial, y de corona). Se calculó la Vd tridimensional y la homogeneidad de la infusión se determinó como se describió previamente.

Los primates también fueron observados diariamente en cuanto a dificultades médicas o neurológicas a lo largo del período de estudio (18 a 35 días). Cada animal fue sometido a videograbación postoperación durante 48 horas después de la terminación de la infusión y durante 24 horas después de la eutanasia.

Después del sacrificio, los cerebros de los animales fueron perfundidos con solución salina regulada con fosfato seguida por formalina al 10%. Los bulbos raquídeos son cortados entonces por vía de corona en secciones en serie de 20 µm de espesor. Las secciones de tejido a lo largo del bulbo raquídeo son procesadas histológicamente, y se tiñen secciones representativas de cada bloque de tejido con hematoxilina y eosina, azul rápido Luxol y Nissl. Se lleva a cabo inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrilarmente glial.

Se llevó a cabo análisis estadístico con Stat View 5.0 (Abacus, Berkley CA).

Ejemplo 5

El método divulgado aquí involucra la administración de un agente terapéutico a un tejido diana de un sujeto por CED y utilizando generación de imágenes para seguir la administración. Al seguir la administración utilizando imágenes es posible administrar el agente terapéutico a sustancialmente solo el tejido diana. En general, cualquier agente terapéutico puede ser administrado de acuerdo con el método, y el agente puede ser administrado en una dosis que es terapéuticamente efectiva.

Un agente terapéutico o una composición que comprende el agente terapéutico pueden ser administrados en cualquier dosificación que alcance su propósito pretendido (una dosis terapéuticamente efectiva). Las cantidades y regímenes para la administración de las moléculas terapéuticas pueden ser determinadas fácilmente por las personas con experiencia normal en el arte clínico del tratamiento de enfermedades. Las cantidades efectivas para uso terapéutico dependerán, desde luego, de la severidad de la enfermedad y del peso y el estado general de salud del paciente.

Típicamente, las dosificaciones utilizadas *in vitro* pueden proveer una guía útil en las cantidades útiles para la administración *in situ* de la composición farmacéutica, y pueden utilizarse modelos animales para determinar dosificaciones efectivas para el tratamiento de trastornos particulares. Se describen diversas consideraciones, por ejemplo, en Gilman et al., eds., Goodman and Gilman: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, (1990); y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1990).

Como se describió más arriba, las dosis efectivas del agente terapéutico variarán dependiendo del agente terapéutico, la naturaleza y severidad de la condición que va a ser tratada, la edad y condición del paciente y otros factores clínicos. Así, la determinación final del régimen de tratamiento apropiado será hecha por el médico tratante. Típicamente, el rango de dosis variará desde aproximadamente 0.1 µg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Otros rangos adecuados incluyen dosis desde aproximadamente 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. La concentración del trazador puede ser tan pequeña como pueda ser detectada por MRI y/o CT, o dentro de un rango

que corresponde a las dosificaciones del agente terapéutico dadas más arriba.

Las preparaciones farmacéuticas pueden comprender solamente un tipo de molécula terapéutica, o pueden estar compuestas de una combinación de varios tipos de moléculas terapéuticas. Para CED, las formulaciones comprenden usualmente fluidos inyectables e incluyen fluidos farmacéuticos y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas balanceadas, dextrosa acuosa, glicerol y similares como vehículo.

Ejemplo 6

Además para tratar desordenes del cerebro, el método por CED divulgado puede ser utilizado para tratar otros órganos. Por ejemplo, la CED seguida por generación de imágenes puede ser utilizada para tratar anormalidades de la piel, músculos (incluyendo el corazón), pulmones, riñón, hígado, páncreas, próstata, estómago, intestinos, colon y órganos sexuales tales como el útero, testículos u ovarios. En un ejemplo, las condiciones del corazón caracterizadas por un ritmo irregular pueden ser tratadas por ablación selectiva de células responsables de la generación o conducción de señales eléctricas aberrantes. Adicionalmente, el tratamiento selectivo de tumores localizados en cualquiera de los órganos listados más arriba puede lograrse mediante el método divulgado, beneficiándose de la capacidad demostrada de los métodos para administrar agentes terapéuticos a sustancialmente solo el tejido diana, lo cual evita efectos tóxicos indeseados en el tejido.

Reivindicaciones

1. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico para la manufactura de una solución de medicamento para administrar a un tejido cerebral sólido diana por infusión intersticial por convección a la vez que monitoriza la distribución de la solución de medicamento generando imágenes del trazador en la solución de medicamento
- 5
- caracterizado porque la generación de imágenes es por una técnica de generación de imágenes por MRI o CT y porque el trazador es
- (i) un quelato metálico de un ión metálico paramagnético conjugado a una molécula portadora consistente de una albúmina, un dendrímero de polialquilenimina, o un dendrímero de poliamidoamina; o
- 10
- (ii) un agente de contraste para CT yodado o
- (iii) un agente de contraste para CT yodado conjugado con el agente terapéutico o con una albúmina.
2. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la monitorización de la distribución de la solución y la generación de imágenes del trazador comprende llevar a cabo MRI.
- 15
3. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la monitorización de la distribución de la solución y la generación de imágenes del trazador comprende llevar a cabo CT.
4. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en las reivindicaciones 2 o 3, en donde el trazador es un quelato metálico de un ión lantánido paramagnético.
- 20
5. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el trazador es un quelato metálico de un ión metálico paramagnético conjugado a una albúmina de suero, preferiblemente el trazador es una albúmina de suero conjugada a uno o más quelatos 1B4M de ión gadolinio (III).
6. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el trazador es seleccionado para tener una movilidad en el tejido sólido que es sustancialmente similar al agente terapéutico.
- 25
7. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 3, en donde el trazador es ácido iopanoico o iopamidol, ácido iopanoico o iopamidol conjugados a dicho agente terapéutico, o ácido iopanoico conjugado a una albúmina.
8. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el trazador es un agente de contraste para CT por rayos X yodado conjugado al agente terapéutico.
- 30
9. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el trazador es un agente de contraste para CT por rayos X yodado conjugado a una albúmina.
10. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente cesar la administración de la solución al tejido diana cuando la solución es distribuida en un volumen predeterminado según lo indica la imagen del trazador, calculando una correlación entre un volumen de distribución obtenido a partir de la imagen del trazador y un volumen de distribución para el agente terapéutico, y utilizando la imagen del trazador y la correlación para determinar si el agente terapéutico ha llenado un volumen predeterminado.
- 35
11. El uso de una solución que contiene un trazador y un agente terapéutico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la monitorización comprende adicionalmente medir una intensidad de señal del trazador en el tejido diana y usar la intensidad de señal del trazador para calcular una concentración del agente terapéutico en el tejido diana.
- 40

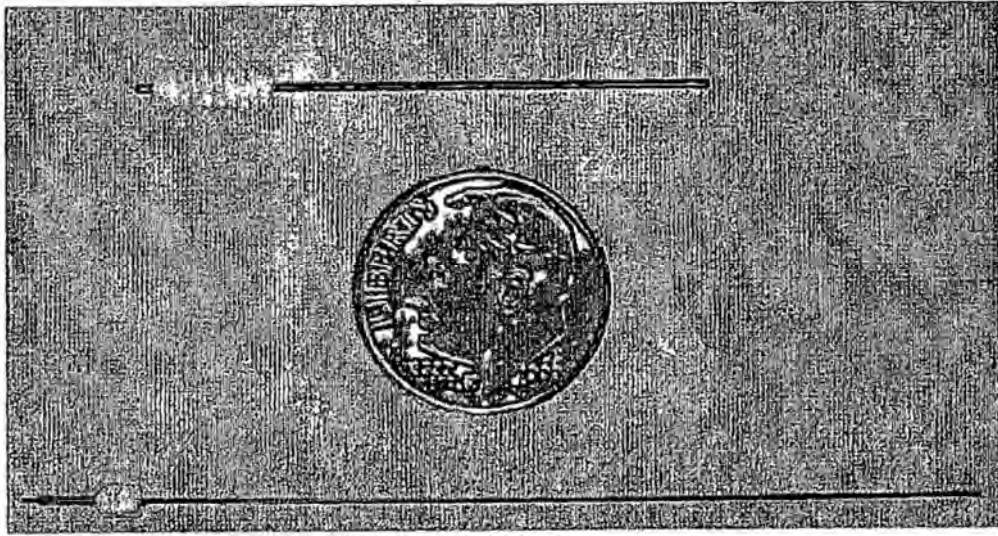


FIG. 1



FIG. 2

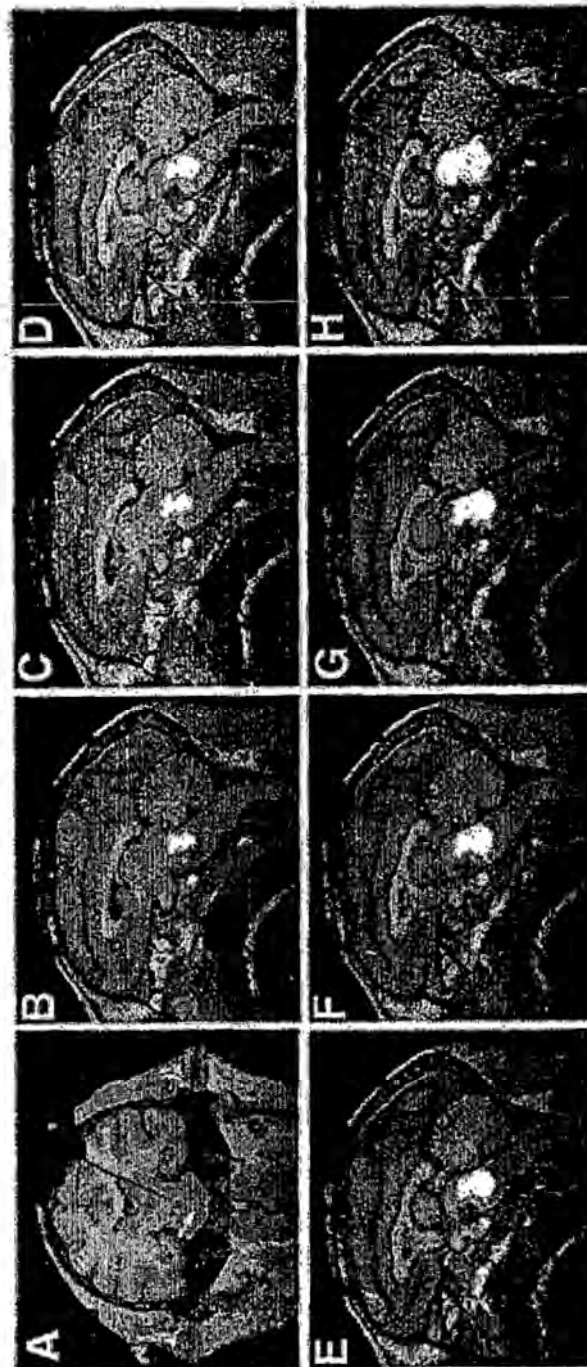
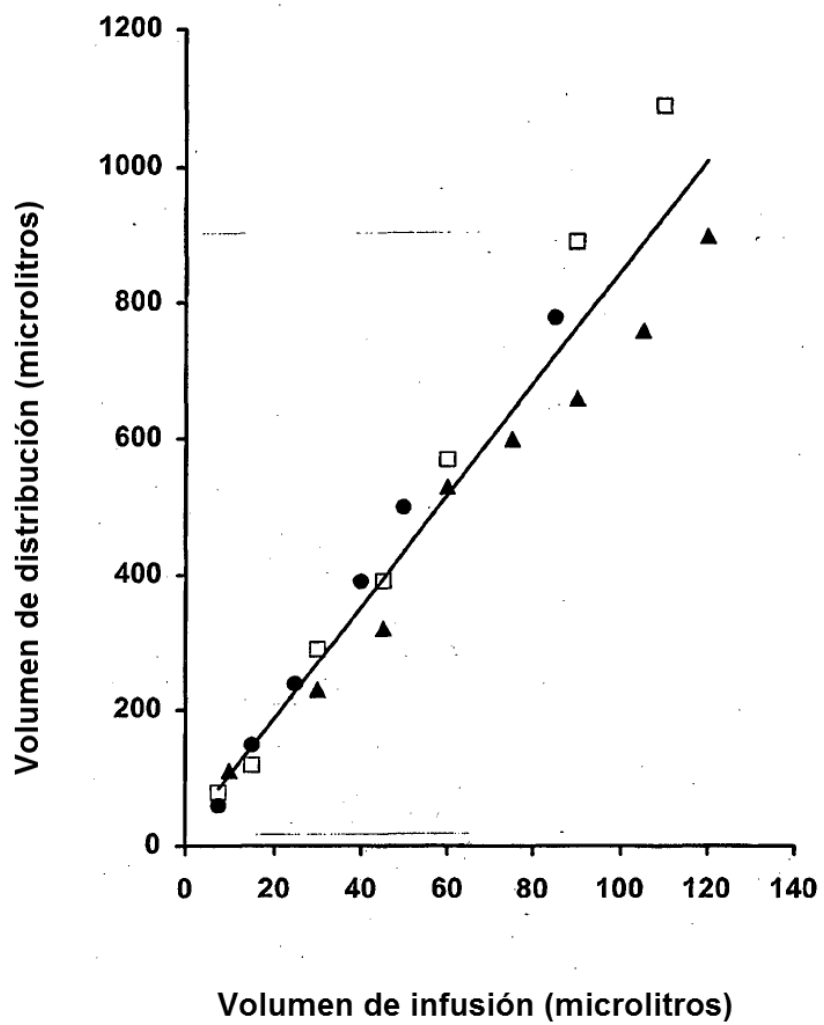


FIG. 3

**FIG. 4**

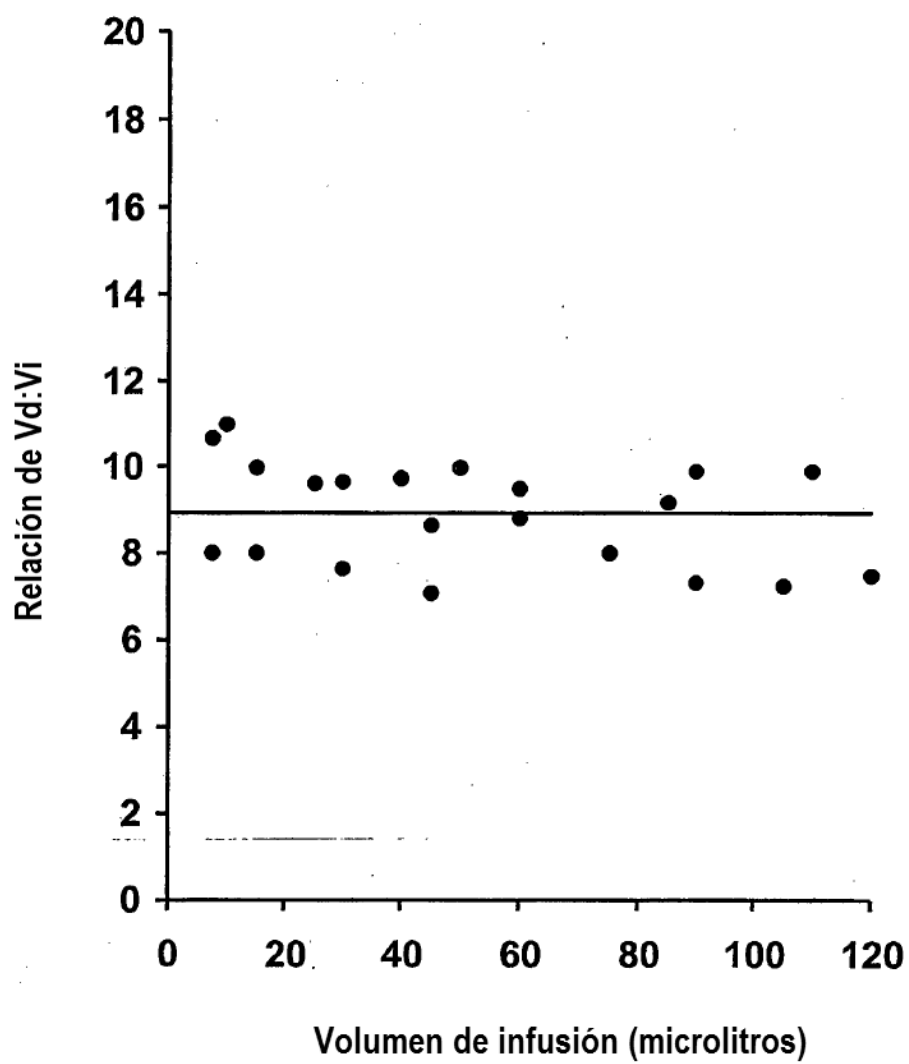


FIG. 5

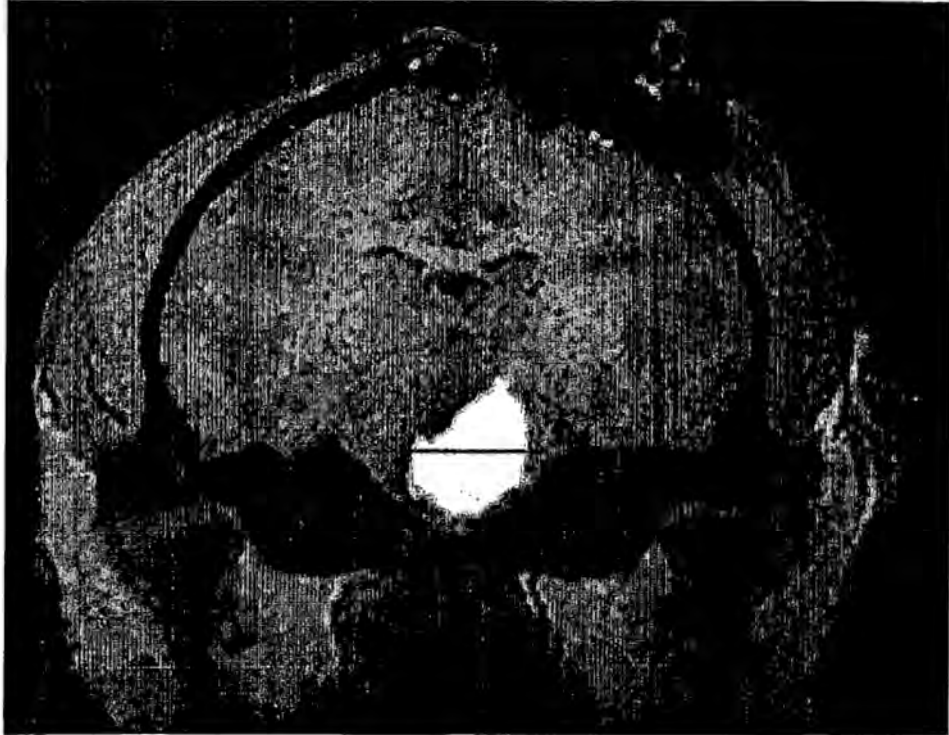


FIG. 6

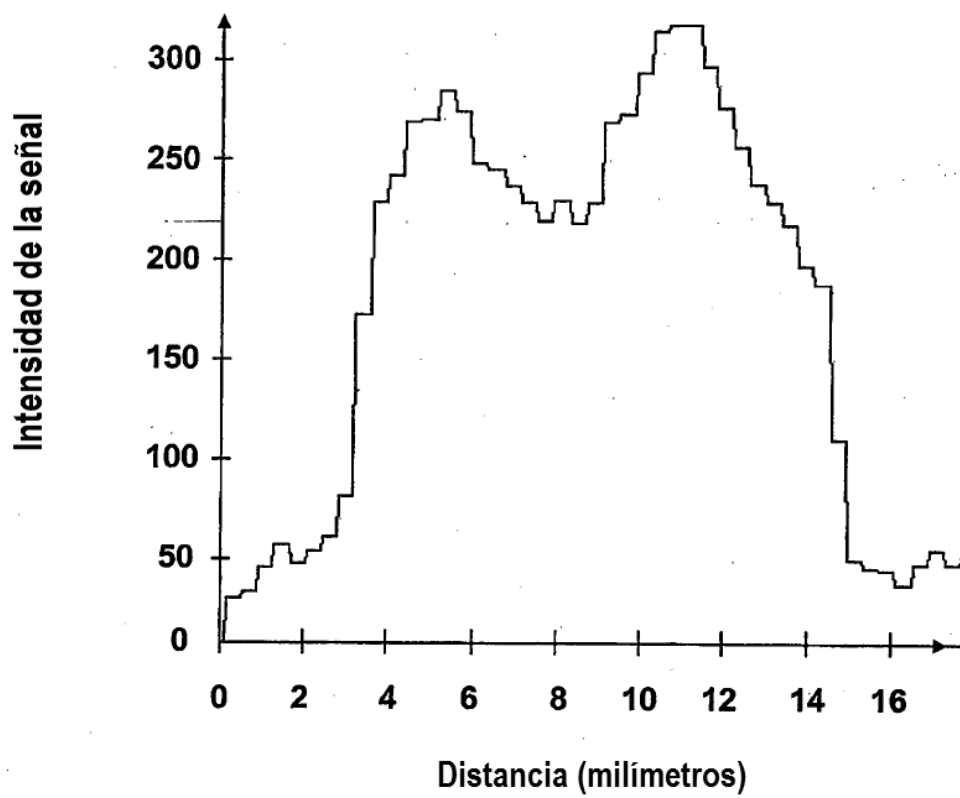


FIG. 7

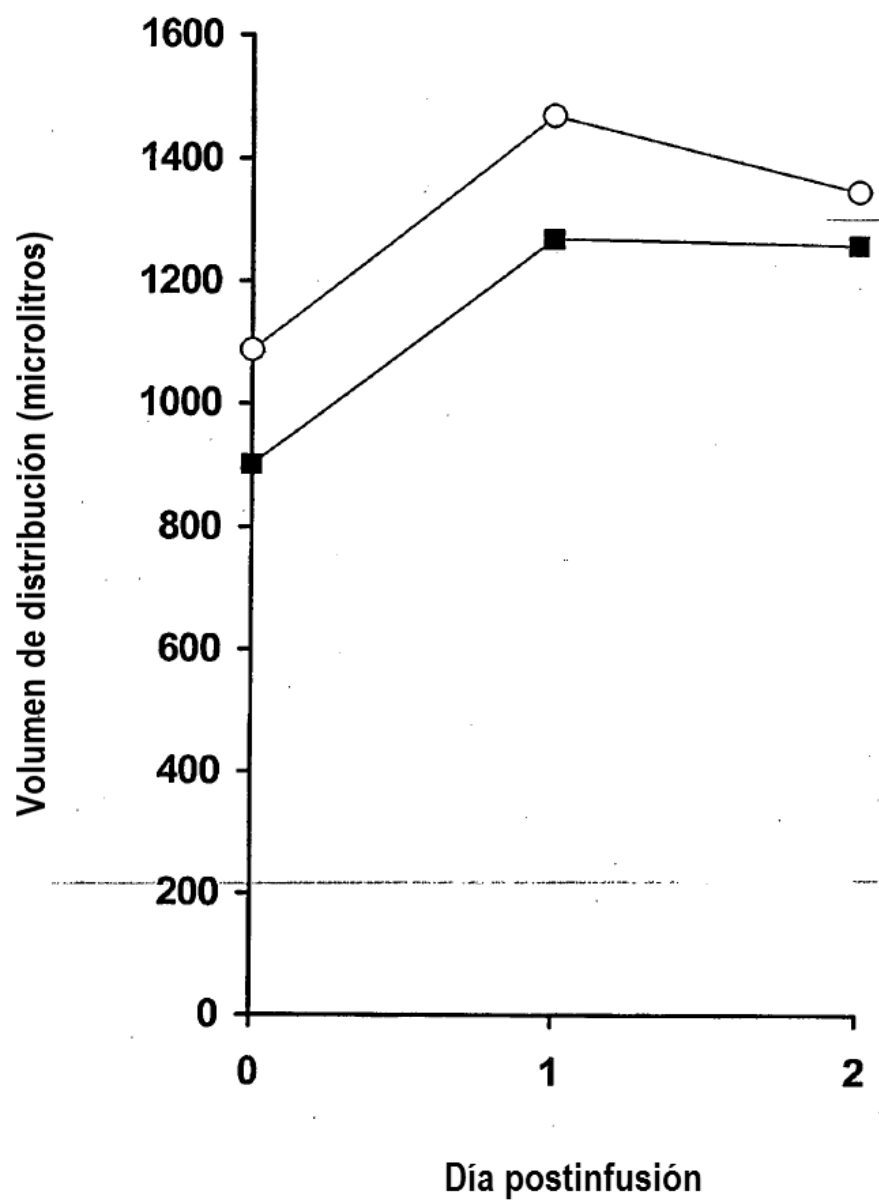


FIG. 8

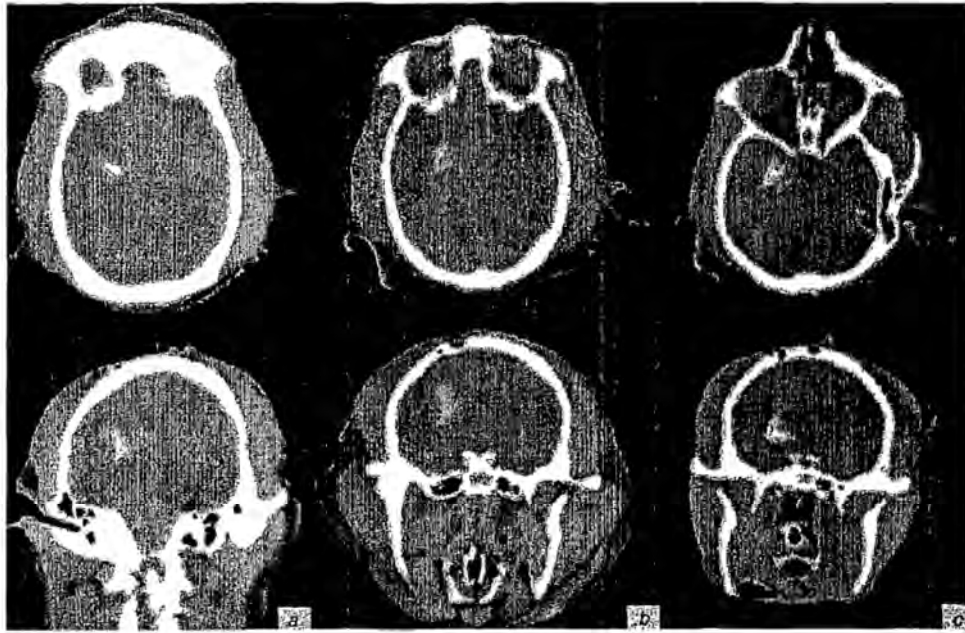


FIG. 9

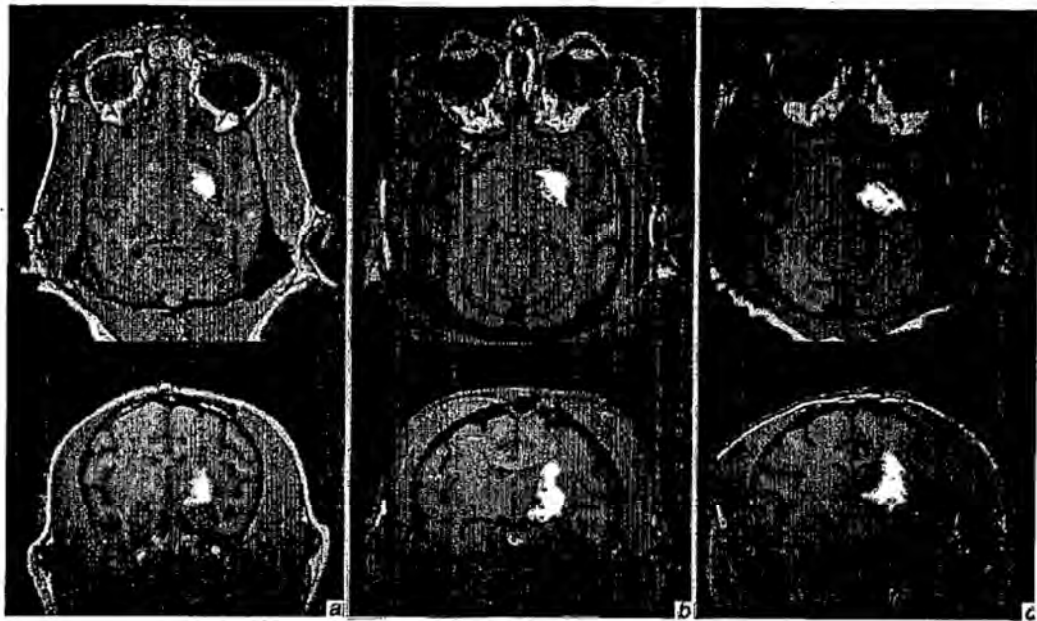


FIG. 10

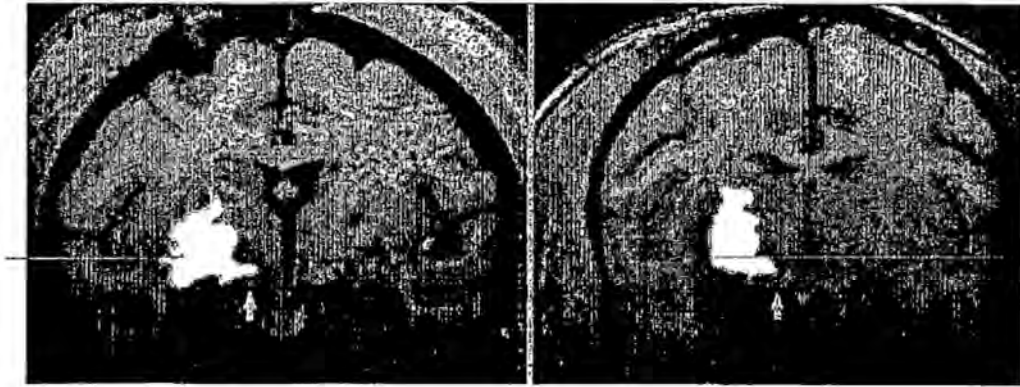


FIG. 11

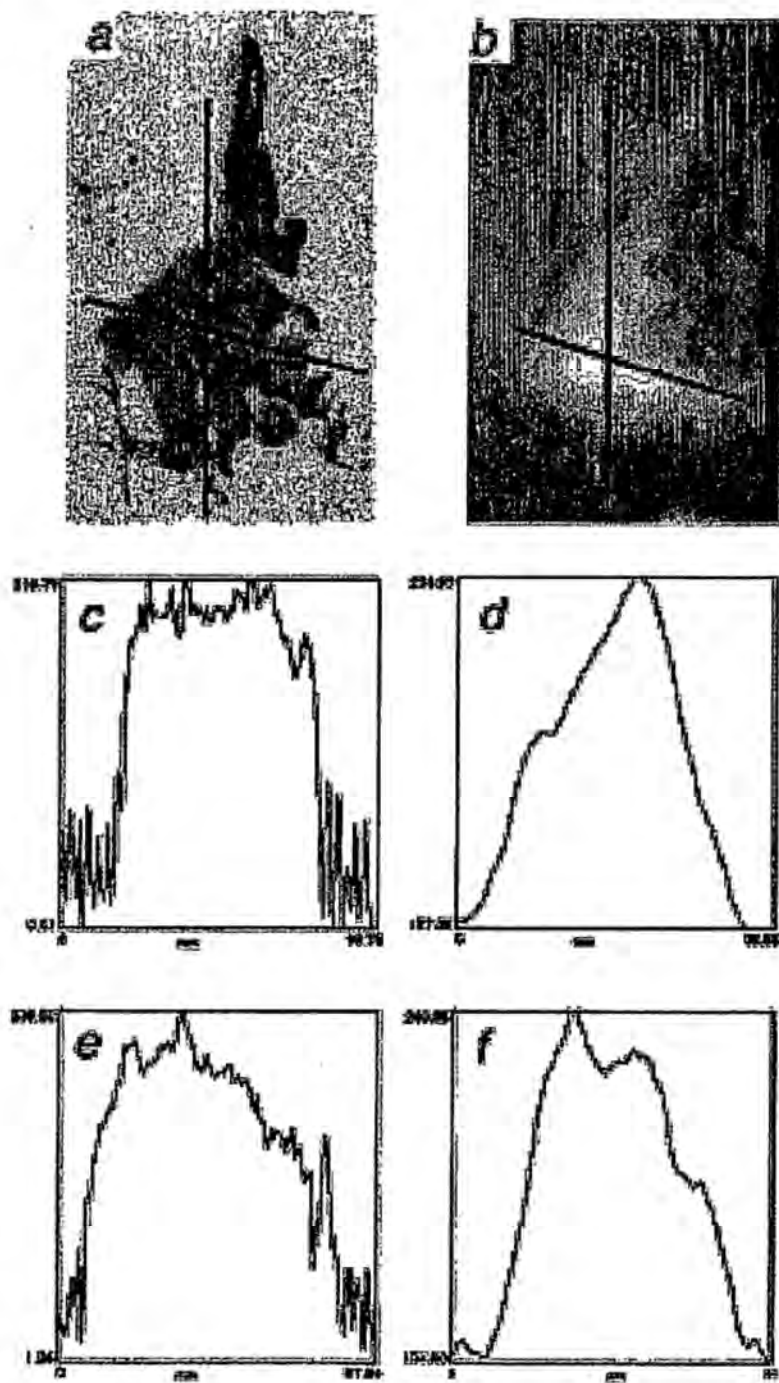


FIG. 12

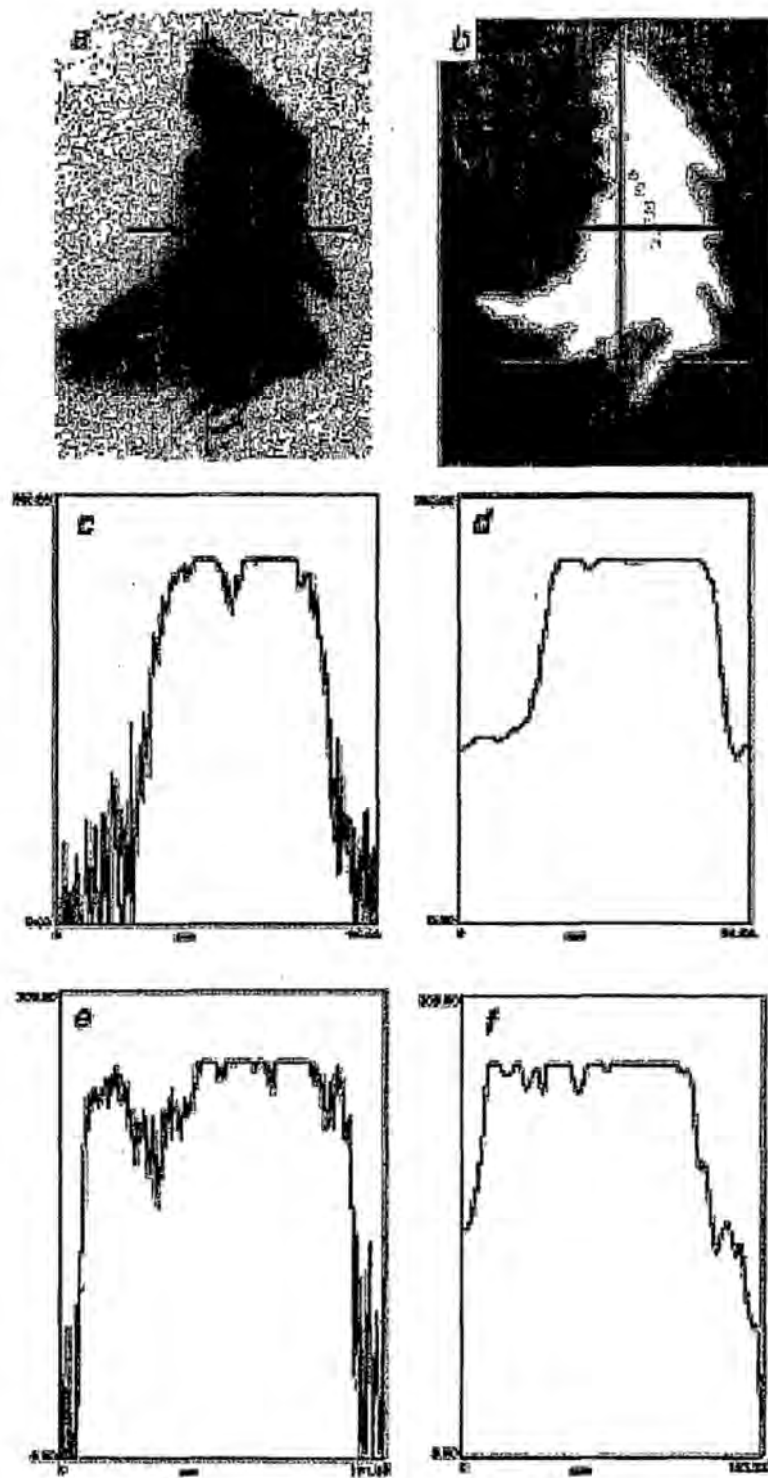


FIG. 13

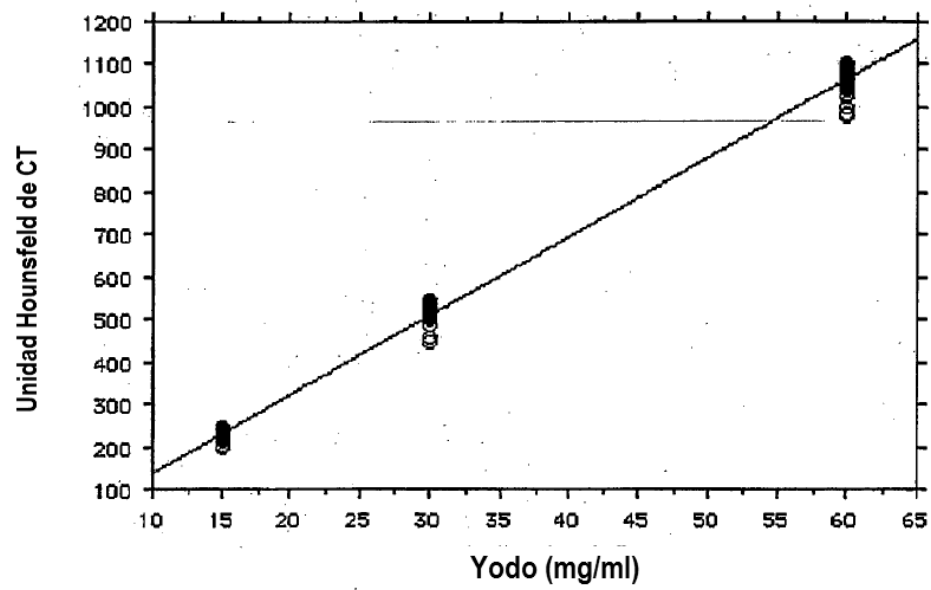


FIG. 14