

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 884**

51 Int. Cl.:

A61K 49/10 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

G01R 33/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2014** **PCT/EP2014/055398**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO2014154531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2014** **E 14710891 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017** **EP 2978455**

54 Título: **Compuesto de semifluorocarbono que contiene agente de contraste**

30 Prioridad:

25.03.2013 EP 13160868

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

14.06.2017

73 Titular/es:

B. BRAUN MELSUNGEN AG (100.0%)

Carl-Braun-Strasse 1

34212 Melsungen, DE

72 Inventor/es:

KELLER, THORSTEN;

RÖTHLEIN, DORIS;

SCHMITT, JÜRGEN;

DIETRICH, THORE;

STAWOWY, PHILIPP y

FLECK, ECKART

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 616 884 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

Compuesto de semifluorocarbono que contiene agente de contraste.

La presente invención se refiere a una emulsión acuosa que comprende un compuesto de semifluorocarbono específico, un triglicérido de cadena media (MCT) y un emulsionante, así como al uso de la emulsión como un agente de contraste o agente mejorador de contraste. Además, la invención se refiere al uso de dicha emulsión para la detección de diagnóstico de afecciones patológicas inflamatorias al usar imagenología MR.

Las enfermedades inflamatorias son, por mucho, las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Aunque hay procedimientos de diagnóstico y terapéuticos eficaces para las enfermedades inflamatorias agudas (causadas predominantemente por patógenos), en muchos casos el diagnóstico de enfermedades inflamatorias crónicas es en su mayor parte difícil y el tratamiento de las mismas está limitado a medidas sintomáticas. Los procedimientos no invasivos de imagenología, tales como ecocardiografía, tomografía computarizada y espectroscopia de resonancia magnética nuclear, proporcionan información anatómica detallada y, por tanto, son herramientas valiosas para evaluar la función de los órganos. Sin embargo, con ninguno de los procedimientos mencionados ha sido posible hasta la fecha detectar procesos inflamatorios inequívocamente con una alta resolución espacial.

En Nature Biotechnology Vol. 23, Nº 8, agosto de 2005, p. 983-987, Arens et al. se describen procedimientos para realizar un seguimiento de las células inmunoterapéuticas. Por medio de imagenología por resonancia magnética (MRI) de perfluoro-15-corona-5-éter se intenta detectar células *in vivo* que poseen relevancia inmunoterapéutica. Se usaron células dendríticas cargadas *ex vivo* con perfluoro-15-corona-5-éter. Subsiguientemente, el destino de las mismas después de su inyección en tejido de ratón o administración intravenosa a ratones se examinó *in vivo*. Los documentos WO 2005/072780 A2 y WO 03/075747 A2 se refieren a exámenes similares. En Medica Mundi 47/1, abril de 2003, p. 34-39, G. M. Lanza et al. se describe el uso de nanopartículas paramagnéticas para el reconocimiento de células. En este procedimiento, se usan las nanopartículas paramagnéticas para producir la extinción de señal en la imagen de resonancia magnética ^1H . Los vehículos cargados con ^{19}F se usaron como sondas.

El documento WO-A-2005/072780 se refiere al marcado *ex vivo* de células aisladas con perfluorocarbonos. Se divulga que las células aisladas etiquetadas con perfluorocarbonos *ex vivo* son adecuadas para estudiar migraciones celulares en el organismo después de la inyección.

Oku, Naoto et al. (Biochimica et Biophysica Acta 1280 (1996), 149-154) se refiere al uso de liposomas cargados con glucosa marcada con ^{18}F para estudiar el "tráfico liposomal". Los estudios se realizaron por medio de diagnósticos PET.

El documento US 2009/0280055 A1 divulga el uso de bromuro de perfluorooctilo para fines de diagnóstico usando procedimientos de imagenología.

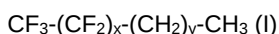
Es el objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento que permite la visualización de condiciones específicamente patológicas, tales como procesos inflamatorios, por medio de procedimientos de imagenología, y por lo tanto el reconocimiento de las regiones afectadas.

Un objetivo adicional de la presente invención es la provisión de agentes de diagnóstico a base de fluorocarbono para el diagnóstico específico de enfermedades cardiovasculares, en particular el diagnóstico de procesos inflamatorios del sistema cardiovascular, y más específicamente para el diagnóstico de miocarditis o cardiomiopatía inflamatoria.

Un objeto adicional de la invención es la provisión de un aceite biocompatible en emulsión acuosa que puede usarse para la espectroscopia de resonancia magnética y que es estable en almacenamiento, incluso en condiciones de estrés tales como la esterilización.

Una primera realización de la presente invención es una emulsión acuosa que comprende

- a) un compuesto semifluorado de fórmula I:

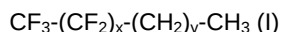


en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero que varía de 2 a 10,

- b) un triglicérido que es miscible con el compuesto semifluorado a 20 °C; y
c) un emulsionante.

Una realización específica adicional de la invención es una emulsión acuosa que comprende

- a) un compuesto semifluorado de fórmula I:



en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero que varía de 2 a 10,

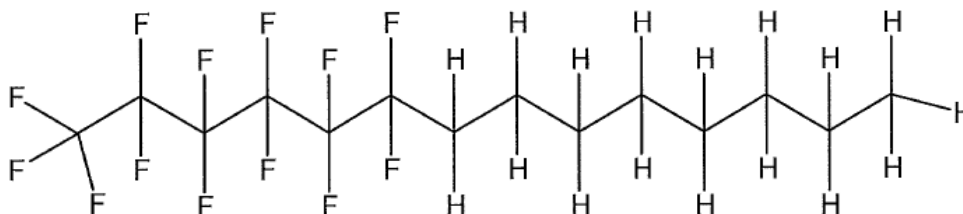
b) un triglicérido de cadena media (MCT) y

c) un emulsionante.

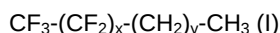
- 5 La emulsión de la invención es preferentemente una emulsión de aceite en agua que comprende obligatoriamente un compuesto semifluorado.

Los compuestos semifluorados en el contexto de la presente invención son alcanos semifluorados. Los alcanos semifluorados comprenden un fluorocarbono y un resto hidrocarbonado. Comúnmente, los alcanos semifluorados siguen las siguientes nomenclaturas: FXHY, en la que X representa el número de átomos de carbono que están sustituidos con átomos de flúor e Y representa el número de átomos de carbono que están sustituidos con átomos de hidrógeno. Por ejemplo el perfluorohexiloctano está representado por la fórmula: F6H8.

F6H8 se muestra en la siguiente fórmula:



- 15 Los compuestos semifluorados que son adecuados para las emulsiones de la presente invención se reflejan en la fórmula (I):



en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero que varía de 1 a 10.

En una realización x en la fórmula (I) varía de 2 a 6, preferentemente de 3 a 6, más preferentemente de 4 a 6 y especialmente x es 5.

- 20 En otra realización preferida adicional y en la fórmula (I) varía de 2 a 9, preferentemente de 3 a 8, más preferentemente de 5 a 8, aún más preferentemente de 6 a 8 y especialmente y es 7.

Los buenos resultados en términos de imagenología y estabilidad de la emulsión pueden lograrse con compuestos semifluorados de fórmula (I) en la que y es superior a x.

- 25 Compuestos semifluorados especialmente preferidos son perfluorohexiloctano (F6H8) y/o perfluorobutilpentano (F4H5).

Un componente adicional de la invención es un triglicérido que es miscible con el compuesto semifluorado a 20 °C (en lo sucesivo también compuesto b)).

- 30 Dentro del significado de la presente invención, el triglicérido (componente b)) es miscible en el compuesto semifluorado (componente a)) si a una temperatura de 20 °C y después del mezclado y del almacenamiento subsiguiente a 20 °C durante 24 horas el componente a) y el componente b) no forman fases continuas separadas.

En una realización preferida, el componente b) es miscible en el componente a) en cualquier relación. En particular, el componente a) y el componente b) son miscibles en una relación en peso del componente a) al componente b) de 1:20 a 1:0,7, preferentemente de 1:15 a 1:0,8, más preferentemente de 1:10 a 1:0,9, aún más preferentemente de 1:4 a 1:1, especialmente de 1:2 a 1:1.

- 35 En una realización alternativa, la relación en peso del componente a) al componente b) es de de 1:20 a 1:0,20, preferentemente de 1:15 a 1:0,25, más preferentemente de 1:10 a 1:0,30, aún más preferentemente de 1:4 a 1:0,35, especialmente de 1:2 a 1:0,4.

En una realización preferida, el triglicérido que es miscible con el compuesto semifluorado es un triglicérido de cadena media (MCT).

- 40 En una realización específica la relación en peso del componente a), preferentemente F6H8, a MCT varía de 4:1 a 1:4, especialmente de 3:2 a 2:3.

El aceite de la emulsión acuosa descrito en el presente documento comprende preferentemente triglicéridos de cadena media. Los "triglicéridos de cadena media (MCT)" son una clase de aceite de triglicéridos que o bien puede derivarse de la naturaleza o bien ser sintéticos. Los MCT se forman a partir de ácidos grasos de 6 a 14 carbonos, preferentemente de 6 a 12 carbonos, especialmente de 8 a 10 carbonos, de longitud. Los MCT pueden contener ácido caprílico (por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 80% en peso de los MCT), un FA saturado de 8 carbonos (8:0). Los MCT pueden contener ácido cáprico (por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 50% en peso de los MCT), un FA saturado de 10 carbonos (10:0). Por ejemplo, los triglicéridos de cadena media pueden contener triglicéridos de ácido caprílico y ácido cáprico, en una cantidad de al menos el 90% en peso de los triglicéridos de cadena media. La descripción de los MCT para su uso en la presente descripción puede, por ejemplo, cumplir con los requisitos de la monografía de EP 0868, titulada "Triglycerides, Medium Chain" (Triglycerida saturate media) (EP 0868, 2008).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, el triglicérido de cadena media (MCT) es glicerol que está esterificado con ácidos carboxílicos como se especifica en lo siguiente:

ácido caproico en una cantidad del 2% en peso - o inferior;

ácido caprílico en una cantidad que varía de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 80% en peso;

ácido cáprico en una cantidad que varía de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 50% en peso;

ácido láurico en una cantidad del 3% en peso o inferior;

ácido mirístico en una cantidad del 1% en peso o inferior, basándose el % en peso (% p) en el peso total de los ácidos grasos.

Los triglicéridos de cadena media (MCT) son excelentes disolventes para los compuestos semifluorados. De acuerdo con la invención, pueden usarse uno o más MCT. El MCT está disponible comercialmente como, por ejemplo, Miglyol 812 (SASOL GmbH Alemania), o CRODAMOL CGT-PN (Croda Inc, Nueva Jersey).

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la emulsión comprende un MCT que consiste en glicerol que está esterificado con ácidos grasos que comprende al menos el 50% en peso de ácidos grasos seleccionados de entre el grupo de ácidos grasos que tienen 7, 9 y 11 átomos de carbono. El preferido es triheptanoína.

La cantidad del triglicérido b), preferentemente los triglicéridos de cadena media en la emulsión de la presente invención puede variar del 2 al 40, preferentemente del 5 al 25, y más preferentemente del 8 al 18% en peso (% p), en base al peso total de la emulsión.

En un aspecto preferido de la invención, la cantidad del compuesto semifluorado a) y el triglicérido b), que es preferentemente el triglicérido de cadena media, varía del 5 al 40% en peso, preferentemente del 10 al 30% en peso, especialmente del 15 al 25% en peso, en particular del 18 al 22% en peso, por ejemplo preferentemente el 20% en peso, en base al peso total de la emulsión.

Un buen equilibrio de una alta concentración del compuesto semifluorado y una excelente estabilidad a largo plazo puede lograrse si la relación en peso del compuesto de carbono semifluorado a) al triglicérido, que es preferentemente el triglicérido de cadena media (MCT) varía de 1:20 a 1:0,7, preferentemente de 1:15 a 1:0,8, más preferentemente de 1:10 a 1:0,9, más preferentemente de 1:4 a 1:1, especialmente de 1:2 a 1:1, por ejemplo, aproximadamente 1:1,5.

En una realización alternativa, la relación en peso del componente a) al componente b) es de 1:20 a 1:0,20, preferentemente de 1:15 a 1:0,25, más preferentemente de 1:10 a 1:0,30, aún más preferentemente de 1:4 a 1:0,35, especialmente de 1:2 a 1:0,4.

La emulsión de la invención comprende el compuesto semifluorado y preferentemente el triglicérido de cadena media (MCT). De acuerdo con un aspecto de la invención, los componentes de aceite de la emulsión forman una solución homogénea a 20 °C. El MCT y el compuesto semifluorado como el F6H8 son miscibles a 20 °C y por lo tanto forman una solución homogénea. La fase oleosa puede comprender componentes de aceite adicionales, tales como triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga a base de aceite vegetal o aceites marinos como aceite de pescado. La cantidad de los componentes de aceite adicionales se ajusta preferible de forma que se mantenga una fase oleosa completamente miscible. Generalmente, la cantidad de componentes de aceite que son diferentes del compuesto semifluorado y el triglicérido b), que es preferentemente el MCT, es inferior al 50 por ciento en peso (% p), preferentemente inferior al 40% en peso, más preferentemente inferior al 30% en peso, aún más preferentemente inferior al 20% en peso, especialmente inferior al 10% en peso, en particular inferior al 5% en peso o carece esencialmente de los mismos, basándose la cantidad en el peso total de los componentes de aceite.

La relación en peso de MCT a triglicéridos de cadena larga (LCT) en la emulsión de la invención generalmente puede variar de 1:1 a 10000:1 o más, preferentemente varía de 3:2 a 1000:1, más preferentemente varía de 3:1 a

500:1, especialmente de 5:1 a 200:1.

Los aceites que pueden estar presentes en las emulsiones de la invención y que son diferentes de MCT pueden seleccionarse de "triglicéridos de cadena larga (LCT)".

En ciertas realizaciones, el aceite puede comprender un aceite vegetal. "Aceite vegetal" se refiere al aceite derivado de semillas de plantas o nueces. Los aceites vegetales son normalmente "triglicéridos de cadena larga" (LCT), formados cuando tres ácidos grasos (generalmente de 14 a 22 carbonos en longitud, con enlaces insaturados en números y ubicaciones variables, dependiendo de la fuente del aceite) forman enlaces éster con los tres grupos hidroxilo del glicerol. En ciertas realizaciones, los aceites vegetales de grado altamente purificado (también llamados "superrefinados") se usan para garantizar la seguridad y la estabilidad de las emulsiones de aceite en agua. En ciertas realizaciones pueden usarse aceites vegetales hidrogenados, que se producen mediante hidrogenación controlada del aceite vegetal.

Los aceites vegetales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aceite de almendra, aceite de babasú, aceite de semilla de grosella negra, aceite de borraja, aceite de canola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de colza, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de girasol y aceite de sésamo. Las formas hidrogenadas y/o parcialmente hidrogenadas de estos aceites también pueden usarse. En realizaciones específicas, el aceite adicionalmente comprende aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de oliva y/o aceite de soja. En realizaciones más específicas, el aceite adicionalmente comprende aceite de cártamo y/o aceite de soja.

En realizaciones específicas en las que el aceite adicionalmente comprende aceite de soja, el aceite de soja puede tener un contenido de ácido palmítico (p/p) de entre el 9 y el 13%, un contenido de ácido esteárico de entre el 2,5% y el 5%, un contenido de ácido oleico de entre el 17% y el 30%, un contenido de ácido linoleico de entre el 48% y el 58%, y un contenido de ácido linolénico de entre el 5% y el 11%.

Además, en una realización específica, la emulsión acuosa de la invención puede comprender triglicéridos estructurados. Un "triglicérido estructurado", tal como se usa en el presente documento, es un triglicérido que comprende triglicéridos o mezclas de triglicéridos que tienen al menos un grupo de ácido graso con una longitud de cadena de 6 a 12 átomos de carbono y al menos un grupo de ácido graso con una longitud de cadena de carbono de más de 12 unidades de carbono.

Un componente adicional de la emulsión de la invención es un emulsionante. Preferentemente, el emulsionante se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos, tensioactivos anfóteros e iónicos tales como sales de ácidos grasos.

El emulsionante puede estar presente en la emulsión en una cantidad de hasta el 10% en peso, preferentemente del 0,5 al 5% en peso, en base al peso total de la emulsión.

Preferentemente, el emulsionante es un fosfolípido o una mezcla de fosfolípidos.

En un aspecto, el emulsionante puede comprender lecitinas, preferentemente lecitinas de origen natural tales como lecitina de soja, lecitina de huevo, lecitina de aceite de girasol, esfingosina, gangliósidos, fitoesfingosina y combinaciones de los mismos. La lecitina hidrogenada, es decir, el producto de la hidrogenación controlada de lecitina, también puede usarse adicionalmente en el emulsionante.

Los ejemplos de fosfolípidos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, liso-fosfatidilcolina y mezclas de los mismos. El componente de fosfolípido de las composiciones puede ser o bien un fosfolípido simple o bien una mezcla de varios fosfolípidos. Los fosfolípidos usados pueden ser naturales o sintéticos, pero deben ser aceptables para la administración parenteral, especialmente intravenosa.

Una lista no exhaustiva de fosfolípidos adecuados que pueden estar presentes adicionalmente en el emulsionante se enumera a continuación:

Ácidos fosfatídicos, incluidos ácido 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatídico, sal de sodio (DMPA, Na), ácido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatídico, sal de sodio (DPPA, Na), ácido 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatídico, sal de sodio (DSPA, Na); fosfocolinas, incluidas 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC); fosfoetanolaminas, incluidas 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DLPE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE); fosfoglicerol, incluidos 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sal de sodio (DLPG, Na), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sal de sodio (DMPG, Na), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-sn-1-glicerol, sal de amonio (DMP-sn-1-G, NH₄), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sal de sodio (DPPG, Na), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sal de sodio (DSPG, Na), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-sn-1-glicerol, sal de sodio (DSP-sn-1G, Na); fosfoserinas, incluida 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-1-serina, sal de sodio (DPPS, Na); fosfolípidos de cadena mixta, incluidos 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-

fosfoglicerol, sal de sodio (POPG, Na), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sal de amonio (POPG, NH₄); lisofosfolípidos, incluidos 1-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (P-liso-PC), 1-estearoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (S-liso-PC); fosfolípidos pegilados, incluidos N-(carbonil-metoxipolietilenglicol 2000)-MPEG-2000-DPPE, sal de sodio, N-(carbonil-metoxipolietilenglicol 5000)-MPEG-5000-DSPE, sal de sodio, N-(carbonil-metoxipolietilenglicol 5000)-MPEG-5000-DPPE, sal de sodio, N-(carbonil-metoxipolietilenglicol 750)-MPEG-750-DSPE, sal de sodio, N-(carbonil-metoxipolietilenglicol 2000)-MPEG-2000-DSPE, sal de sodio.

En una realización, la cantidad de fosfolípido en la emulsión de la presente invención, en peso en base al peso total de la composición, se encuentra dentro de un intervalo del 0,1 al 30% en peso. En ciertas realizaciones, el fosfolípido puede estar presente dentro de un intervalo del 0,5 al 15% en peso, incluyendo del 0,8 al 10% en peso, tal como del 1 al 5% en peso.

En una realización ejemplar, la cantidad de fosfolípido en la emulsión acuosa de la presente invención es de hasta el 10% en peso (% p), preferentemente del 0,5 al 5% en peso en base al peso total de la emulsión.

En una realización, el emulsionante comprende lecitina de huevo que comprende el 60-80% p/p, tal como el 67% p/p, de fosfatidilcolina; el 10-20% p/p, tal como el 15% p/p, de fosfatidiletanolamina; <=3% p/p, tal como el 2% p/p, de esfingomielina; y <=3% en p/p, tal como el 1% p/p, de lisofosfatidilcolina.

La "lecitina de huevo PL90" (Fresenius Kabi AB) es un ejemplo de una lecitina de huevo que tiene tal contenido de fosfolípidos.

En particular, pueden lograrse buenos resultados con un emulsionante que comprende una lecitina que comprende de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 85% en peso de fosfatidilcolina;

de aproximadamente el 7,0 a aproximadamente el 9,5% en peso de fosfatidiletanolamina;

menos del 3% en peso de lisofosfatidilcolina;

menos del 0,5% en peso de lisofosfatidiletanolamina; y

de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 3% en peso de esfingomielina.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el emulsionante comprende una mezcla de fosfolípidos y glicolípidos. Sorprendentemente, se ha encontrado que las mezclas de fosfolípidos y glicolípidos mejoran además la estabilidad de almacenamiento de las emulsiones a temperaturas superiores (40 °C). En particular, estas mezclas estabilizan las emulsiones incluso en condiciones de estrés como la esterilización de las emulsiones. Las emulsiones de la invención están generalmente esterilizadas, por ejemplo a 121 °C durante 15 min a una presión de 2 bares en un autoclave giratorio.

Los glicolípidos son lípidos con un carbohidrato unido. Los glicolípidos son lípidos de membrana carentes de fósforo de las membranas celulares donde uno o más mono u oligosacáridos están conectados a un lípido. Los lípidos son ácidos grasos que están conectados a través de enlaces éster con glicerol o a través de enlaces amida con esfingosina.

En una realización preferida, la emulsión de la invención comprende adicionalmente glicolípidos, que se seleccionan preferentemente de gliceroglicolípidos, como mono galactosildiglicérido o glicosfingolípidos o cerebrósidos.

En una realización preferida, la cantidad de glicolípidos es del 5 al 30% en peso, preferentemente del 10 al 28% en peso en base al peso total de la suma de glicolípido y fosfolípido. Las mezclas de fosfolípidos y glicolípidos están disponibles comercialmente como Lipoid S 75 ex Lipoid GmbH, Alemania.

En una realización preferida especial el emulsionante comprende

de aproximadamente el 68 a aproximadamente el 73% en peso de fosfatidilcolina;

de aproximadamente el 7 al 10% en peso de fosfatidiletanolamina;

menos de aproximadamente el 3% en peso de lisofosfatidilcolina; y

de aproximadamente el 14 a aproximadamente el 25% en peso de glicolípidos, basándose todo el peso en la cantidad total de la suma de glicolípidos y fosfolípidos.

La emulsión comprende preferentemente del 0,5 al 5% en peso, más preferentemente del 1,0 al 4,0% en peso de un emulsionante, basándose la cantidad en el peso total de la emulsión.

La emulsión de la invención es preferentemente una emulsión de aceite en agua en la que la fase acuosa es la fase continua y la fase oleosa es la fase discontinua.

Como se señaló anteriormente, la emulsión de aceite-en-agua de la presente invención comprende además un

medio acuoso. "Medio acuoso" o "fase acuosa" se refiere a un líquido que contiene agua. En algunas realizaciones, el medio acuoso es agua y/o una solución amortiguadora acuosa.

La emulsión acuosa, preferentemente la emulsión de aceite en agua, de la invención puede comprender del 70 al 98% en peso, preferentemente del 70 al 90% en peso de agua, en base al peso total de la emulsión.

- 5 En algunas formas de realización, la emulsión puede comprender de 0 a 4 mM, preferentemente de 0,5 a 3 mM de un agente amortiguador fisiológicamente compatible.

En algunas realizaciones, las emulsiones acuosas de acuerdo con la presente invención comprenden opcionalmente un co-tensioactivo. Los co-tensioactivos adecuados para su uso en las emulsiones de la presente invención son aquellos que impiden la floculación y/o coalescencia de la emulsión de lípidos. Los co-tensioactivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a colesterol, ácido oleico, oleato, Tween80 (monooleato de PEG-sorbitán), HCO-60, Solutol H15 (polioxietileno-660-hidroxiestearato), PEG-400 (polietilenglicol), Pluronic F68 (BASF), Cremofor EL (polioxietileno-35-ricinoleato), o la sal de un ácido biliar, tal como ácido desoxicólico. En otras realizaciones, el co-tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos C12-C22, sales de los mismos y/o mezclas de los mismos, como de ácidos grasos C16-C20, sales de los mismos y/o mezclas de los mismos, o ácidos grasos C18, sales de los mismos y/o mezclas de los mismos. En realizaciones específicas, el ácido graso es monoinsaturado.

En algunas realizaciones, el co-tensioactivo puede estar presente en la emulsión en una cantidad (% p) superior o igual al 0,005%, superior o igual al 0,01%, o superior o igual al 0,02%. De acuerdo con cualquiera de estas realizaciones, el co-tensioactivo puede estar presente en una cantidad (% p) inferior o igual al 4%, inferior o igual al 1%, o inferior o igual al 0,04%.

- 20 En realizaciones específicas, el co-tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos de cadena larga, como ácido palmítico, ácido oleico o ácido esteárico, o las sales alcalinas de los mismos. El oleato y/o el ácido oleico, particularmente el oleato de sodio, son co-tensioactivos particularmente adecuados.

En ciertas realizaciones en las que el co-tensioactivo es oleato y/o ácido oleico, el co-tensioactivo puede estar presente en una cantidad (% p) igual o superior al 0,005% en peso, igual o superior al 0,01% en peso, o igual o superior al 0,02% en peso. De acuerdo con cualquiera de estas realizaciones, el co-tensioactivo puede estar presente en una cantidad (% p) inferior o igual al 0,5% en peso, inferior o igual al 0,2% en peso, inferior o igual al 0,1% en peso, o inferior o igual al 0,05% en peso. En realizaciones específicas, el co-tensioactivo es oleato de sodio y está presente en una cantidad del 0,03% en peso (0,3 g/l). Las emulsiones descritas en el presente documento pueden ser adecuadas para infusión por vía parenteral, tal como infusión por vía intravenosa. En realizaciones específicas, la concentración de ciertos co-tensioactivos, por lo tanto, se mantiene a un mínimo para evitar efectos secundarios como irritación, inhibición del citocromo P450, etc. En realizaciones específicas, Pluronic F68 (poli(etilenglicol)-13-poli(propilenglicol-co-propilenglicol) está presente en una cantidad inferior al 0,7% en peso, o inferior al 0,5% en peso. En otras realizaciones específicas, Solutol-HS (Macrogol-15-hidroxiestearato) está presente en una cantidad inferior al 1,2% en peso, o inferior al 1% en peso.

- 35 La emulsión de aceite en agua de acuerdo con la invención puede comprender un agente de tonicidad. Tales composiciones pueden tener una osmolalidad en el intervalo de 200-1000 mOsm/kg, preferentemente 220 a 800 mOsm/kg, especialmente 250 a 600 mOsm/kg.

De acuerdo con realizaciones específicas de la invención, las emulsiones pueden ser isotónicas e isosmóticas. Las composiciones pueden tener una osmolalidad de 220-600 mOsm/kg, o de 230 a 360 mOsm/kg.

- 40 Los agentes de tonicidad adecuados incluyen cloruro de potasio o de sodio, trahalosa, sacarosa, sorbitol, glicerol, glucosa, xilitol, manitol, polietilenglicol, propilenglicol, albúmina, aminoácidos y mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones, una osmolalidad de 270 a 330 mOsm/kg, tal como 280 a 300 mOsm/kg, se logra con un agente que también aumenta la presión osmótica, como glicerol, dextrosa, lactosa, sorbitol o sacarosa.

- 45 En una realización, el agente de tonicidad es un poliol fisiológicamente aceptable, como glicerol, sorbitol o xilitol. En una realización específica, el agente de tonicidad es glicerol.

Así, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la emulsión adicionalmente comprende un agente de tonicidad, preferentemente glicerol.

El agente de tonicidad puede estar presente en una cantidad que varía del 0,1 al 10% en peso, preferentemente del 0,5 al 8% en peso, más preferentemente del 1 al 5% en peso, en base al peso total de la emulsión.

- 50 El agente de tonicidad se usa generalmente en una cantidad que no tiene efectos biológicos adversos, pero que es suficiente para proporcionar composiciones isosmóticas y/o isotónicas. Cuando el glicerol es el agente de tonicidad, el glicerol puede estar presente en el intervalo del 2 al 5% (% p), tal como del 2,1% al 2,9% (% p), incluyendo del 2,3% al 2,7%. En realizaciones específicas, las emulsiones de la presente invención comprenden el 2,5% de glicerol (25 g/l). En una realización adicional, el agente de tonicidad está presente en una cantidad del 2,5% en peso o superior, en base al peso total de la emulsión.

En algunas realizaciones, las emulsiones de acuerdo con la presente invención tienen un pH dentro del intervalo de pH de 6,0 a pH 9,0, tal como de pH 6,5 a pH 8,5, incluyendo un pH de 7,5 a 8,5, tal como de 8,0 a 8,5. En una realización alternativa, el pH puede variar dentro de un intervalo de 5,0 a 9,0. El pH de las composiciones puede ajustarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de una base apropiada que neutraliza la carga negativa de los ácidos grasos, mediante el uso de un amortiguador apropiado, o una combinación de los mismos. Una variedad de bases y amortiguadores es apropiada para su uso con las emulsiones de la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que la adición de amortiguador a la emulsión no sólo afectará al pH final, sino también a la fuerza iónica de la emulsión. Los amortiguadores de alta fuerza iónica pueden afectar negativamente el potencial zeta de la emulsión y son, por lo tanto, no deseables. En una realización específica, se ajusta el pH al valor deseado mediante la adición de hidróxido de sodio, como un hidróxido de sodio 0,1 N o de hidróxido de sodio 1 N. Con el fin de estabilizar además la emulsión de la invención contra procesos oxidativos puede estar presente un antioxidante. En una realización preferida, la emulsión comprende adicionalmente un antioxidante, preferentemente alfa-tocoferol.

La emulsión de acuerdo con la presente invención comprenden opcionalmente uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como aditivos agentes acidificantes, alcalinizantes, de unión, quelantes, complejantes, solubilizantes, antisépticos, conservantes (incluidos antimicrobianos y antioxidantes), agentes de suspensión, agentes estabilizantes, agentes humectantes, agentes modificadores de viscosidad, disolventes, crioprotectores, diluyentes, lubricantes y otros materiales biocompatibles o agentes terapéuticos. En ciertas realizaciones, dichos aditivos ayudan a estabilizar aún más la emulsión o a hacer que las emulsiones de la presente invención sean biocompatibles.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la densidad a 25 °C de la fase oleosa, en particular, la densidad de la mezcla consistente de triglicéridos b) que es preferentemente MCT, y el compuesto semifluorado, varía entre 0,9 a 1,1 g/cm³, más preferentemente varía entre 0,95 y 1,05 g/cm³ o de aproximadamente 0,95 a aproximadamente 1,10 g/cm³. En un aspecto adicional de la invención, la densidad de la fase oleosa no se desvía más de 10%, preferentemente no más de 5%, especialmente no más de 3% de la densidad de la fase acuosa. La fase acuosa comprende todos los ingredientes que están en la fase continua y la fase oleosa comprende todos los componentes que están en la fase discontinua.

Se ha encontrado que pueden lograrse buenos resultados de diagnóstico con emulsiones que tienen un tamaño de gota de aceite en el intervalo nanométrico. De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, las partículas de la fase discontinua tienen un diámetro de partícula promedio preferentemente que varía de 1 a 500 nm, más preferentemente de 10 a 400 nm y aún más preferentemente de 50 a 350 nm, medido con espectroscopia de correlación de fotones (PCS) a 25 °C.

Una realización adicional de la invención es la emulsión de la invención para su uso como medicamento.

Se ha encontrado que el compuesto semifluorado presente en la emulsión de la presente invención es absorbido por los monocitos/macrófagos de tal manera que las células se vuelven marcadas específicamente, que pueden usarse para el diagnóstico en los procedimientos de imagenología. Sorprendentemente, se encontró un potencial de diagnóstico para la visualización de procesos inflamatorios, en particular del sistema cardiovascular, y ganglios linfáticos.

Por lo tanto, las emulsiones de las invenciones son adecuadas para su uso como agente de contraste o agente mejorador del contraste. En particular, para las técnicas de imagenología por resonancia magnética nuclear, las emulsiones son adecuadas ya que dicho compuesto de carbono semifluorado de las emulsiones está enriquecido y se distribuye específicamente en los tejidos inflamatorios.

Otro aspecto de la invención es la emulsión de la invención para su uso como agente mejorador de contraste o agente de contraste para la detección de diagnóstico, por medio de un procedimiento de imagenología que usa técnicas MR.

Una realización adicional de la presente invención es la emulsión de la invención para su uso como agente de contraste para la detección de diagnóstico, por medio de un procedimiento de imagenología, en particular en el que el proceso de imagenología se basa en la medición de la resonancia magnética nuclear del isótopo ¹⁹F.

La evaluación de las mediciones correspondientes y la conversión de las mismas en una imagen es conocida para un experto, como puede observarse, por ejemplo, en:

Haacke M E, Brown W R, Thompson M R, Venkasetan R: Magnetic Resonance Imaging-Physical Principles and Sequence Design, Wiley, Nueva York, 1999;

Yu J X, Kodibagkar V D, Cui W, Mason R P. ¹⁹F: a versatile reporter for noninvasive physiology and pharmacology using magnetic resonance; Curr Med Chem. 12: 819-48, 2005;

Wernick M N, Aarsvold J N Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT, Academic Press, Londres, 2004.

Las emulsiones son, en particular, adecuadas para detectar procesos inflamatorios. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la emulsión es para la detección de diagnóstico, por medio de un proceso de imagenología, de los procesos inflamatorios seleccionados del grupo que consiste en reacción inflamatoria periférica a infartos como infarto de miocardio, apoplejía; inflamación de órganos, como miocarditis, encefalitis, meningitis; esclerosis múltiple; inflamación del aparato gastrointestinal, como enfermedad de Crohn; inflamación de los vasos, como arteriosclerosis, en particular, placas vulnerables; detección de abscesos y también artritis, en la que el proceso de imagenología se basa en medir la resonancia magnética nuclear del isótopo ^{19}F .

En otro aspecto de la invención, la emulsión es para su uso en la detección de diagnóstico, basada en procedimientos de imagenología no invasivos del sistema cardiovascular, incluidos el miocardio, arterias y venas; reacciones inflamatorias que ocurren en procesos patológicos tales como infarto de miocardio, miocarditis, aterosclerosis y trombosis que conducen a procesos inflamatorios y degenerativos de la vasculatura encontrados en neurología tales como apoplejía o tumor; pulmonología tales como trombosis, inflamación, sarcoidosis; gastroenterología tales como tumores, enfermedades inflamatorias intestinales como enfermedad de Crohn; y reumatología tales como enfermedades autoinmunitarias de los vasos tales como arteritis de Takayasu.

Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento que comprende adquirir procedimientos de imagenología no invasiva de un paciente al que la emulsión de la invención se ha administrado previamente con el fin de disolverla en el torrente sanguíneo del paciente.

Preferentemente, el procedimiento de imagenología no invasiva es un procedimiento de imagenología RM.

En un aspecto adicional preferido del procedimiento de la invención, el proceso de imagenología se basa en medir la resonancia magnética nuclear del isótopo ^{19}F o el isótopo ^{19}F y el isótopo ^1H .

La presencia de los isótopos ^{19}F y/o ^{18}F en los compuestos fluorados permite la ventaja de usar dispositivos ya conocidos y existentes en el hospital, a saber, espectroscopia de resonancia nuclear magnética con isótopos ^{19}F y/o el uso de la espectroscopia de emisión de positrones de isótopos ^{18}F .

Por el uso de la emulsión de acuerdo con la invención pueden detectarse las siguientes condiciones patológicas particularmente:

- 1) Visualización de los ganglios linfáticos y su ampliación patológica
 - a) cánceres que afectan directamente a los ganglios linfáticos: enfermedad de Hodgkin, linfomas de no Hodgkin;
 - b) metástasis tumorales, por ejemplo, de cáncer de mama;
 - c) infecciones víricas y bacterianas, por ejemplo, sífilis, tuberculosis;
- 2) Reacciones de inflamación en la zona fronteriza de
 - a) infartos, por ejemplo, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular;
 - b) tumores;
- 3) inflamación de órganos: miocarditis, encefalitis, meningitis (meninges cerebrales y espinales);
- 4) esclerosis múltiple;
- 5) inflamaciones del aparato gastrointestinal, por ejemplo, enfermedad de Crohn;
- 6) inflamación de los vasos, por ejemplo, arteriosclerosis, especialmente llamados "placas vulnerables";
- 7) detección de abscesos;
- 8) detección de artritis.

La emulsión de la invención se administra habitualmente por vía parenteral antes de iniciar el proceso de imagenología. En una realización preferida, la emulsión se administra por vía intravenosa o intraarticular.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la detección de un proceso inflamatorio, que comprende:

- (a) administrar la emulsión de la invención a un sujeto en necesidad de ello; y
- (b) formar imágenes del compuesto que contiene flúor en dicho sujeto,

seleccionándose dicho proceso inflamatorio preferentemente del grupo que consiste en:

un cáncer que afecta directamente los ganglios linfáticos; un proceso inflamatorio en la zona fronteriza de un infarto o tumor; inflamación de un órgano; esclerosis múltiple; inflamación del aparato gastrointestinal; inflamación de vasos; artritis; y abscesos.

Una realización adicional de la invención es un procedimiento para la fabricación de la emulsión de la invención que comprende las siguientes etapas:

- 5 i) proporcionar una mezcla que comprende
 - a) un compuesto semifluorado de fórmula I:
$$\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_x-(\text{CH}_2)_y-\text{CH}_3 \text{ (I)}$$
en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero de 1 a 10.
- 10 b) un triglicérido que es miscible con el compuesto semifluorado a 20 °C, preferentemente un triglicérido de cadena media (MCT) y
- c) un emulsionante, y
- d) agua; y
- 15 ii) homogeneizar la mezcla, preferentemente homogeneizando la mezcla en un homogeneizador de alta presión;
- iii) opcionalmente esterilizar la emulsión.

En otro aspecto el procedimiento de fabricación comprende las etapas de:

- i) disolver el compuesto semifluorado en triglicérido b), que es preferentemente el triglicérido de cadena media; y
- 20 ii) emulsionar la fase oleosa en la fase acuosa, preferentemente en presencia del emulsionante.

De acuerdo con una realización específica, la composición acuosa se homogeneiza con el fin de producir una suspensión homogénea, antes de que dicha composición acuosa se combine con la composición oleosa.

En una realización específica, la homogeneización se realiza a una presión superior o igual a 350 bares, o superior o igual a 370 bares.

- 25 En realizaciones específicas, los procedimientos de fabricación de las emulsiones implican las etapas de disolver el emulsionante en medio acuoso (en lugar de en aceite), añadir la fase oleosa a la fase acuosa (en lugar de al revés), y homogeneización a una presión superior o igual a 350 bareskPa. Estas etapas dan lugar a emulsiones con propiedades ventajosas en términos de tamaño de partícula y estabilidad de emulsión.

- 30 En otra realización específica, la emulsión se empaqueta en recipientes sellados, y se esteriliza, como por calentamiento a al menos 121 °C (por ejemplo, de 121 °C a 123 °C) durante un mínimo de 15 minutos de tiempo de mantenimiento. El programa de autoclave puede ser un ciclo giratorio.

Una realización adicional de la invención es un recipiente que contiene la emulsión de la invención. El material del recipiente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en vidrio y polímeros orgánicos y mezclas de los mismos. Los polímeros orgánicos preferidos son polietileno y/o polipropileno.

- 35 En una realización preferida del procedimiento de fabricación de la invención, dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
 - a) preparar una mezcla del modo siguiente
 - a-1) preparar una mezcla que comprende agua y un emulsionante,
 - a-2) preparar una mezcla homogénea que comprende el compuesto semifluorado y el triglicérido,
 - 40 a-3) combinar la mezcla obtenida en la etapa a-1) con la mezcla obtenida en la etapa a-2); y
 - b) homogeneizar la mezcla obtenida en la etapa a), preferentemente homogeneizar la mezcla obtenida en la etapa a) con un homogeneizador de alta presión.

En una realización especialmente preferida del procedimiento de fabricación de la emulsión de la presente invención, dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 45 a) preparar una mezcla del modo siguiente

a-1) preparar una mezcla que comprende los componentes solubles en agua de la emulsión, preferentemente una mezcla que comprende agua, emulsionante y agente de tonicidad, en particular una mezcla que comprende agua, fosfolípido, oleato de sodio y glicerol,

5 a-2) preparar una mezcla homogénea de los componentes solubles en aceite de la emulsión, preferentemente una mezcla que comprende el compuesto semifluorado, el triglicérido y un antioxidante, más preferentemente una mezcla que comprende F6H8, MCT y alfa-tocoferol,

a-3) combinar la mezcla obtenida en la etapa a-1) con una mezcla obtenida en la etapa a-2); y

b) homogeneizar la mezcla obtenida en la etapa a) para preparar una pre-emulsión;

10 c) homogeneizar adicionalmente la mezcla obtenida en la etapa b) mediante un homogeneizador de alta presión.

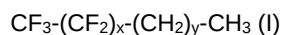
Sorprendentemente, se ha encontrado que los mejores resultados pueden obtenerse homogeneizando la emulsión en el etapa b) y la etapa c) en un intervalo de temperatura preferido de entre 30 a 70 °C, más preferentemente entre 40 y 60 °C.

15 En una realización preferida adicional del procedimiento de fabricación se aplica una etapa d) en la que la emulsión se esteriliza, preferentemente por calentamiento a al menos 121 °C durante un mínimo de 15 minutos.

Las cantidades y los componentes preferidos de la emulsión se mencionan en combinación con la emulsión de la invención.

20 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para operar un tomógrafo de resonancia magnética. En este procedimiento se emite un campo magnético alterno y se detecta la absorción del campo magnético emitido por una muestra a examinar.

Estas etapas de procedimiento corresponden a la operación habitual de un tomógrafo de resonancia magnética. El procedimiento de la invención sirve para la detección de un compuesto semifluorado de fórmula I:



25 en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero que varía de 2 a 10 en una emulsión de la presente invención.

El procedimiento de la invención se caracteriza en que la frecuencia del campo magnético alterno está entre $B \times 40,045600 \text{ MHz/T}$ y $B \times 40,065600 \text{ MHz/T}$, siendo B la intensidad de campo magnético en Tesla.

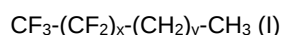
Con el fin de obtener la frecuencia anteriormente mencionada para el campo magnético alterno se han realizado las siguientes etapas de procedimiento:

30 En primer lugar, la frecuencia del campo magnético alterno ha sido elegida con $B \times 40,05560 \text{ MHz/T}$. Con el fin de detectar un compuesto desconocido que contiene un átomo de flúor se usa una amplia excitación y recepción de ancho de banda (por ejemplo +/- 5 kHz). En el centro de esta banda de excitación está la frecuencia de excitación del núcleo de átomo de flúor ($40,05560 \text{ MHz/T}$). Esta frecuencia se define como la posición cero.

35 Durante la excitación el espectro característica del compuesto desconocido que contiene flúor aparece en una cierta frecuencia de desplazamiento. Si este no es el caso, el ancho de banda elegido (por ejemplo +/- 5 kHz) tiene que ser ampliado.

40 Después de que el espectro específico se haya encontrado en una cierta frecuencia el espectro de excitación se desplaza eligiendo una frecuencia de desplazamiento apropiada. Los inventores han encontrado que una frecuencia de desplazamiento de +/- 100 Hz a +/- 10.000 Hz es apropiada. Al elegir una frecuencia tal la excitación y recepción de ancho de banda pueden reducirse significativamente, obteniendo así una reducción del ruido de modo que pueda obtenerse una mejor señal a la relación de ruido.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento para detectar en una muestra que se va a examinar un compuesto semifluorado de fórmula I:



45 en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero que varía de 2 a 10 en una emulsión de la invención. En este procedimiento se emite un campo magnético alterno y se detecta la absorción del campo magnético emitido por una muestra a examinar. Estas etapas corresponden a la operación habitual de un tomógrafo de resonancia magnética.

50 De acuerdo con la presente invención, al menos una imagen de protones de flúor ^{19}F se superpone sobre una imagen de protón ^1H . Con ello, los protones de la imagen ^1H se muestran como una imagen de escala en grises y

los protones de la imagen de flúor ^{19}F se muestran mediante el uso de un gradiente de color, indicando un extremo de este gradiente de color una baja concentración de protones de flúor ^{19}F e indicando el otro extremo de este gradiente de color una alta concentración de protones de flúor ^{19}F .

5 Estas etapas de procedimiento pueden aplicarse, por ejemplo, para asignar la señal de flúor detectada a una cierta parte del cuerpo de un paciente. Para este propósito es posible interpolar el volumen ^{19}F y el volumen ^1H con el fin de obtener una mejor resolución. Como se ha explicado, la imagen de protón ^1H se visualiza como una imagen de escala en grises, mientras que la imagen de protón de flúor ^{19}F puede mostrarse, por ejemplo, como un gradiente de color que cambia de negro a verde o de azul a rojo, por ejemplo.

10 En primer lugar, se genera un video tridimensional. Sin embargo, se prefiere que se generen las imágenes bidimensionales subsiguientes de cada capa, mostrando cada una de las mismas una sección transversal de la muestra que se va a examinar. Se prefiere que se calculen las proyecciones de máxima intensidad (MIP). Estas imágenes de capas bidimensionales muestran de manera comprensiva en cuáles está presente la estructura anatómica del agente de contraste.

15 En una realización preferida de la presente invención, las señales de alteración generadas por los protones de flúor ^{19}F en una segunda muestra que no se va a examinar se eliminan. Tales señales de alteración pueden, por ejemplo, generarse por el agente de contraste en el hígado o el bazo de un paciente. El agente de contraste en el hígado puede causar una señal de alteración muy fuerte cuando durante un proceso de imagenología se pretende detectar, por ejemplo, una inflamación en la región del corazón de un paciente, ya que el hígado se localiza muy cerca del corazón.

20 Con el fin de eliminar tales señales de alteración es posible comparar el valor para la concentración de flúor en un primer píxel con los valores de todos los píxeles próximos en el espacio tridimensional alrededor de este primer píxel. Por este medio, si la diferencia entre los valores para la concentración de flúor de dos píxeles adyacentes es inferior a un umbral, se considera que estos dos píxeles pertenecen a un conjunto de píxeles, por ejemplo, al hígado del paciente. Este conjunto de alteración de píxeles puede eliminarse de la imagen obtenida si este conjunto no
25 representa la muestra que se va a examinar (en este caso el corazón del paciente). La eliminación de este conjunto de alteración puede realizarse, por ejemplo, manualmente.

Cuando se superponen imágenes de flúor ^{19}F con la imagen de protón ^1H se prefiere que estas imágenes se hayan obtenido sin cambiar la geometría de medición, lo que significa que ambos conjuntos de datos contienen señales desde el mismo volumen.

30 El ruido que puede estar presente en las imágenes de protón de flúor ^{19}F puede suprimirse promediando las diferentes tomas. La desviación estándar σ del ruido se mide, para lo que puede usarse $3 \cdot \sigma$ o $5 \cdot \sigma$ como un umbral para la señal que se va a detectar. Esto significa que solo las señales que son tres veces más altas que la desviación estándar del ruido son consideradas como una señal "real". Este umbral puede adaptarse por el usuario de modo que es posible adaptar las imágenes obtenidas a la cantidad de ruido. Se prefiere que las últimas etapas
35 de procedimiento mencionadas no se apliquen a las imágenes de protón ^1H , puesto que estas tienen una SNR mayor.

Todas las etapas de procedimiento que se han discutido en el contexto de la última invención mencionada están básicamente relacionadas con las etapas de procesamiento de señal y por lo tanto pueden realizarse independientemente a partir del proceso de adquisición de datos en cualquier momento y en cualquier lugar. En particular, al realizar estas etapas de procedimiento no requieren la presencia de un cuerpo de paciente.
40

Las realizaciones preferidas de las emulsiones usadas en los procedimientos de la invención se describen junto con la emulsión de la invención.

A continuación, la invención se ilustra adicionalmente por medio de ejemplos:

Sección experimental

45 Ejemplos 1-3

Las emulsiones de la sección experimental en general, se han preparado del modo siguiente:

- 1) mezclar el emulsionante con agua;
- 2) preparar una mezcla de los componentes hidrófobos tales como MCT, compuesto fluorado y opcionalmente α -tocoferol;
- 50 3) añadir la mezcla acuosa de la etapa 1) a la mezcla oleosa de la etapa 2);
- 4) homogeneizar la emulsión con un homogeneizador de alta presión 3 veces a 700 bares y 2 veces a 1000bares en un homogeneizador de alta presión Panda® Plus 2000.

La Tabla 1 muestra las composiciones de emulsión de aceite en agua y la Tabla 2 muestra los datos de estabilidad de almacenamiento respectivos a 20 °C. Las cantidades referidas en la Tabla son en % en peso (% p) en base al peso total de la emulsión.

Tabla 1: Composiciones de emulsión de aceite en agua de acuerdo con los ejemplos 1 a 3 de la invención y el ejemplo comparativo 9

Componente	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo Comparativo 9
F6H8 ¹⁾	4	6	8	20
MCT ²⁾	16	14	12	----
Lipoid E 80 ³⁾	2	2	2	2
Agua	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

¹⁾ Perfluorhexiloctano ex Novaliq, Alemania

²⁾ Triglicéridos de cadena media (50-80% en peso de ácido graso C8 y 20-50% en peso de ácido graso C10)

³⁾ fosfolípidos de huevo ex lipoidea GmbH, Alemania

Tabla 2: Datos de estabilidad de almacenamiento de las emulsiones de acuerdo con los ejemplos 1 a 3

Ejemplo	Tiempo de almacenamiento [días]	Zpromedio [nm]	I.P.	pH
1	0	148,3	0,073	8,09
	7	158,1	0,093	6,61
	14	169,2	0,098	6,12
	28	173,9	0,098	5,83
2	0	166,1	0,054	8,10
	7	173,6	0,075	6,59
	14	184,2	0,061	6,19
	28	185,0	0,069	5,96
3	0	155,7	0,075	8,11
	7	167,7	0,065	6,62
	14	176,7	0,068	6,08
	28	178,5	0,090	5,98

El diámetro de partícula promedio (Z_{promedio}) y el índice de polidispersidad (I.P.) se han determinado mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS).

La Figura 1 muestra los datos para las pruebas de estabilidad de almacenamiento tal como se refleja en la Tabla 2, así como los datos con referencia al ejemplo comparativo 9.

- 5 La Figura 1A muestra el crecimiento de partícula de las emulsiones de acuerdo con los ejemplos 1 a 3, así como el ejemplo comparativo 9. La medición de crecimiento de partículas comenzó inmediatamente después de la fabricación de la emulsión.

- 10 La Figura 1A muestra que el diámetro de partícula promedio de las gotas de aceite dentro de 28 días aumenta en aproximadamente el 11% para el ejemplo 1, en aproximadamente el 15% para el ejemplo 2, en aproximadamente el 17% para el ejemplo 3 y en aproximadamente el 23% para el ejemplo comparativo 9. El aumento de crecimiento de partícula es mayor cuanto mayor es la concentración del compuesto semifluorado.

La Fig. 1B muestra la dependencia del aumento de crecimiento de partícula de la concentración del compuesto semifluorado F6H8.

- 15 La Tabla 2A refleja los datos que se muestran en las Figuras 1, 1A y 1B. Las pruebas de almacenamiento se han realizado a 20 °C.

Tabla 2 A

Ejemplo	Tiempo de almacenamiento [días]	Z_{promedio} [nm]	P.I.	Aumento de crecimiento de partícula absoluto [nm]	Aumento de crecimiento de partícula relativo [%]
1	0	148,3	0,073	0,0	0,0
	7	158,1	0,093	7,5	4,5
	14	169,2	0,098	18,1	10,9
	28	173,9	0,098	18,9	11,4
2	0	166,1	0,054	0,0	0,0
	7	173,6	0,075	12,0	7,7
	14	184,2	0,061	21,0	13,5
	28	185,0	0,069	22,8	14,6
3	0	155,7	0,075	0,0	0,0
	7	167,7	0,065	9,8	6,6
	14	176,7	0,068	10,9	14,1
	28	178,5	0,090	25,6	17,3
Ejemplo	0	132,4	0,181	0,0	0,0

Comparativo 9	7	154,1	0,183	21,7	16,4
	14	156,2	0,187	23,8	18,0
	28	163,4	0,177	31,0	23,4

Se ha encontrado que puede lograrse un equilibrio optimizado de una alta concentración del compuesto semifluorado (que es necesario para lograr un buen contraste en la medición MR) y una emulsión estable de almacenamiento si la densidad de las gotas de aceite (MCT y el compuesto semifluorado) es aproximadamente la misma que la densidad de la fase acuosa. Mediante la adaptación de la densidad de la fase oleosa a la densidad de los fenómenos de coalescencia de fase acuosa de las gotas, así como mediante fenómenos de sedimentación, que desestabilizan la emulsión, puede disminuirse.

La Figura 1C muestra los resultados de la medición de densidad de diferentes mezclas de MCT y F6H8.

A aproximadamente el 38,5% en peso de F6H8 y aproximadamente el 61,5% en peso de MCT, (peso basado en el peso total de la fase oleosa) la densidad de la mezcla oleosa corresponde a la densidad de la fase acuosa.

EJEMPLOS COMPARATIVOS 1-8, 9A y 10-12

El bromuro de perfluorooctilo (PFOB) es un agente de contraste conocido para la espectroscopia de resonancia magnética. Se ha encontrado que el PFOB no puede disolverse en MCT. Por lo tanto, se han preparado emulsiones en las que el PFOB se estabiliza mediante bromuro de perfluorodecilo (PFDB), que puede disolverse en PFOB.

La Tabla 3 y la Tabla 4 muestran las composiciones de emulsión de aceite en agua de los ejemplos comparativos 1-8, 9A y 10-12 y la Tabla 6 muestra los datos de estabilidad de almacenamiento respectivos a 20 °C. Las cantidades mencionadas en las Tablas 2 y 4 son en % en peso (% p) en base al peso total de la emulsión.

Tabla 3: Ejemplos Comparativos 1 a 4

Componente	Ejemplo Comparativo1	Ejemplo Comparativo2	Ejemplo Comparativo 3	Ejemplo Comparativo 4
PFOB ¹⁾	20	20	20	20
PFDB ²⁾	0.2	1	2	4
Lipoid E 80 ³⁾	2	2	2	2
Agua	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

¹⁾ Bromuro de perfluorooctilo ex ABCR GmbH & Co. KG, Alemania

²⁾ Bromuro de perfluorodecilo ex ABCR GmbH & Co. KG, Alemania

³⁾ Fosfolípido de huevo ex Lipoid GmbH, Alemania

Tabla 4: Ejemplos comparativos 5 a 8

Componente	Ejemplo Comparativo 5	Ejemplo Comparativo 6	Ejemplo Comparativo 7	Ejemplo Comparativo 8
PFOB ¹⁾	20	20	20	20
PFDB ²⁾	0.2	1	2	4
Lipoid S 73 ³⁾	2	2	2	2
Agua	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

¹⁾ Bromuro de perfluorooctilo

²⁾ Bromuro de perfluorodecilo

5 ³⁾ fosfolípido ex Lipoid GmbH, Alemania

Tabla 5: Ejemplos Comparativos 9A y 10 a 12

Componente	Ejemplo Comparativo 9A	Ejemplo Comparativo 10	Ejemplo Comparativo 11	Ejemplo Comparativo 12
PFOB ¹⁾	20	20	20	20
PFDB ²⁾	0.2	1	2	4
Lipoid S 75 ³⁾	2	2	2	2
Agua	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

¹⁾ Bromuro de perfluorooctilo ex ABCR GmbH & Co. KG, Alemania

²⁾ Bromuro de perfluorodecilo ex ABCR GmbH & Co. KG, Alemania

10 ³⁾ Fosfolípido de soja ex Lipoid GmbH, Alemania

Tabla 6: Datos de estabilidad de almacenamiento de las emulsiones de acuerdo con los Ejemplos comparativos 1 a 8, 9A y 10 a 12

Ejemplo Comparativo	Tiempo de almacenamiento [días]	ZAverage [nm]	P.I.	pH
1	0	168,5	0,128	6,93
	7	314,3	0,197	5,59
	14	310,0	0,217	5,14

ES 2 616 884 T3

	28	316,5	0,242	4,52
2	0	119,7	0,187	6,75
	7	270,8	0,150	5,55
	14	278,4	0,221	5,35
	28	267,6	0,187	5,32
3	0	157,7	0,155	7,11
	7	249,0	0,156	5,85
	14	263,7	0,153	5,53
	28	178,4	0,061	5,74
4	0	157,5	0,193	6,99
	7	244,7	0,121	6,01
	14	267,5	0,120	5,71
	28	259,2	0,154	5,55
5	0	141,5	0,222	7,25
	7	318,8	0,160	6,47
	14	377,9	0,250	6,40
	28	485,8	0,358	6,04
6	0	130,1	0,282	2,27
	7	290,5	0,134	6,98
	14	444,3	0,224	6,62
	28	365,5	0,257	6,73
7	0	146,7	0,184	7,75
	7	269,0	0,171	6,96
	14	289,8	0,160	5,83
	28	315,4	0,156	6,56

8	0	141,9	0,217	7,58
	7	230,8	0,129	6,68
	14	253,0	0,117	6,69
	28	346,6	0,133	5,90
9A	0	170,1	0,117	7,29
	7	272,8	0,114	6,38
	14	283,2	0,121	5,79
	28	249,6	0,071	5,23
10	0	152,4	0,137	7,18
	7	241,8	0,094	5,96
	14	233,5	0,100	5,59
	28	243,3	0,092	5,29
11	0	165,5	0,128	7,18
	7	217,5	0,115	6,04
	14	224,1	0,136	6,03
	28	224,8	0,096	5,66
12	0	144,9	0,135	7,24
	7	207,0	0,127	5,78
	14	212,4	0,092	5,97
	28	208,9	0,107	5,71

La Figura 2 muestra los datos para las pruebas de estabilidad de almacenamiento como se refleja en la Tabla 6. En la parte izquierda de la Fig. 2 se representan los datos para las emulsiones de acuerdo con los Ejemplos comparativos 1 a 4 y en la parte derecha los datos para las emulsiones de acuerdo con los Ejemplos comparativos 5 a 8.

La Figura 2A muestra los datos para las pruebas de estabilidad de almacenamiento para el Ejemplo 9A y 10 a 12.

Como puede observarse en la Tabla 6 y en la Figura 2, así como en la Fig. 2A, las emulsiones de los Ejemplos Comparativos 1 a 8, 9A y 10 a 12 muestran un aumento significativo del tamaño de partícula promedio durante un tiempo de almacenamiento de 28 días.

Por el contrario, las emulsiones de acuerdo con los ejemplos 1 a 3 de las invenciones son mucho más estables en almacenamiento. Durante un tiempo de almacenamiento de 28 días puede observarse solo un ligero aumento en el

tamaño de partícula promedio de la emulsión (Fig. 1 y Tabla 2).

Prueba con diferente emulsionante

Sorprendentemente, se ha encontrado que las emulsiones de la presente invención pueden estabilizarse aún más mediante la selección del emulsionante.

- 5 El emulsionante Lipid S PC-3 se considera menos adecuado (Fig. 2) y no ha sido probado además para las emulsiones de la invención.

La Tabla 7 muestra emulsiones de la presente invención de acuerdo con los ejemplos 4 y 5.

Tabla 7: Composiciones de emulsión de aceite en agua de acuerdo a los ejemplos 4 y 5

Componente	Ejemplo 4	Ejemplo 5
F6H8 D	8	8
MCT ²⁾	12	12
Lipoide E 80 ³⁾	2	-----
Lipoid S 75 ⁴⁾	-----	2
Oleato de sodio	0,03	0,03
alfa-tocoferol	0,02	0,02
Agua	Ad 100	Ad 100

10

¹⁾ Perfluorhexiloctano ex Novaliq, Alemania

²⁾ Triglicéridos de cadena mediana (50-80% en peso de ácido graso C₈; 20-50% en peso de ácido graso C₁₀)

³⁾ Fosfolípido de huevo ex Lipoid GmbH, Alemania

⁴⁾ Fosfolípido ex Lipoid GmbH, Alemania (fosfolípidos de soja con 14 a 25% en peso de glicolípido)

- 15 Las emulsiones de acuerdo con el ejemplo 4 y el ejemplo 5 se analizan además para determinar si las condiciones de esterilización afectan a la estabilidad de las emulsiones. Las emulsiones se han esterilizado en un autoclave rotatorio y se comparan con emulsiones no esterilizadas (condición de esterilización: calentamiento a 121 °C durante 15 min a 2 bares).

- 20 La Tabla 8 muestra los datos de estabilidad de las emulsiones de acuerdo con el ejemplo 4 y 5 sin esterilización y después de la esterilización.

Tabla 8: Datos de estabilidad de almacenamiento para los ejemplos 4 y 5 de la invención bajo condiciones esterilizadas y no esterilizadas

Ejemplo	Esterilizado/No esterilizado	Almacenamiento tiempo [días]	ZPromedio [nm]	I.P.	pH
4	No esterilizado	0	156,5	0,082	8,13
		7	170,5	0,108	5,84
		14	176,6	0,086	5,68
		28	194,9	0,043	5,00
	esterilizado	0	156,5	0,082	8,13
		7	263,2	0,028	7,15
		14	264,9	0,072	7,12
		28	260,8	0,040	7,07
5	No esterilizado	0	170,6	0,102	8,00
		7	176,9	0,080	6,40
		14	177,7	0,075	5,12
		28	167,0	0,067	4,07
	Esterilizado	0	170,6	0,102	8,00
		7	177,0	0,059	8,09
		14	178,9	0,095	8,00
		28	175,4	0,086	7,93

- 5 La Figura 3 muestra los datos para las pruebas de estabilidad de almacenamiento como se refleja en la Tabla 8. En la parte izquierda de la figura 3 se representan los datos para las emulsiones de acuerdo con el Ejemplo 4 y en la parte derecha de los datos para las emulsiones de acuerdo con el ejemplo 5.

La Figura 3 y la Tabla 8 muestran que la emulsión de acuerdo con el ejemplo 5 es más estable que la emulsión del Ejemplo 4. La emulsión de acuerdo con el ejemplo 5 también es más estable después de que la emulsión se haya esterilizado en un autoclave giratorio.

Además, las emulsiones del ejemplo 4 y 5 se han almacenado durante 168 días a 40 °C. Se ha encontrado sorprendentemente que la emulsión del Ejemplo 5, incluso a una temperatura de almacenamiento de 40 °C no cambió significativamente la estabilidad física (Fig. 4).

La Fig. 4 muestra los resultados de prueba de 3 muestras de la emulsión de acuerdo con el ejemplo 5.

La Fig. 3A muestra los resultados de prueba de 3 muestras de la emulsión de acuerdo con el ejemplo 4.

Ejemplo 6 de la invención:

Tabla 9: Composición de emulsión de acuerdo con el Ejemplo 6

Componente	Ejemplo 6
F6H8	8
MCT	12
Lipoid S 75	2
alfa-tocoferol	0,02
Glicerol	2.5
Oleato de sodio	0.03
NaOH	Ad pH 8,2
Agua	Ad 100

5

La emulsión de acuerdo con el ejemplo 6 se ha preparado mediante la preparación de una mezcla homogénea de F6H8, MCT y alfa-tocoferol a 50 °C. Por separado, una mezcla del emulsionante Lipoid S 75 y el oleato de sodio co-emulsionante junto con el glicerol y el agua se mezclan en un dispositivo de mezcla de rotor/estator (Ultra Turrax) a 50 °C a 15000 rpm durante 20 minutos. Subsiguientemente, la mezcla que comprende MCT, F6H8 y alfa-tocoferol se proporciona a la mezcla acuosa y se homogeneiza a 50 °C con un Ultra Turrax (tipo T 25 ex IKA) a 20000 rpm durante 20 minutos. La pre-emulsión obtenida se homogeneiza adicionalmente subsiguientemente en un homogeneizador de alta presión (APV tipo 1000/2000) [cinco ciclos a 500bares y, subsiguientemente, a 60bares].

10

La emulsión obtenida se esteriliza subsiguientemente a 121 °C durante 15 minutos en un autoclave.

15

Se ha encontrado sorprendentemente que la emulsión del Ejemplo 6 incluso a una temperatura de almacenamiento de 40 °C no cambió significativamente la estabilidad física incluso después de tres meses (Fig. 4A).

La Figura 4A muestra los resultados de prueba de la emulsión de acuerdo con el ejemplo 6.

La composición de emulsión del ejemplo 6 se ha usado para las mediciones de MRI *in vivo*.

Con el fin de comprobar si las emulsiones de F6H8/MCT pueden visualizarse *in vivo* por medio de MRI y detectarse en el tejido diana, se realizaron los primeros exámenes farmacocinéticos.

20

La Figura 5 muestra los efectos de la acumulación de la sangre de una manera ejemplar.

25

La Figura 5 muestra la emulsión 6 de acuerdo de la invención en el corazón como el tejido diana en acumulación de la sangre. Las reconstrucciones en 3D ejemplares de la anatomía T2 TSE y las secuencias 3D ^{19}F de colores se han reconstruido en común en un conjunto de datos a partir de una rata como un conjunto total de datos (A) y con el hígado eliminado mediante computación (B). En la fila de abajo, se muestra el conjunto de datos 3D completo (C) con el corazón como un detalle ampliado (D).

Por lo tanto, puede demostrarse que las emulsiones de acuerdo con la invención pueden visualizarse *in vivo* en el miocardio. Además, se examinó la representación de un infarto en MRI. Los resultados se muestran en la Figura 6 siguiente.

30

La figura 6 muestra: (A) El tórax de rata en sección transversal en la zona miocárdica *in vivo* en una imagen MRI ponderada en T2 (1.5 Tesla, Philips), que se superpone con la imagen ^{19}F coloreada ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$), con la misma geometría 24 h después de la aplicación de la emulsión de acuerdo con el Ejemplo 6. (B) El miocardio como un detalle ampliado de la imagen $^1\text{H}/^{19}\text{F}$, que muestra el enriquecimiento del agente de contraste que contiene flúor en el nivel del infarto de miocardio, y el sitio de adhesión entre el pericardio y las costillas causado por la cirugía. (C) Registro *in situ* del corazón de rata, que muestra una inflamación muy pronunciada del pericardio (línea verde) al lado de la zona infartada.

35

Por lo tanto, puede demostrarse que el agente de contraste se enriquece en el parea infartada. Además, las imágenes de MRI se compararon con las secciones histológicas, que se muestra en la Figura 7.

Figura 7: (A) El tórax de rata en la sección transversal en la zona miocárdica *in vivo* en una imagen de MRI ponderada en T2 (1.5 Tesla, Philips), que se superpone con la imagen ^{19}F coloreada ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$), con la misma geometría 24 h después de la aplicación de la emulsión de acuerdo con el Ejemplo 6. (B) El miocardio como un detalle ampliado de la imagen de $^1\text{H}/^{19}\text{F}$, que muestra el enriquecimiento del agente de contraste que contiene flúor en el nivel del infarto de miocardio, y el sitio de adhesión entre el pericardio y las costillas causado por la cirugía. (C) La tinción de HE de una sección de eje corto histológica ejemplar [7 μm] del miocardio de rata infartada se muestra debajo de A. El área miocárdica infartada se muestra en azul en la tinción de HE.

10 Las emulsiones se han probado en dos modelos:

el modelo de infarto de miocardio, cuya línea temporal se refleja en la figura. 8; y

el modelo de miocarditis, cuya línea temporal se refleja en la figura. 9.

Inducción de infarto

Se han usado como animales ratas SD que tienen un peso de 200 a 350 g.

15 Anestesia: Estos animales se sedan en una caja de anestesia mediante inhalación de isoflurano, y después se anestesian mediante una administración intramuscular. , Debe garantizarse una anestesia que asegure la ausencia de dolor, incluso durante la anestesia. Por lo tanto, los animales reciben una mezcla de anestesia y analgesia con: 0,15 mg/kg de medetomidina + 0,05 mg/kg de fentanilo + 2,0 mg/kg de midazolam i.m.; la antagonización se efectúa con 0,75 mg/kg atipamezol + 0,12 mg/kg de naloxona + 0,2 mg/kg s.c. Debido a nuestras experiencias anteriores con flunixin (2,5 mg/kg s.c.), usamos la misma como preparación para el tratamiento del dolor postoperatorio. Si la terapia fallara, consideramos una modificación de la terapia de analgésico con buprenorfina (0,05 mg/kg s.c.).

Subsiguientemente, el animal recibe una administración de atropina i.m. durante la intubación posterior para apoyar la circulación y para la protección contra irritaciones vagales.

Agentes de contraste a base de flúor en enfermedades cardiovasculares:

25 Aunque el uso de medetomidina es recomendable básicamente solo para animales con un sistema cardiovascular sano, debe esperarse en animales jóvenes sanos (las medidas cardiorácicas previstas se realizaron con animales que tiene un peso corporal de aproximadamente 200 g) que el mecanismo de Frank Starling aún no está completamente maduro. Por lo tanto, la bradicardia mediada por la actividad antisimpaticotónica central de medetomidina puede no compensarse suficientemente mediante un aumento del volumen sistólico. La administración de atropina provoca un aumento del trabajo cardíaco. Sin embargo, la vasoconstricción provocada por la estimulación del receptor α_2 periférico no cambia el flujo de sangre coronaria (así como cerebral y renal) sustancialmente, de modo que no debe asumirse en este caso una carga cardíaca específica, y el efecto cronotrópico de la atropina para la situación general de la circulación debe ser predominante. Por lo tanto, se considera que una condición circulatorio hipertensiva transitoria debe ser bien tolerada, lo que está de acuerdo con las observaciones clínicas en la fase postoperatoria. Adicionalmente, siempre se toma la ligadura coronaria y su posible efecto (agudo) en el rendimiento de bombeo del corazón se toma en cuenta. Sin embargo, debido a la complejidad de la operación manual y la varianza de la anatomía coronaria de los animales de prueba, no puede formularse ninguna ley universal.

40 Los efectos hipertensivos son remitidos inmediatamente después de la antagonización postoperatoria de medetomidina, de modo que la duración de la hipertensión se mantiene dentro de límites razonables y, sobre todo, controlable.

Puesto que los animales están intubados en el contexto de la medida operativa, existen riesgos de irritaciones vagales (con bradicardia consecutiva), por un lado, y de complicada intubación en el caso de hipersalivación, por el otro; este último también es consecuente con nuestras propias experiencias. Estos riesgos pueden reducirse por una administración preoperatoria de atropina.

Con todo, se ha encontrado una indicación para la administración de atropina preoperatoria.

Después de haberse iniciado la etapa de tolerancia, la rata se afeita y se desinfecta en el lado izquierdo.

50 La rata se conecta posteriormente a la bomba de respiración, que se ajusta a una frecuencia de 75-80 golpes por minuto y un volumen tidal a 2.0 ml (para ratas que pesaban 200-250 g). Es recomendable conectar el animal a la bomba de respiración lo más tarde posible antes de que se inicie la toracotomía, debido a que la respiración artificial siempre significa otra intervención en el organismo.

Después de conectar la bomba de respiración, el tórax puede abrirse con unas pinzas curvas en el nivel de la quinta y sexta costillas. Esto debe hacerse con sumo cuidado, ya que el pulmón puede lesionarse muy fácilmente de esta

manera. La cavidad torácica se debe abrir con una longitud de aproximadamente 1,0 cm a 1,5 cm para que se adapte el retractor de herida. Tan pronto como se haya creado una zona de operación lo suficientemente grande, opcionalmente mediante una disección de tejidos blandos correspondiente, debe detectarse el curso de la arteria coronaria sinistral. Se origina desde la aorta entre el tronco pulmonar y el apéndice auricular izquierdo, fácilmente reconocible por una línea de grasa epicárdica. Sin embargo, la arteria coronaria sinistral a menudo no puede ser vista, o solo en parte es así, debido a que los vasos coronarios de ratas no discurren superficialmente, sino dentro del miocardio. La rama principal de la arteria coronaria sinistral, la LAD (descendente anterior izquierda), discurre sustancialmente recta desde la raíz aórtica al ápice del corazón. Una de las ramas laterales proximales (D1 o D2) de la LAD se cierra mediante una ligadura coronaria. La sutura-ligadura de la rama lateral D1 o D2 se efectúa mediante una sutura de un solo nudo. Una oclusión de la LAD (proximal) misma causaría demasiado extendido un escenario de miocardio, a lo que solo rara vez sobreviven los animales. Subsiguientemente, la caja torácica se cierra en dos capas (suturas de costillas y de piel). Las costillas se cierran por dos o tres suturas de un solo nudo. Los músculos del pecho se disponen meramente uno sobre otro. La costura de la piel se cierra con una sutura de guante continua.

3 días después de la ligadura las emulsiones que contienen fluorocarbono se administran a los animales. Después de otras 24 horas se realiza el análisis MRI (ver Fig. 8)

Se proporciona a todos los animales analgesia cada 12 horas durante la totalidad de la duración de prueba de 6 días: flunixin (Finadyne) 2,5 mg/kg de masa corporal s.c.

Los datos generales de desarrollo, tales como el peso y el comportamiento, se toman de todos los animales dos veces a la semana.

Cirugía de infarto:

Estos animales se sedan en una caja de anestesia mediante inhalación de isoflurano, y luego se anestesian mediante la administración intramuscular de una solución mixta Domitor®/Dormicum® (0,3 mg de medetomidina y 4 mg de midazolam por kg de peso corporal). Posteriormente, los animales reciben una administración de atropina (0,01 mg de atropina por kg de masa corporal, s.c.) durante la intubación posterior para apoyar a la circulación y para la protección contra irritaciones vagas.

Exámenes de MRI:

Estos animales reciben exclusivamente una anestesia por inhalación (oxígeno + isoflurano al 2,0%). Este último se tolera bien, y los animales no tienen ninguna fase larga de vigilia después.

Mientras que están bajo la anestesia, se administra a los animales los agentes de contraste a base de flúor a través de la vena de la cola.

Modelo de inflamación del miocardio:

Todos los animales reciben una administración i.v. de doxorubicina o solución salina isotónica una vez a la semana durante un período de 6 semanas consecutivas. Cada administración se efectúa bajo anestesia general. Una semana después de la última administración se administra a los animales la emulsión de la invención. 24 horas más tarde se realiza el análisis de MRI.

La emulsión de acuerdo con el Ejemplo 6 se ha modificado de modo que el emulsionante ha sido reemplazado por un fosfolípido pegilado. Se ha encontrado que la opsonización de las gotas de emulsión se reduce significativamente. Debido a este efecto se esperaba que la cantidad del compuesto de fluorocarbono (F6H8) en la zona de la inflamación estuviera por debajo del límite de detección. Sin embargo, se ha encontrado sorprendentemente que la miocarditis podría incluso visualizarse en imágenes que se muestran en la Fig. 11.

En los días de examen en el MRI, los animales reciben anestesia por inhalación (mezcla de isoflurano y de oxígeno 1,5%-2,5%). Además, a los animales se les administra una dosis de los compuestos de agente de contraste a base de flúor a través de la vena de la cola durante el examen dependiendo del grupo al que pertenecen. Después del último examen de MRI, el animal respectivo se sacrifica proporcionándole una sobredosis de isoflurano y los órganos se retiran subsiguientemente.

Todos los animales reciben adicionalmente analgesia. Para este propósito se usa paracetamol AL, debido a que tiene solo un pequeño efecto antiinflamatorio. Los animales reciben el paracetamol a través del agua de bebida a una dosis de 150 mg/kg de peso corporal durante todo el período experimental.

Los datos generales de desarrollo, como peso y comportamiento, se adquieren *diariamente* de todos los animales.

Inducción de miocarditis:

Los animales reciben exclusivamente una anestesia por inhalación (oxígeno + isoflurano al 2,0% + gas de la risa). Este último se tolera bien y no causa una fase de vigilia prolongada. Con el inicio de la anestesia, los animales reciben la analgesia correspondiente.

Exámenes de MRI:

Los animales reciben exclusivamente anestesia por inhalación (oxígeno + isoflurano al 2,0%). Este último se tolera bien y no produce a una fase de vigilia prolongada. Mientras que están bajo anestesia, se administra a los animales un agente de contraste a base de flúor a través de la vena de la cola.

- 5 Los resultados de MR de un infarto de un animal tratado con la composición del Ejemplo 6 se reflejan en la Fig. 10 y de una miocarditis en la que el animal se trata con una emulsión tal como se describe en el Ejemplo 6 con la excepción de que el emulsionante se ha sustituido por un fosfolípido pegilado se reflejan en la Fig. 11.

REIVINDICACIONES

1. Emulsión acuosa que comprende
 - a) un compuesto semifluorado de fórmula I:
$$\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_x-(\text{CH}_2)_y-\text{CH}_3 \text{ (I)}$$
- 5 en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero de 2 a 10.
 - b) un triglicérido que es miscible con el compuesto semifluorado a 20 °C; y
 - c) un emulsionante.
- 10 2. Emulsión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto semifluorado es perfluorohexiloctano (F6H8) y/o perfluorobutilpentano (F4H5).
- 15 3. Emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que la cantidad del compuesto de carbono semifluorado a) y el triglicérido b), que es preferible un triglicérido de cadena media, varía del 5 al 40% en peso, preferentemente del 10 al 30% en peso, particularmente del 15 al 25% en peso, en base al peso total de la emulsión.
4. Emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación en peso del compuesto de carbono semifluorado a) al triglicérido b), que es preferentemente un triglicérido de cadena media (MCT), varía de 1:20 a 1:0,20, preferentemente de 1:15 a 1:0,25, más preferentemente de 1:10 a 1:0,30, aún más preferentemente de 1:4 a 1:0,35, particularmente de 1:2 a 1:0,4.
5. Emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores para su uso como un agente de contraste o agente mejorador de contraste.
- 20 6. Emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores para su uso como un agente mejorador de contraste o agente de contraste para la detección de diagnóstico, por medio de un proceso de imagenología que usa técnicas de MR.
- 25 7. Emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la detección de diagnóstico, por medio de un proceso de imagenología, de procesos inflamatorios seleccionados del grupo que consiste en reacción inflamatoria periférica a infartos tales como infarto de miocardio, apoplejía; inflamación de órganos, tal como miocarditis, encefalitis, meningitis; esclerosis múltiple; inflamación del aparato gastrointestinal, tal como enfermedad de Crohn; inflamación de los vasos sanguíneos, tal como arteriosclerosis, en particular, placas vulnerables; detección de abscesos y también artritis, en el que el proceso de imagenología se basa en la medición de la resonancia magnética nuclear del isótopo ¹⁹F.
- 30 8. Emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la detección de diagnóstico, basada en procedimientos de imagenología no invasiva del sistema cardiovascular, incluyendo el miocardio, arterias y venas; reacciones inflamatorias que ocurren en procesos patológicos tales como infarto de miocardio, miocarditis, aterosclerosis y trombosis que provocan procesos inflamatorios y degenerativos de la vasculatura encontrados en neurología tales como apoplejía o tumor; pulmología tales como trombosis, inflamación, sarcoidosis; gastroenterología, tales como tumores, enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad de Crohn; y reumatología tales como enfermedades autoinmunitarias de los vasos sanguíneos tales como arteritis de Takayasu.
- 35 9. Uso de la emulsión de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 en un proceso de imagenología por resonancia magnética.
- 40 10. Procedimiento para la fabricación de la emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas de:
 - a) preparar una mezcla mezclando
 - un compuesto semifluorado de fórmula I:
$$\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_x-(\text{CH}_2)_y-\text{CH}_3 \text{ (I)}$$
- 45 en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero de 2 a 10,
 - un triglicérido que es miscible con el compuesto semifluorado a 20 °C,
 - un emulsionante; y
 - agua

- b) homogeneizar la mezcla obtenida en la etapa a); y
- c) esterilizar opcionalmente la emulsión.

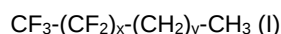
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende las siguientes etapas:

a) preparar una mezcla del modo siguiente

- 5 a-1) preparar una mezcla que comprende agua y un emulsionante,
- a-2) preparar una mezcla homogénea que comprende el compuesto semifluorado y el triglicérido,
- a-3) combinar la mezcla obtenida en la etapa a-1) con la mezcla obtenida en la etapa a-2); y

b) homogeneizar la mezcla obtenida en la etapa a), preferentemente homogeneizar la mezcla obtenida en la etapa a) con un homogeneizador de alta presión.

10 12. Procedimiento para operar un tomógrafo de resonancia magnética para la detección de un compuesto semifluorado de fórmula I:



en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero de 2 a 10,

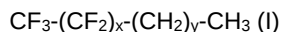
15 en una emulsión tal como se define en una o más de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el procedimiento las etapas de procedimiento:

- emitir un campo magnético alterno,
- detectar la absorción del campo magnético emitido por la muestra que se va a examinar,

caracterizado por que

20 la frecuencia del campo magnético alterno está entre $H \cdot 40,05650 \text{ MHz/T}$ y $H \cdot 40,06150 \text{ MHz/T}$, siendo H la intensidad de campo magnético en Tesla.

13. Procedimiento para detectar en una muestra que se va a examinar un compuesto semifluorado de fórmula I:



en la que x es un número entero que varía de 1 a 8 e y es un número entero que varía de 2 a 10 en una emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8,

25 comprendiendo el procedimiento las etapas de procedimiento siguientes:

- emitir un campo magnético alterno,
- detectar la absorción del campo magnético emitido por la muestra que se va a examinar,

caracterizado por las siguientes etapas de procedimiento:

- superponer al menos una imagen de protón de flúor ^{19}F sobre una imagen de protón ^1H ,

30 por lo que la imagen de los protones de ^1H se visualiza como una imagen de escala en grises y la imagen de los protones de flúor ^{19}F se muestran usando un gradiente de color, indicando un extremo de este gradiente de color una baja concentración de ^{19}F e indicando el otro extremo de este gradiente de color una alta concentración de ^{19}F .

14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por las siguientes etapas de procedimiento:

35 - eliminar señales de alteración generadas por los protones de flúor ^{19}F en una segunda muestra que no se va a examinar mediante las siguientes etapas de procedimiento:

- comparar el valor de la concentración de flúor en un primer píxel con valores de todos los píxeles en el espacio tridimensional alrededor de este primer píxel,

40 por lo que, si la diferencia entre los valores de la concentración de flúor de dos píxeles adyacentes se encuentra por debajo de un umbral se considera que estos dos píxeles pertenecen a un conjunto de píxeles,

- eliminar este grupo alterador de píxeles de la imagen obtenida, si el conjunto no representa la muestra que se va a examinar.

15. Procedimiento que comprende adquirir procedimientos de imagenología no invasiva de un paciente al que se ha administrado la emulsión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8 previamente con el fin de disolverla en el torrente sanguíneo del paciente.

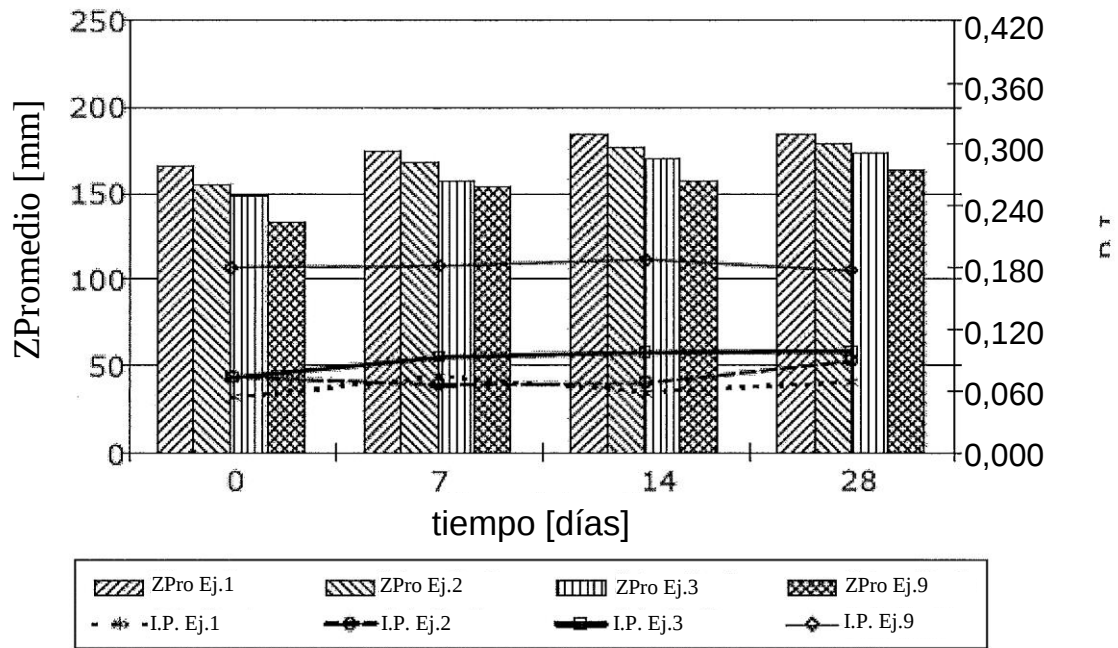


Fig.1

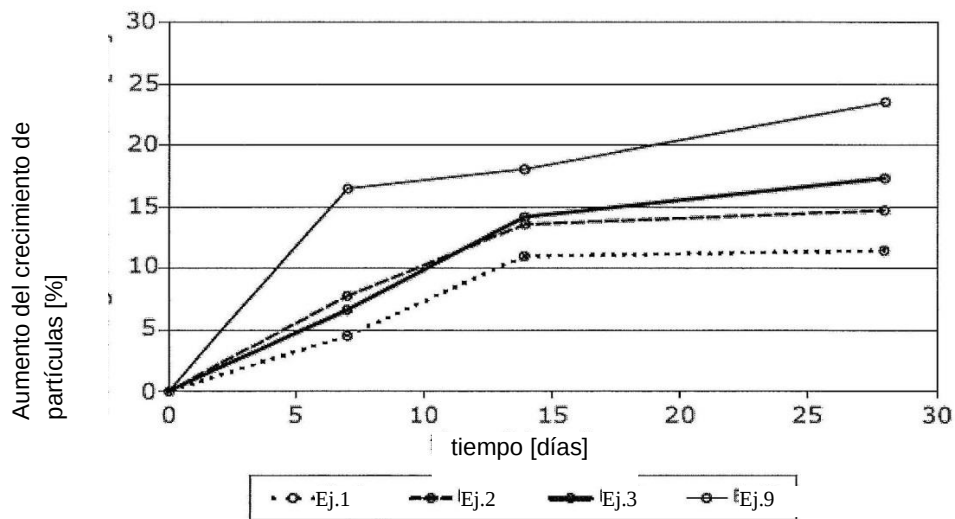


Fig.1A

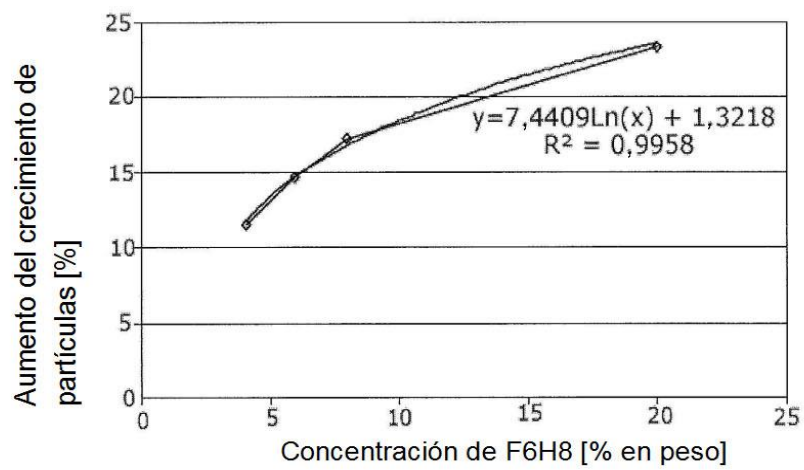


Fig.1B

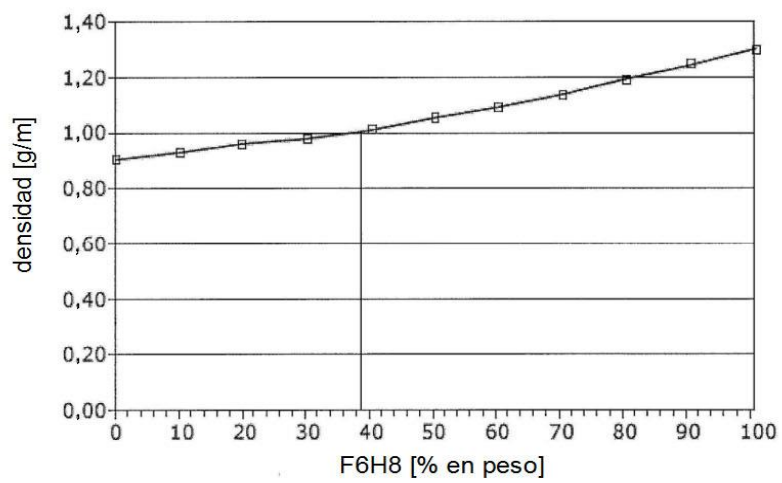


Fig.1C

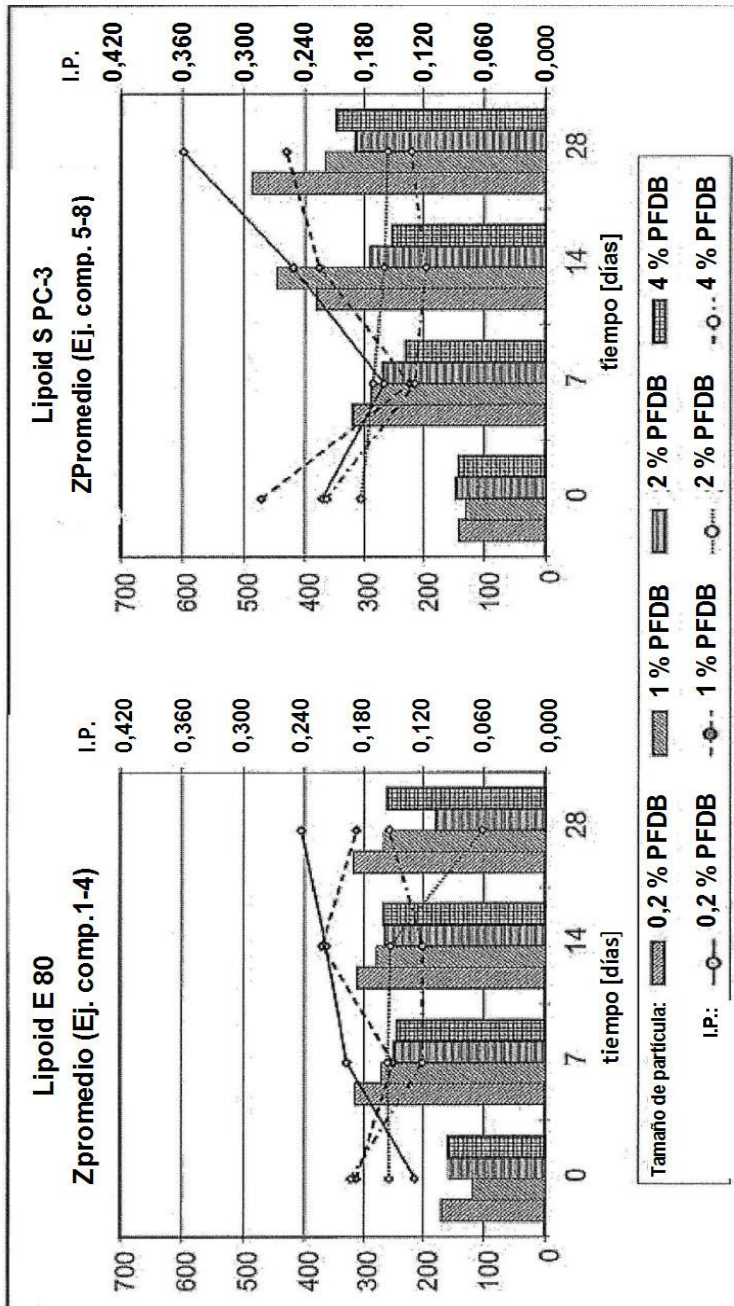


Fig.2

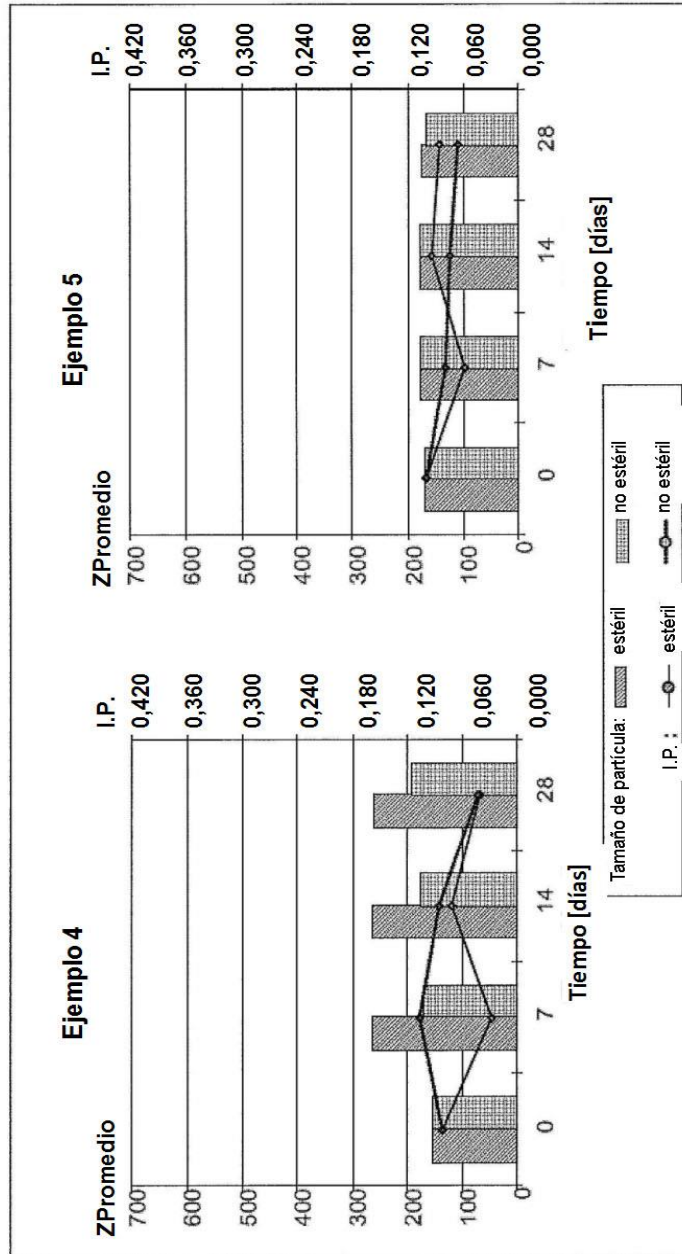


Fig.3

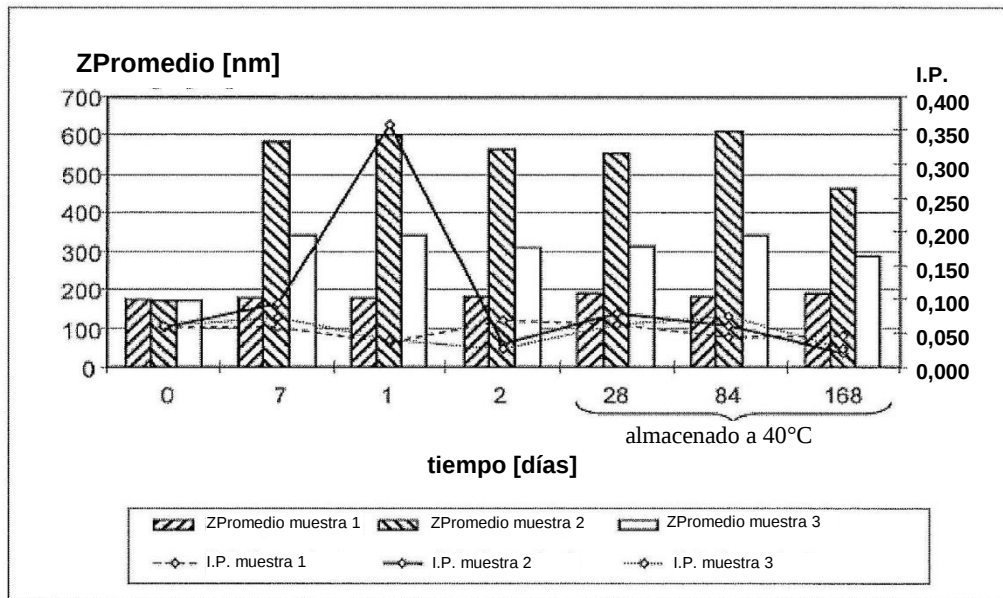


Fig.3A

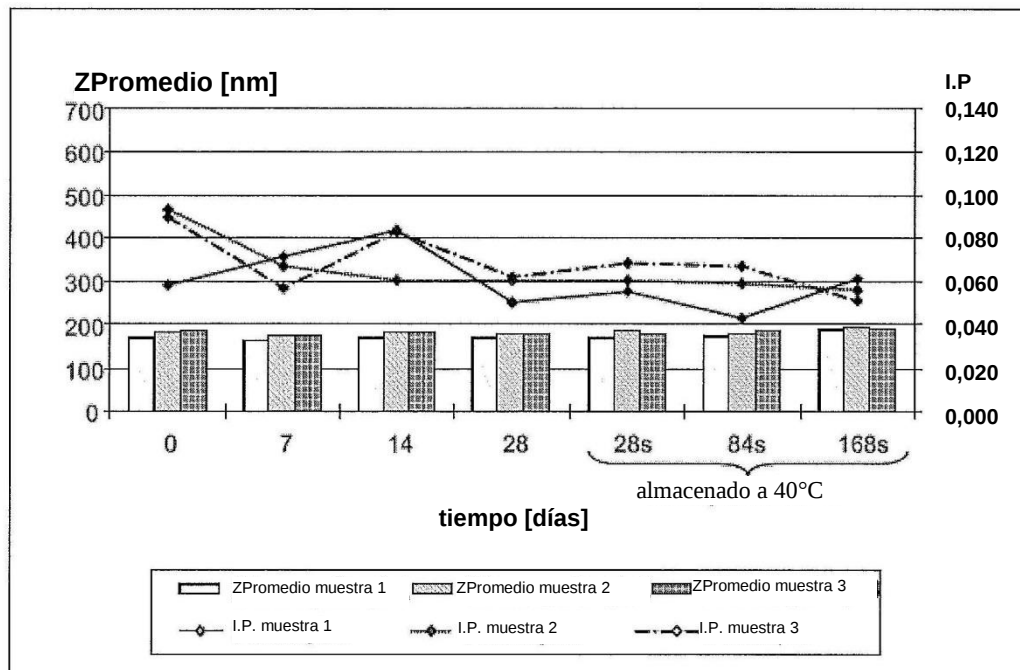


Fig.4

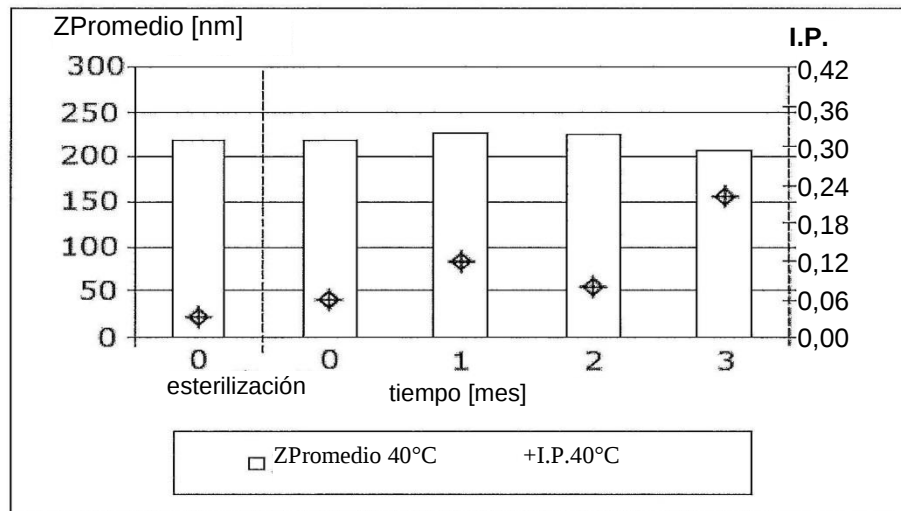


Fig.4A

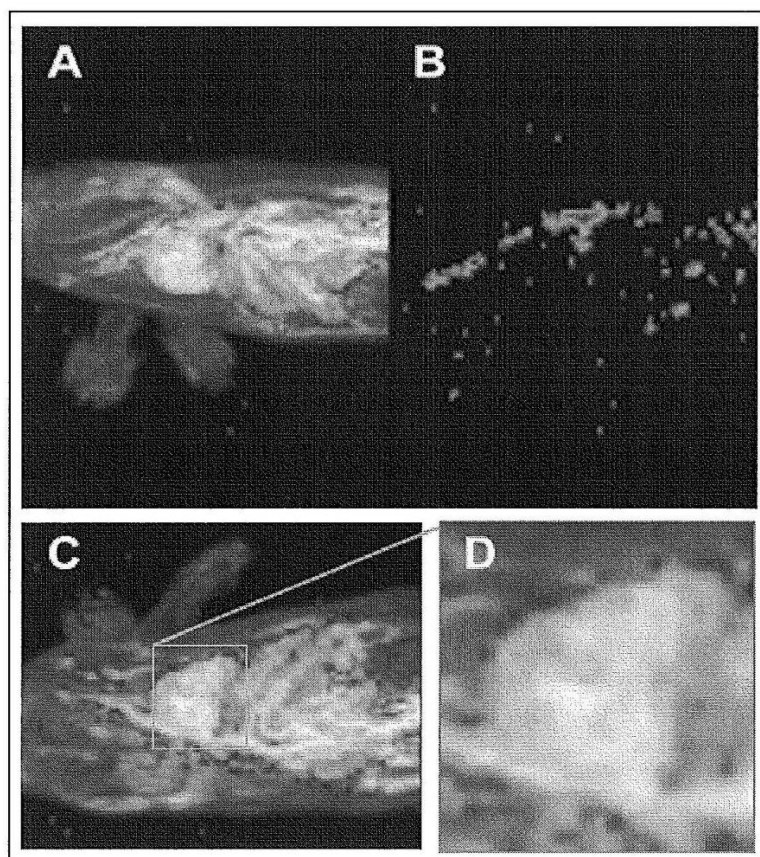


Fig.5

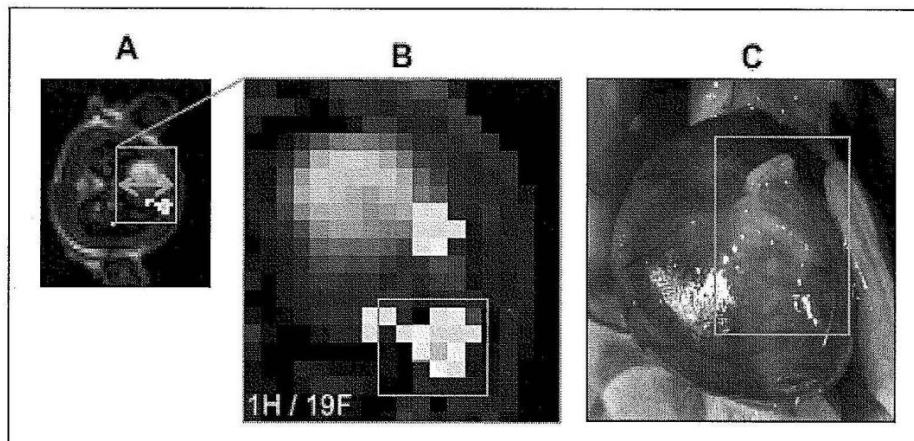


Fig.6

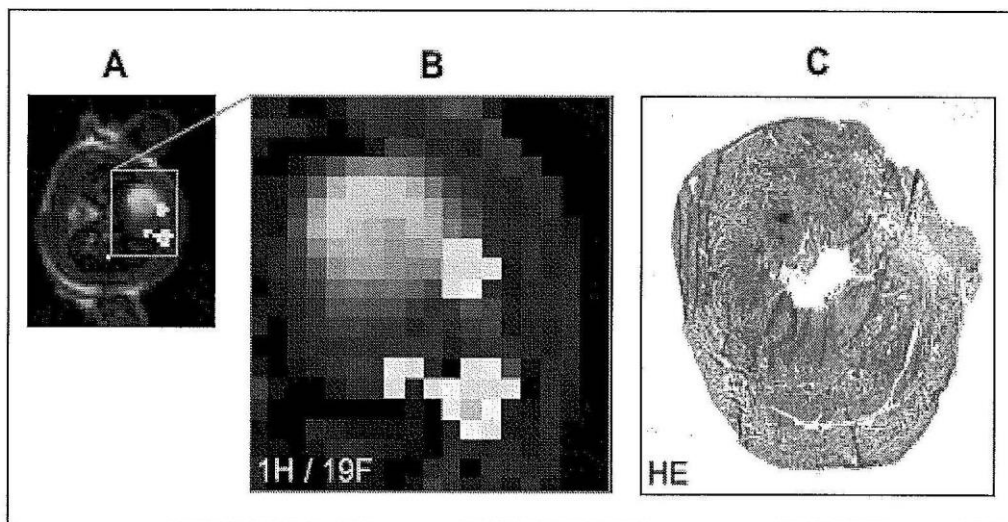


Fig.7

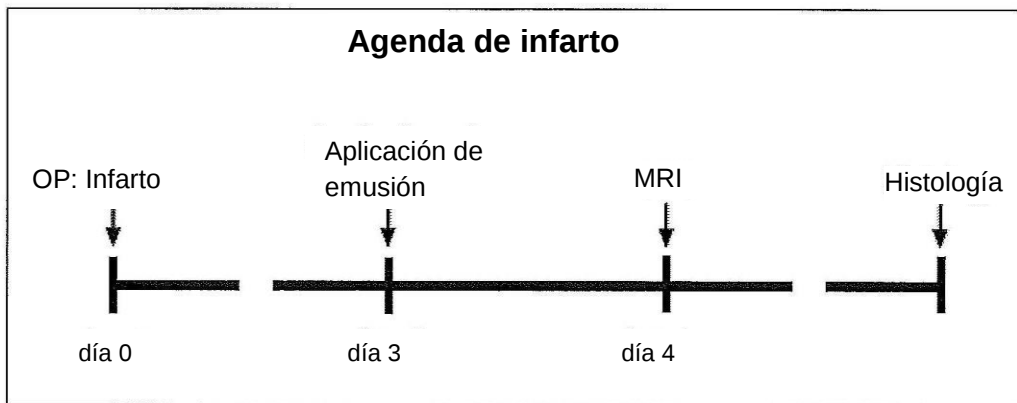


Fig.8

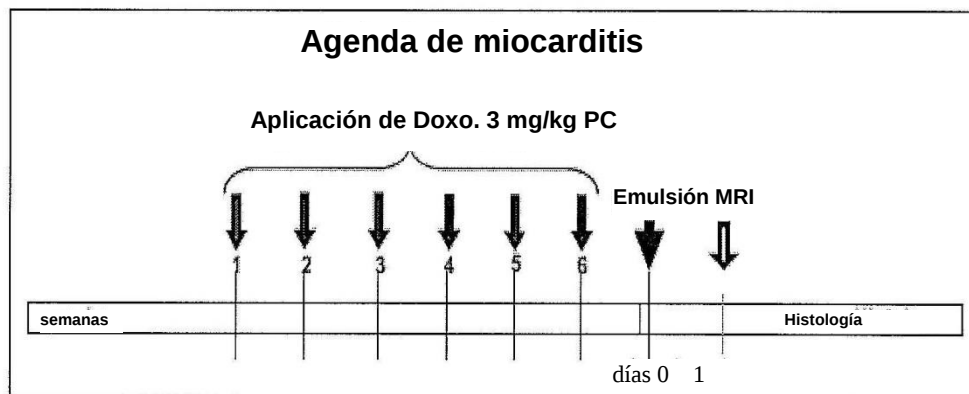


Fig.9

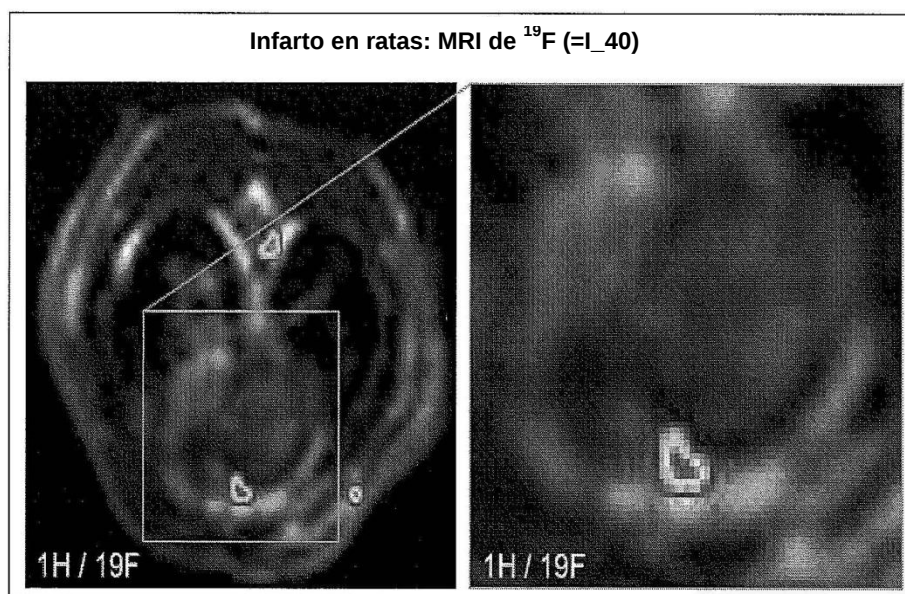


Fig.10

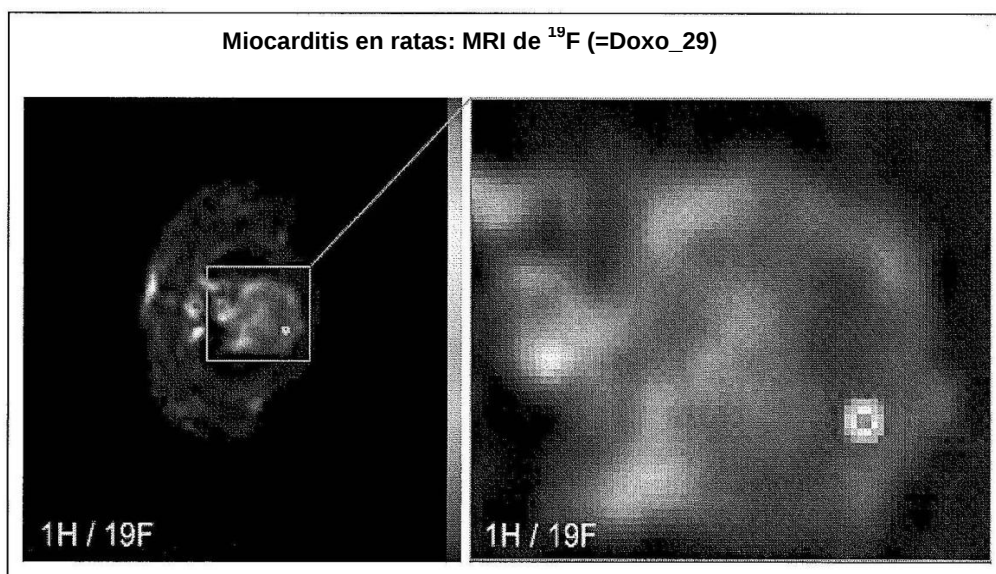


Fig.11