

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 993**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2011 PCT/EP2011/073448**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12084981**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11802928 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2654802**

54 Título: **Nanoemulsión de quelato para RM**

30 Prioridad:

**20.12.2010 FR 1060847**

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

**15.02.2018**

73 Titular/es:

**GUERBET (50.0%)  
15 Rue des Vanesses  
93420 Villepinte, FR y  
UNIVERSITÉ DE BORDEAUX 1 (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PORT, MARC;  
ROBIC, CAROLINE;  
LEAL CALDERON, FERNANDO y  
CHADEL, SAMY**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 654 993 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nanoemulsión de quelato para RM

- 5 La invención concierne a nuevos sistemas optimizados de tipo nanoemulsiones y a su utilización como agentes de contraste, particularmente en RM

10 En el ámbito de las imágenes diagnósticas, un gran número de investigaciones se han centrado en los nanosistemas lipídicos de tipo emulsión. Típicamente, las emulsiones utilizadas están en forma de vesículas preparadas con la ayuda de constituyentes lipídicos (aceite en particular) y de tensioactivos que sirven de interfase entre la fase acuosa y el núcleo lipídico de la nanopartícula. Las emulsiones lipídicas de aceite en agua que incorporan una fase oleosa forman gotitas lipídicas dispersadas en una solución acuosa.

15 Una primera categoría de emulsiones, descrita particularmente en el documento WO 03/062198 o en el documento US 6 676 963, es la de las nanoemulsiones fluoradas, que comprende, integrados en el interior de las vesículas lipídicas, compuestos fluorados. El núcleo está formado por un aceite fluorado, y rodeado por una capa de tensioactivo (lecitina, por ejemplo). Estas emulsiones fluoradas pueden comprender además un número muy elevado de complejos de metales paramagnéticos, en particular de lantánidos. Así, se conocen emulsiones fluoradas para RM que incorporan quelatos capaces de complejar lantánidos, en particular el gadolinio. Los quelatos utilizados son particularmente los derivados de DTPA, de DOTA, de DO3A, de HPDO3A y otros quelatos ampliamente descritos en la técnica anterior. Estos quelatos hidrófilos se hacen anfífilos al inyectarles una zona lipófila tal como un fosfolípido, lo que permite su integración en la capa lipídica que forma el tensioactivo de la composición. Hay varios miles (entre 5000 y 100.000 aproximadamente) de estos complejos integrados en la membrana lipídica de estas vesículas, lo que permite la obtención de una relaxividad (señal de RM) elevada para una detección de la zona fisiológica estudiada. La parte hidrófila (la parte hidrófila que representa el quelato al que se ha unido un grupo lipófilo de forma que el quelato se vuelva anfífilico) está localizada en la superficie externa de las nanogotitas, en contacto con la fase acuosa de la solución de nanogotitas.

30 Además, con el fin de obtener una señal específica de las zonas patológicas, por ejemplo, asociadas con una sobreexpresión de un marcador de estas zonas (receptores, por ejemplo), se inyectan moléculas de identificación (o biovectores, péptidos, por ejemplo, que tengan una afinidad por el receptor) en las nanogotitas de estas emulsiones fluoradas.

35 Sin embargo, a pesar de los prometedores avances, estos agentes de contraste fluorados y vectorizados descritos todavía no han demostrado totalmente su eficacia clínica, y necesitan una pericia de fabricación a escala industrial muy específica para la utilización de compuestos fluorados, en particular para la incorporación de los biovectores.

40 Una segunda categoría de emulsiones es la de las nanoemulsiones para las imágenes de fluorescencia, que no comprende típicamente compuestos fluorados, y que utiliza nanocristales de óxidos metálicos. El documento WO 2010/018222 describe estas nanoemulsiones que comprenden:

- una solución acuosa
- una fase lipídica dispersada (aceite) que forma nanogotitas lipídicas en la solución acuosa, incorporando las nanogotitas los nanocristales típicamente de óxidos metálicos que tienen
- 45 - un tensioactivo (fosfolípidos, por ejemplo) para estabilizar las nanogotitas.

50 Los aceites sugeridos por el documento WO 2010/018222 (denominados lípidos de solubilización en este documento) son aceites saturados o aceites insaturados (soja, lino, palma, girasol...). Un aceite saturado preferido presentado con detalle es Suppocire® (Gattefosse), un aceite saturado que comprende una cantidad muy baja de glicéridos C8-C10 (menos del 2 %). Este aceite sólido a la temperatura ambiente, fluido a la temperatura corporal, está autorizado en el hombre, pero no puede ser utilizado para formar una composición de un producto de contraste inyectable para una administración intravenosa (que debe ser fluido a la temperatura ambiente). El contenido en fase lipídica dispersada de estas emulsiones es muy variable, indicado como comprendido entre el 20 y el 40 %. Los ejemplos indican una cantidad elevada de tensioactivos (del orden del 20 % en peso de la composición). Se menciona la posible adición, además de los nanocristales, y no en su lugar, de quelatos de lantánidos. Estas emulsiones comprenden necesariamente además un co-tensioactivo (myrj® particularmente) destinado a mejorar el control del tamaño y de la estabilidad fisicoquímica con el tiempo (al menos 6 meses) de las nanoemulsiones. En efecto, sin este co-tensioactivo, las propiedades no son satisfactorias, como explican con detalle los autores de este documento.

60 Una tercera categoría de emulsiones es la de las nanoemulsiones esencialmente terapéuticas (encapsulación de medicamentos), sin un núcleo fluorado, y de las cuales se describen algunas variantes como utilizables para la RM. El documento US 2007/0148194 describe que dichas emulsiones pueden incorporar quelatos de lantánidos, en particular de gadolinio. Estas emulsiones de aceite/agua comprenden:

65

- una solución acuosa
- una fase lipídica dispersada (aceite) que forma las nanogotitas lipídicas en la solución acuosa
- tensioactivos (fosfolípidos, por ejemplo) para estabilizar las nanogotitas.

5 Este documento describe específicamente la utilización de un aceite rico en ácidos omega 3 y 6 particularmente (ácido linoleico en particular). Los aceites utilizados son aceites insaturados ricos en ácidos grasos de cadena larga (ácidos C18). El índice de ácidos grasos de cadena corta (C8 y C10 particularmente) es muy bajo. El contenido en fase lipídica dispersada de estas emulsiones es muy variable, se indica como comprendido entre el 5 y el 40 %, y el intervalo posible de tensioactivos es muy amplio (del 0.5 al 15 % en peso de la composición).

10 Este documento, así como su procedimiento de examen accesible al público, insiste en la importancia de utilizar estos aceites insaturados que tengan una concentración de al menos un 20 % en ácidos grasos poliinsaturados omega 3, para obtener el efecto biológico buscado, y más exactamente el paso de las barreras biológicas de los órganos sin ningún efecto tóxico para los órganos o los tejidos.

15 Sin embargo, estas composiciones que utilizan aceites poliinsaturados presentan varios problemas técnicos:

- los aceites poliinsaturados omega 3 y/o omega 6 no están bien adaptados para las formulaciones farmacéuticas inyectables de agentes de contraste
- 20 - los aceites insaturados son sensibles a la oxidación, por lo que por un lado hay un problema de estabilidad de la emulsión con el tiempo, particularmente para una conservación de varios meses (típicamente durante 3 años para los agentes de contraste inyectables), y por otro lado hay un riesgo (relacionado con la presencia de oxígeno) de una alteración en el comportamiento paramagnético del producto para los exámenes de imágenes médicas por RM

25 Además, una cantidad de tensioactivo de al menos aproximadamente un 3 % de la composición en peso, y particularmente del orden de entre el 3 % y el 5 %, se traduce en:

- la formación en la composición, además de las nanogotitas, de micelas (nanopartículas desprovistas de un núcleo oleoso) cuya retirada necesitaría, para una producción a escala industrial de centenas de toneladas de producto de contraste, unas etapas de separación y de purificación complejas y costosas, y por lo tanto una caída en el rendimiento industrial
- un riesgo de una cantidad muy elevada de quelatos de lantánidos administrada al paciente, con los riesgos de tolerancia debidos a los lantánidos libres en solución que el experto en la materia quiere evitar absolutamente
- 35 - la dificultad, incluso la imposibilidad, de incorporar en las nanopartículas una cantidad apropiada de quelatos y de biovectores de identificación biológica, cuyo coste es muy elevado: los tensioactivos lípidos anfífilicos tienen un poder tensioactivo más fuerte que los biovectores anfífilicos y preferiblemente formarán la capa alrededor del aceite (y/o la capa de lípidos anfífilicos tensioactivos se forma a partir de estos lípidos incluso antes de que los biovectores tengan tiempo de integrarse en el seno de esta capa).

40 Incluso de una forma aún más precisa:

- cuando se alcanza la cantidad total de tensioactivos (tensioactivo tipo lipídico o un análogo, quelato anfífilico, biovector anfífilico) que forman las nanogotitas, los compuestos anfífilicos de la solución comienzan a formar rápidamente micelas, y la solución contiene por lo tanto muchas más micelas que nanogotitas
- 45 - el precio de coste industrial de las nanoemulsiones está representado aproximadamente al menos del 80 al 90 % por el biovector que se ha hecho anfífilico, por lo tanto se comprende que una pérdida de biovectores genere unos sobrecostes industriales demasiado importantes
- si la cantidad de lípidos anfífilicos tensioactivos (compuestos no vectorizados) es muy importante, los biovectores anfífilicos no pueden integrarse de una forma satisfactoria en la capa anfífilica alrededor del aceite, lo que genera una pérdida de afinidad muy importante y hace que el producto sea inapropiado para una identificación específica del territorio patológico.

55 Asimismo, este documento US 2007/0148194 describe la utilización de moléculas farmacéuticas utilizadas como medicamento de tratamiento terapéutico, y no como agente de vectorización de la nanoemulsión para la obtención molecular de imágenes específicas. Este documento anterior distingue por un lado el medicamento terapéutico (paclitaxel, por ejemplo) y el agente de contraste (quelato de lantánido). Según la comprensión precisa del solicitante de este documento en vista del estado de la técnica, dichas nanoemulsiones no alcanzan el territorio biológico objetivo con la ayuda de biovectores de identificación. Estas nanoemulsiones anteriores llegan de una forma no específica, hasta la zona tumoral, típicamente mediante un mecanismo de difusión denominado EPR y conocido por el experto en la materia (descrito, por ejemplo, en H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review, J. Control. Release, 65 (2000) 271-284): los nanosistemas que encapsulan los medicamentos llegan por difusión sanguínea hasta las zonas tumorales que están muy vascularizadas. El documento WO 95/33494 describe nanoemulsiones para RM que comprenden una fase acuosa, una fase lipídica que comprende un aceite tal con el aceite de cártamo, y un tensioactivo que comprende un quelato de un metal paramagnético anfífilico y un lípido anfífilico tal como la lecitina.

Los nanoemulsiones del demandante son muy ventajosamente biovectorizadas ya que están destinadas, por el contrario, a la obtención molecular de imágenes diagnósticas: las nanogotitas de la nanoemulsión presentan, incorporadas en la capa formada por los tensioactivos, uno o varios biovectores o ligandos de identificación específicos que reconocen específicamente mediante una interacción molecular (afinidad objetivo/ligando) el objetivo biológico (receptor, enzima,...) cuya expresión está modificada en la zona patológica. Estos ligandos de identificación son conocidos igualmente como farmacóforos o ligandos de reconocimiento por el experto en la materia.

No obstante, un problema técnico muy difícil de resolver es precisamente la incorporación de una forma apropiada y estable en el tiempo de uno o varios biovectores de identificación para la obtención molecular de imágenes, en una cantidad suficiente para obtener una especificidad de marcaje, pero no demasiado elevada para evitar unos precios de coste industriales demasiado elevados.

En vista de esta compleja técnica anterior, somos conscientes de la dificultad de obtener nanoemulsiones vectorizadas para RM, a la vez químicamente industrializables y estables, y biológicamente eficaces. Un consistente razonamiento a partir particularmente del documento US 2007/0148194 que expresa que es suficiente con modificar el contenido en tensioactivos sería un razonamiento *a posteriori* una vez identificada la invención, presentándose de hecho numerosas posibilidades al experto en la materia para la mejora de la técnica anterior.

El solicitante ha conseguido obtener nanoemulsiones de lantánidos, en forma de nanogotitas vectorizadas y que resuelven los problemas técnicos de la técnica anterior. En particular, el solicitante ha conseguido seleccionar unas composiciones optimizadas que comprenden suficiente tensioactivo para estabilizar el tamaño de las nanopartículas, pero no demasiado para evitar la insuficiente incorporación de los biovectores. En las emulsiones esencialmente terapéuticas de la técnica anterior, el compuesto terapéutico está esencialmente encapsulado en el interior de la nanogotita, a menudo en una mezcla con los glicéridos del aceite. En las nanoemulsiones del solicitante, el ligando de reconocimiento debe poder alojarse en el seno de la interfase aceite/agua, anclándose en la membrana/película anfífilica de los tensioactivos. No era en absoluto evidente para el experto en la materia encontrar los compuestos adecuados y las proporciones adecuadas entre las cantidades de los tensioactivos, el aceite, y los biovectores, que permitan la obtención de unas nanoemulsiones eficaces en la obtención molecular de imágenes y sin una pérdida de biovectores muy costosa.

A este efecto, la invención concierne según un primer aspecto a una composición de una nanoemulsión de aceite en agua para RM, que comprende:

- una fase acuosa, que representa del 70 al 90 % en peso de la composición, ventajosamente del 75 al 85 %, más ventajosamente del 78 al 82 %
- una fase lipídica que comprende un aceite, que representa del 9.5 al 29.5 % en peso de la composición, ventajosamente del 14 al 25 %, más ventajosamente del 17 al 21 %,
- un tensioactivo en la interfase entre las fases acuosa y lipídica, comprendiendo el tensioactivo al menos un quelato de un metal paramagnético anfífilico, al menos un ligando de identificación anfífilico y eventualmente un lípido anfífilico;
  - estando comprendido el contenido total en tensioactivo en peso con respecto al aceite entre el 4 y el 10 %, ventajosamente entre el 5 y el 8 %;
  - estando comprendido el contenido total en tensioactivo en peso con respecto a la composición entre el 0.35 y el 2.95 %, ventajosamente entre el 0.5 y el 2 %;
  - comprendiendo el aceite al menos el 70 %, ventajosamente al menos el 80 %, de forma ventajosa al menos el 95 % en peso, particularmente al menos el 97 %, de ácidos grasos saturados C6-C18, ventajosamente C6-C14, más ventajosamente C6-C10.

Muy ventajosamente, la fase lipídica está constituida por el aceite. El tensioactivo comprende al menos un biovector anfífilico de identificación, igualmente denominado farmacóforo o ligando de identificación anfífilico.

La nanoemulsión no comprende nanocristales metálicos. Los ácidos grasos saturados se encuentran ventajosamente en forma de triglicéridos de ácidos grasos saturados. El aceite comprende al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 80, el 90, el 95, el 97 % de ácidos grasos saturados C6-C10.

El experto en la materia comprende que el tensioactivo de la interfase está representado por el conjunto de los tensioactivos utilizados, es decir, como se ha explicado con detalle en la solicitud: los lípidos anfífilicos presentes o no según las realizaciones, las moléculas de quelatos anfífilicos, los biovectores anfífilicos, y dado el caso, otros compuestos tales como derivados pegilados (lípidos acoplados a PEG). Debido a su estructura anfífilica, las moléculas de biovectores anfífilicos juegan un papel de tensioactivo, habiéndose precisado que su cantidad es baja con respecto a los otros compuestos anfífilicos utilizados.

Se ha precisado que, teniendo en cuenta particularmente el volumen inyectable a los pacientes, del orden de entre 10 y 50 ml, el aceite se utiliza en una cantidad suficientemente elevada, de al menos el 9.5 %, con el fin de obtener

una solución lo suficientemente concentrada y una señal de RM suficiente. Es necesario tener una concentración adaptada a la duración de la inyección, el momento de adquisición de la señal y el tratamiento asociado de los datos por parte del profesional clínico. Una solución demasiado diluida sería inutilizable para los análisis de imágenes médicas. La concentración de la emulsión de la composición diagnóstica inyectada al paciente está comprendida ventajosamente entre 0.1 y 20 ml/kg de peso corporal. Para un volumen de agente de contraste inyectado del orden de entre 5 y 50 ml, la concentración del agente de contraste es del orden de entre 0.1 y 20 ml/kg de peso corporal, particularmente de entre 1 y 10 y típicamente de 5 ml/kg de peso corporal. La cantidad de quelato de lantánido es del orden de entre 1 y 100  $\mu\text{Mol}$  de Gd/kg, particularmente de entre 1 y 10  $\mu\text{Mol}$  de Gd/kg, lo que permite la obtención de una buena calidad de la señal de RM

Los productos (nanoemulsiones) vectorizados del solicitante tienen un tamaño de partícula lo suficientemente pequeño como para permitir su circulación en los medios biológicos sin la degradación del producto, hasta el objetivo del ligando del biovector fijado en las gotitas. El tamaño es típicamente de entre 30 y 300 nm, ventajosamente de entre 50 y 250 nm, particularmente de entre 100 y 200 nm, en particular de entre 150 y 200 nm.

Los nanogotitas comprenden cada una un número de biovectores del orden de entre 100 y 5000, particularmente de entre 500 y 3000, particularmente de entre 1800 y 2500 (por ejemplo, 2000), lo que permite una identificación eficaz según la afinidad y la multivalencia del biovector. Los resultados biológicos obtenidos gracias a las nuevas nanoemulsiones del solicitante muestran además que los biovectores se reparten ventajosamente en el conjunto de la superficie externa de las nanogotitas, lo que se traduce en una multivalencia optimizada de los biovectores.

Los biovectores anfífilicos representan ventajosamente entre el 0.01 y el 10 % en peso del total de los tensioactivos, ventajosamente entre el 0.05 y el 5 %, particularmente entre el 0.05 y el 1 %. El producto de contraste inyectado que tiene las composiciones de nanoemulsiones descritas tiene una afinidad ventajosamente del orden de entre 0.1 y 100 nM, particularmente de entre 1 y 50 nM, ventajosamente de entre 1 y 10 nM (la afinidad por el biovector anfífilico, de aproximadamente entre 0.1 y 100  $\mu\text{M}$ , es multiplicada por el número de biovectores por nanopartícula).

Ventajosamente, la composición comprende entre el 0.001 y el 0.1 % en peso del biovector anfífilico, particularmente entre el 0.01 y el 0,1 %.

Las nanoemulsiones del solicitante tienen además la ventaja de poder controlar el tipo y la cantidad de biovectores, y particularmente de poder incorporar diferentes biovectores. Por ejemplo, una nanogotita comprenderá:

- un biovector anfífilico que permite el acceso a una zona fisiológica patológica, por ejemplo, un biovector de paso a través de la BHE (barrera hematoencefálica)
- otro biovector anfífilico de identificación que permite a continuación la identificación de un marcador biológico objetivo sobreexpresado por ciertas células de esta zona patológica

Las interacciones moleculares entre el biovector de identificación y el marcador biológico objetivo permiten la captación de las nanogotitas en la zona patológica, y la obtención de imágenes de RM, que como resultado permite localizar de forma precisa la zona patológica.

Por el término « ácido graso » se entiende que indica ácidos carboxílicos alifáticos que presentan una cadena carbonada de al menos 6 átomos de carbono. Los ácidos grasos naturales poseen una cadena carbonada de entre 4 y 28 átomos de carbono (generalmente un número par). Se habla de « ácido graso de cadena larga » para una longitud de entre 14 y 22 carbonos, y de cadena muy larga si hay más de 22 carbonos. Por el contrario, se habla de « ácido graso de cadena corta » para una longitud de entre 6 y 10 carbonos, en particular de entre 8 y 10 átomos de carbono. El experto en la materia conoce la nomenclatura asociada, y en particular se utiliza:

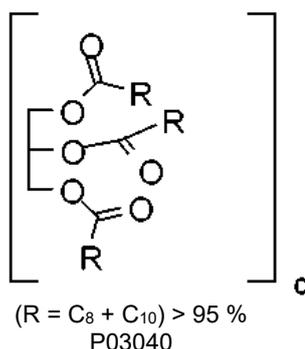
- Cn-Cp para indicar un rango de ácidos grasos de Cn a Cp
- y Cn+Cp, el total de ácidos grasos Cn y de ácidos grasos Cp

Por ejemplo:

- los ácidos grasos de entre 14 y 18 átomos de carbono se escriben « ácidos grasos C14-C18 »
- el total de ácidos grasos C16 y de ácidos grasos C18 se escribe C16+C18

Muy ventajosamente, el aceite comprende menos del 10 %, preferiblemente menos del 5 % de ácidos grasos insaturados, en particular menos del 5 %, y preferiblemente menos del 2 %, menos del 1 % de ácidos grasos insaturados C14-C18 o C14-C22.

Por ejemplo, el aceite es el MIGLYOL®



5 o uno de sus derivados conocidos, por ejemplo, el MIGLYOL® 810 o el MIGLYOL® 812 (triglicérido caprílico/cáprico), el MIGLYOL® 818 (triglicérido caprílico/cáprico/linoleico), el MIGLYOL® 612 (trihexanoato de glicerilo), otros derivados de MIGLYOL® dicaprilato dicaprato de propilenglicol.

Por ejemplo, el Miglyol® 812 tiene la siguiente composición:

10

Ácido caproico (C <sub>6-0</sub> ):	máx 2 %
Ácido caprílico (C <sub>8-0</sub> ):	del 50 al 65 %
Ácido cáprico (C <sub>10-0</sub> ):	del 30 al 45 %
Ácido láurico (C <sub>12-0</sub> ):	máx 2 %
Ácido mirístico (C <sub>14-0</sub> ):	máx 1 %
Ácido linoleico (C <sub>18-2</sub> ):	-

Según algunas variantes, el aceite saturado es una mezcla de aceites saturados que comprende cada uno al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 80, el 90, el 95 % de ácidos grasos saturados de entre 6 y 10 átomos de carbono.

15

Se recuerda que el término tensioactivo hace referencia a los compuestos con una estructura anfifílica que les confiere una afinidad particular por las interfases de tipo aceite/agua y agua/aceite, lo que les da la capacidad de reducir la energía libre de estas interfases y de estabilizar los sistemas dispersos.

20

Preferiblemente, los ácidos grasos saturados de los aceites saturados utilizados por el solicitante se utilizan en forma de mono, di o triglicéridos, preferiblemente de triglicéridos.

De forma preferida, el aceite de las emulsiones del solicitante comprende ácidos grasos saturados en las siguientes variantes:

25

- C6-C18 > 70 %, preferiblemente C6-C18 > 80 % preferiblemente C6-C18 > 95 %, y más preferiblemente C6-C18 > 98 %
- C6-C14 > 70 %, preferiblemente C6-C14 > 80 % preferiblemente C6-C14 > 95 %, y más preferiblemente C6-C14 > 98 %
- 30 - C8+C10 > 70 %, preferiblemente C8+C10 > 80 % preferiblemente C8+C10 > 95 %, y más preferiblemente C8+C10 > 98 %
- C8 comprendido entre el 40 y el 70 % preferiblemente del 50 al 65 % y/o C10 comprendido entre el 20 y el 50 % preferiblemente del 30 al 45 %, siendo el total C8+C10 superior al 80 %.

35

Según las realizaciones preferidas, la nanoemulsión lipídica tiene la composición en peso:

- 1) del 70 al 90 % en peso de fase acuosa, ventajosamente del 75 al 85 %, más ventajosamente del 78 al 82 %
- 2) del 9.5 al 29.5 % en peso de fase lipídica que comprende un aceite, ventajosamente del 14 a 25 %, más ventajosamente del 17 al 21 %;
- 40 3) del 0.38 al 2.95 % de tensioactivo (es decir, del 4 al 10 % de la fase lipídica), comprendiendo el tensioactivo del 50 al 95 % en peso del lípido anfifílico, del 5 al 50 % en peso del quelato del metal paramagnético anfifílico, ventajosamente del 5 al 30 % en peso del quelato del metal paramagnético anfifílico, y del 0.05 al 7 %, preferiblemente del 0.05 al 5 % en peso, del biovector anfifílico de identificación.

45

Ventajosamente, el quelato anfifílico es un quelato macrocíclico elegido entre: DOTA, DO3A, HPDO3, BTDO3A, PCTA y cualquier derivado conocido de estos quelatos, descrito, particularmente, por ejemplo, en Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2003, vol. 3, nº 8.

Según algunas realizaciones preferidas, la nanoemulsión lipídica tiene la composición en peso:

- 1) del 70 al 90 % en peso de fase acuosa, ventajosamente del 75 al 85 %, más ventajosamente del 78 al 82 %
- 2) del 9.5 al 29.5 % en peso de fase oleosa, ventajosamente del 14 al 25 %, más ventajosamente del 17 al 21 %;
- 3) del 0.38 al 2.95 % de tensioactivo, comprendiendo el tensioactivo del 95 al 99.95 % del quelato anfifílico y del 0.05 al 5 % del biovector anfifílico de identificación.

En esta realización, el quelato asegura un papel de tensioactivo suficiente que permite no tener que utilizar un lípido anfifílico tensioactivo. El quelato es entonces ventajosamente el quelato PCTA anfifílico o uno de sus derivados conocidos, particularmente descrito en el documento WO2006100305, en particular, los compuestos de fórmula I de la página 52 a 55 de este documento.

Según algunas realizaciones preferidas, la nanoemulsión lipídica tiene la composición en peso:

- 1) del 70 al 90 %, preferiblemente del 75 al 85 %, ventajosamente del 78 al 82 %, particularmente del 79 al 81 % de fase acuosa
- 2) del 9.5 al 29.5 %, preferiblemente del 14 al 25 %, ventajosamente del 17 al 21 % de aceite, comprendiendo el aceite al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 80, el 90, el 95 % de ácidos grasos saturados C6-C14, preferiblemente C6-C10
- 3) del 0.38 al 2.95 %, ventajosamente del 0.5 al 1.5 % de tensioactivos totales

precisándose que el total de los porcentajes de 1), 2) y 3) es igual al 100 %; según algunas realizaciones preferidas, los tensioactivos totales comprenden:

- 3.1) del 0 al 90 % de lípidos anfifílicos
- 3.2) del 10 al 100 %, ventajosamente del 10 al 40 %, de quelatos anfifílicos
- 3.3) del 0.01 al 10 %, ventajosamente del 0.05 al 5 %, de biovectores anfifílicos
- 3.4) del 0 al 30 % del derivado anfifílico pegilado.

En particular, las siguientes realizaciones son ventajosas:

% en peso de fase acuosa (1)	% en peso de aceite (2)	% en peso de tensioactivo con respecto al aceite (3)	% en peso de tensioactivo con respecto a la composición total (4)
70-90	9.5 - 29.5	del 4 al 10 % de (2)	[0.38 - 2.95] % (*)
75-85	14-25	del 4 al 10 % de (2)	[0.56 - 2.5] %
78-82	17-21	del 4 al 10 % de (2)	[0.68 - 2.1] %
75-85	14-25	del 5 al 8 % de (2)	[0.7 - 2] %
78-82	17-21	del 5 al 8 % de (2)	[0.85 - 1.68] %
Precisándose que el total (1) + (2) + (3) = 100 %			
(*) el intervalo [0.38 - 2.95] se corresponde con $0.04 * 9.5 = 0.38$ % y $0.1 * 29.5 = 2.95$			

Estos intervalos son particularmente preferidos en la medida en que permiten obtener un tamaño de las nanopartículas comprendido entre 150 y 300 nm, y en particular de entre aproximadamente 150 y 200 nm. El tamaño y la estabilidad de las partículas son muy satisfactorios, así como la viscosidad (del orden de entre 2 y 3 mPa.s). Su comportamiento es newtoniano, lo que constituye una ventaja importante para las soluciones farmacéuticas inyectables.

El solicitante ha podido constatar que más allá de un 30 % de aceite en la composición, ésta adopta un comportamiento muy reofluidificante y/o una viscosidad (la viscosidad se vuelve entonces superior a unos valores de entre 4 y 5 mPa.s) que no están adaptados para la inyección intravenosa.

Además, las formulaciones obtenidas son iso-osmolares, lo que evita molestias para el paciente durante la inyección. Además, la cantidad de quelatos de lantánidos y la cantidad de biovectores injertados en las nanopartículas están también adaptadas para la obtención de imágenes con RM. La composición es además capaz de soportar la esterilización con calor, típicamente con un autoclave.

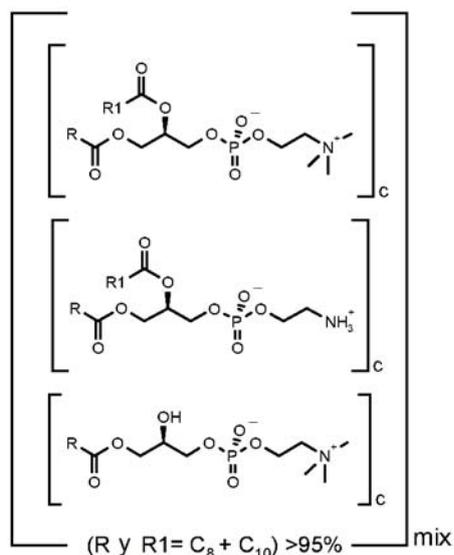
La invención concierne también a un agente de contraste que comprende una composición tal como la descrita anteriormente.

Tenemos, por ejemplo, los siguientes intervalos de proporciones de los constituyentes.

Fase acuosa de la composición (a)	Fase lipídica (aceite + tensioactivo) en % de la composición (b)	Contenido en (%) en tensioactivos del aceite (c)	Contenido en % en lípidos anfífilicos de los tensioactivos	Contenido en % en quelatos anfífilicos de los tensioactivos	Contenido en % en lípidos pegilados de los tensioactivos	Contenido en % en biovectores anfífilicos de los tensioactivos
del 75 al 85, preferiblemente del 78 al 82, preferiblemente de 80	del 14 al 25, preferiblemente del 17 al 21, preferiblemente de 20	del 5 al 10, preferiblemente del 5 al 8, preferiblemente de 6	del 50 al 95	del 5 al 25	0	del 0.05 al 5
del 75 al 85, preferiblemente del 78 a 82, preferiblemente de 80	del 14 al 25, preferiblemente del 17 a 21, preferiblemente de 20	del 5 al 10, preferiblemente del 5 al 8, preferiblemente de 6	del 75 al 95	del 5 al 25	del 5 al 15	del 0.05 al 5
del 75 al 85, preferiblemente del 78 a 82, preferiblemente de 80	del 14 al 25, preferiblemente del 17 a 21, preferiblemente de 20	del 5 al 10, preferiblemente del 5 al 8, preferiblemente de 6	0	del 95 al 99.95	del 0 al 5	del 0.05 al 5

El contenido total en el tensioactivo de los lípidos anfífilicos, los quelatos anfífilicos, los lípidos pegilados, los biovectores anfífilicos, es del 100 %.

- 5 Los lípidos anfífilicos comprenden una parte hidrófila y una parte lipófila. Generalmente se eligen entre los compuestos cuya parte lipófila comprende una cadena saturada o insaturada, lineal o ramificada, que tiene entre 8 y 30 átomos de carbono. Pueden elegirse entre los fosfolípidos, los colesteroles, los lisolípidos, las esfingomielinas, los tocoferoles, los glucolípidos, las estearilaminas, las cardiolipinas de origen natural o sintético; las moléculas formadas por un ácido graso acoplado a un grupo lipófilo mediante una función éter o éster, tales como los ésteres de sorbitano, como por ejemplo, los monooleato y monolaurato de sorbitano; los lípidos polimerizados; los ésteres de azúcar, tales como los mono- y di-laurato, mono- y di-palmitato, mono- y diestearato de sacarosa; dichos tensioactivos pueden ser utilizados solos o en mezclas.
- 10
- 15 El lípido anfífilico reactivo está incorporado en la capa formada en la interfase que estabiliza la fase dispersa, en la que es susceptible de acoplarse, por ejemplo, con un compuesto reactivo presente en la fase acuosa. Ventajosamente, el lípido anfífilico es un fosfolípido, elegido preferiblemente entre: fosfatidilcolina (denominada también lecitina), dioleoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol. La lecitina es un lípido anfífilico preferido.
- 20 Ventajosamente, el lípido anfífilico es un lipóide, particularmente la EPC (Etil Fosfo Colina y sus derivados conocidos, particularmente de Avanti Polar Lipids) o el lipóide S75



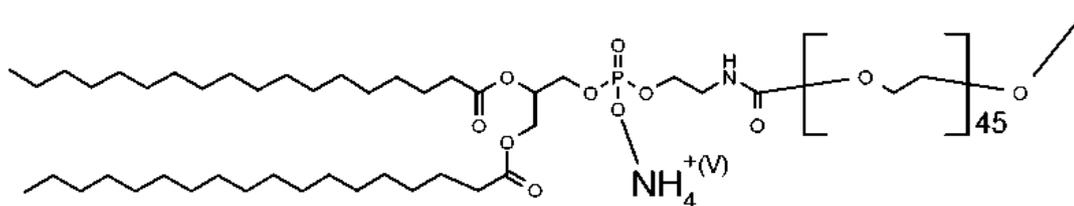
Fosfatidilcolina (+ LPC):	del 68 al 73 %
Fosfatidiletanolamina:	del 7 al 10 %
Lisofosfatidilcolina:	< del 3 %
Fósforo:	del 3,4 al 3,7 %

Según un modo de realización particular, todo o parte del lípido anfifílico puede poseer una función reactiva, tal como un grupo maleimida, tiol, amino, éster, oxiamina o aldehído. La presencia de funciones reactivas permite el injerto de compuestos funcionales en la interfase.

5 Para la fase anfifílica se podrá utilizar, además del quelato y del lípido anfifílico, de forma no obligatoria, y en particular con el fin de actuar sobre el carácter furtivo del producto en el organismo, lípidos pegilados, es decir, portadores de grupos óxido de polietileno (PEG), tales como la polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG-PE). Por « polietilenglicol » PEG, en el sentido de la presente solicitud, se denomina de forma general a los compuestos que  
10 comprenden una cadena  $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_k-\text{CH}_2\text{OR}_3$  en la que k varía desde 2 hasta 100 (por ejemplo, 2, 4, 6, 10, 50), y R3 se elige entre H, alquilo o  $-(\text{CO})\text{Alq}$ , designando el término "alquilo" o "alq" un grupo alifático hidrocarbonado, lineal o ramificado, que tiene entre aproximadamente 1 y 6 átomos de carbono en la cadena. El término « polietilenglicol », tal y como se emplea aquí, engloba particularmente los compuestos aminopolietilenglicoles. Particularmente se citarán los PEG 350, 750, 2000, 3000, 5000, modificados mediante la  
15 adición de grupos anfifílicos para que se inserten en el seno de la capa de tensioactivo de la nanopartícula, particularmente:

- 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-350]
- 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-550],
- 20 - 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-750]

Particularmente se utilizará el lípido pegilado:



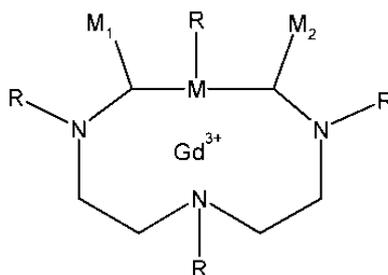
25 La fase acuosa es ventajosamente agua o una solución acuosa farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina, una solución tampón.

30 Por « quelato anfifílico », se entiende que el quelato ha sido modificado típicamente de forma que presente una lipofilia (una lipofilia lo suficientemente elevada, o por el contrario, una hidrofilia lo suficientemente baja), tal que pueda anclarse en el seno de la capa de tensioactivos de la nanopartícula, y de forma que forme una composición lipídica lo suficientemente estable para una utilización diagnóstica satisfactoria. Habrá, por ejemplo, de forma no limitante, una elección de los grupos anfifílicos injertados en el quelato tal que el valor del HLB (el equilibrio hidrófilo/lipófilo) del quelato sea del orden de entre 12 y 20 para los quelatos anclados en las nanoemulsiones  
35 lipídicas.

Además del lípido anfifílico, los quelatos anfifílicos utilizados por el solicitante juegan ventajosamente el papel de tensioactivo, presentando la ventaja de aportar una cantidad muy elevada de entidades de señalización a la nanopartícula. Ventajosamente, el número de quelatos de lantánido por nanogotita es de al menos 1000 y típicamente de al menos 5000, 10.000, 20.000, de 50.000 a 100.000.

40 De forma más precisa se describen a modo de ejemplo quelatos que pueden ser utilizados, en la medida en la que se ha descrito más arriba, que comprenden al menos un grupo anfifílico de anclaje a la nanopartícula lipídica. El solicitante describe los quelatos utilizables, precisándose que los quelatos particularmente ventajosos para sus nuevas emulsiones son los quelatos macrocíclicos. En efecto, los nanosistemas lipídicos que utilizan los quelatos macrocíclicos están significativamente menos expuestos que los quelatos lineales a un riesgo de transmetalación con cinc, en particular, están acompañados por un riesgo de liberación no deseado del lantánido, en particular de gadolinio  $\text{Gd}^{3+}$  tóxico.

50 Se podrán utilizar los quelatos macrocíclicos particularmente con la siguiente fórmula (ilustración con el gadolinio Gd, siendo también apropiados otros lantánidos)



con:

- 5 M-M1-M2 forman un núcleo de piridina  
 o M1 y M2 están ausentes y M representa un enlace  
 o M es N-R y M1 y M2 representan un átomo de hidrógeno o un metilo  
 eligiéndose R independientemente entre CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> o H o CHX-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, siendo al menos un R CHXCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y siendo X  
 10 L-B;

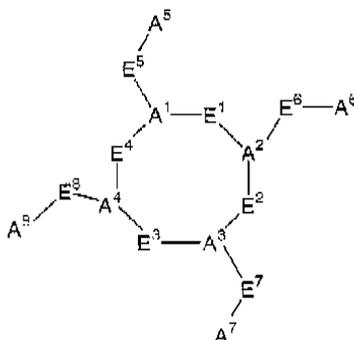
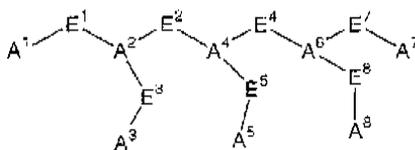
Se podrá utilizar particularmente un quelato macrocíclico entre el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triacético (DO3A), el ácido 10-(2-hidroxipropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-triacético (HPDO3A), (MCTA), (DOTMA), el ácido 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trieno-3,6,9-triacético (PCTA).

15 También se podrán utilizar los derivados en los cuales uno o varios grupos carboxílicos están en forma de una sal, de un éster, de una amida correspondiente; o un compuesto correspondiente en el que uno o varios grupos carboxílicos están sustituidos por un grupo fosfónico y/o fosfínico.

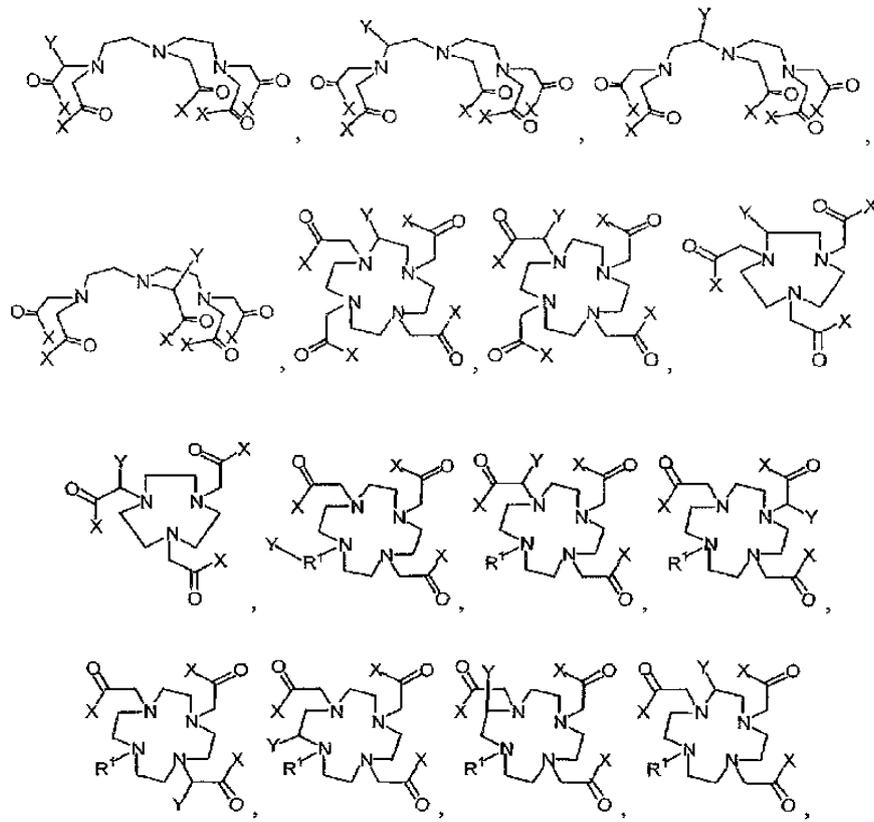
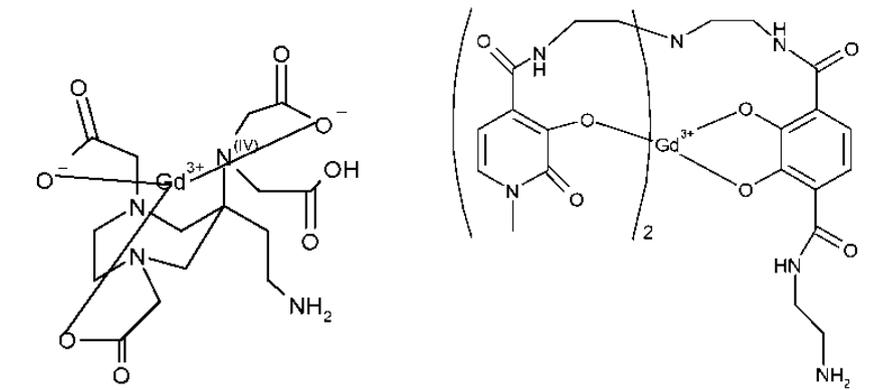
- 20 También se podrá utilizar un quelato entre: DOTA gadofluorinas, DO3A, HPDO3A, TETA, TRITA, HETA, DOTA-NHS, M4DOTA, M4DO3A, PCTA y sus derivados.

Se podrá utilizar un quelato lineal conocido elegido entre EDTA, DTPA ácido dietilentriaminopentaacético, N-[2-[bis(carboximetil)amino]-3-(4-etoxifenil)propil]-N-[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-L-glicina (EOB-DTPA), ácido N,N-bis[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-L-glutámico (DTPA-GLU), N,N-bis[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-L-lisina (DTPA-LYS), los derivados mono- o bis-amida del DTPA, tales como N,N-bis[2-[carboximetil[(metilcarbamoil)metil]amino]etil]glicina (DTPA-BMA), ácido 4-carboxi-5,8,11-tris(carboximetil)-1-fenil-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oico (BOPTA),

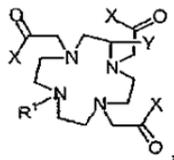
30 De una forma más amplia, el o los quelatos que forman la entidad de señalización podrían responder a la fórmula del documento WO 01/60416 o del documento WO 03/062198 (páginas 23 a 25).



35 En particular, se podrán utilizar los compuestos DOTA, NOTA, DO3A, AAZTA, HOPO, así como sus multímeros y derivados conocidos, particularmente:



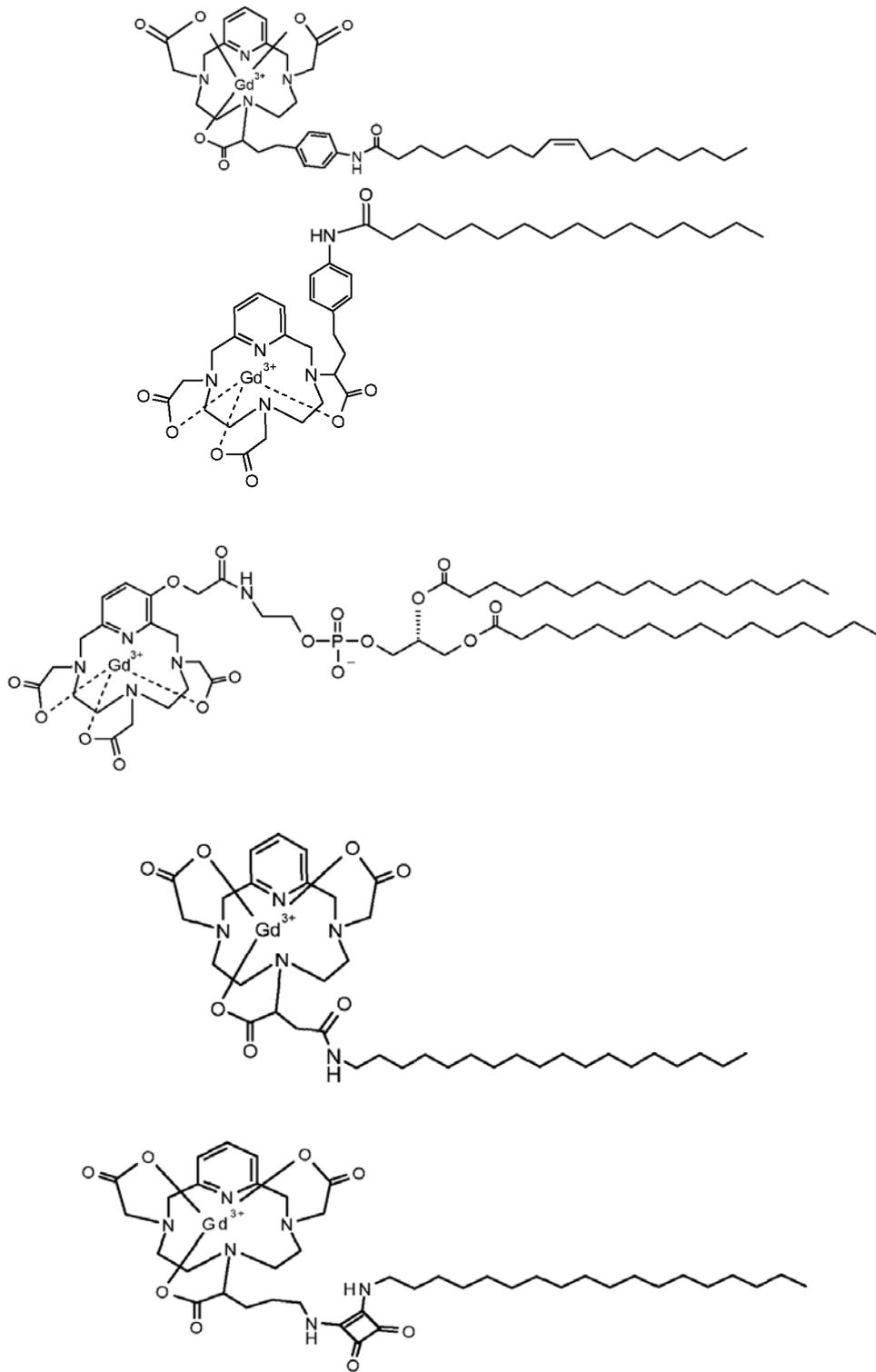
y

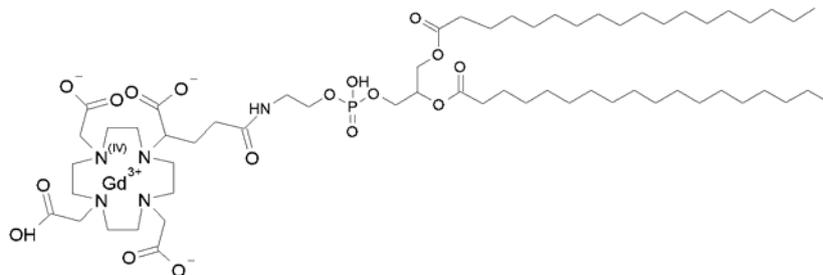
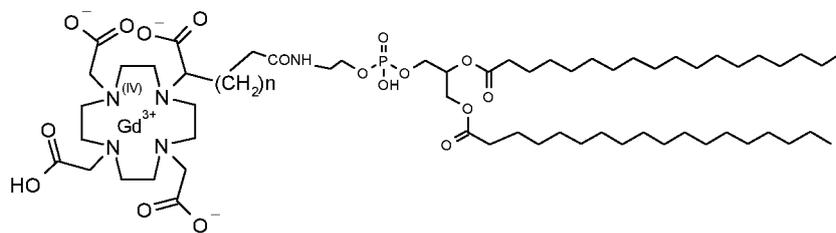
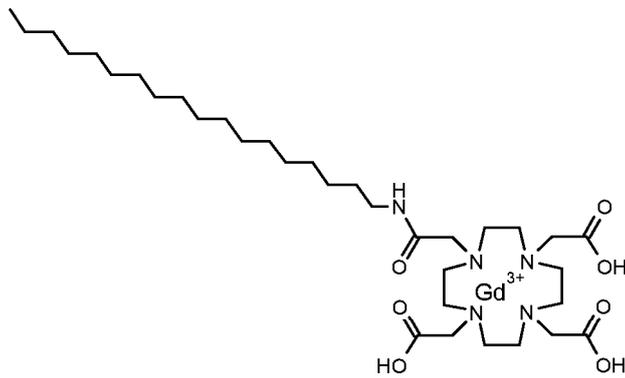
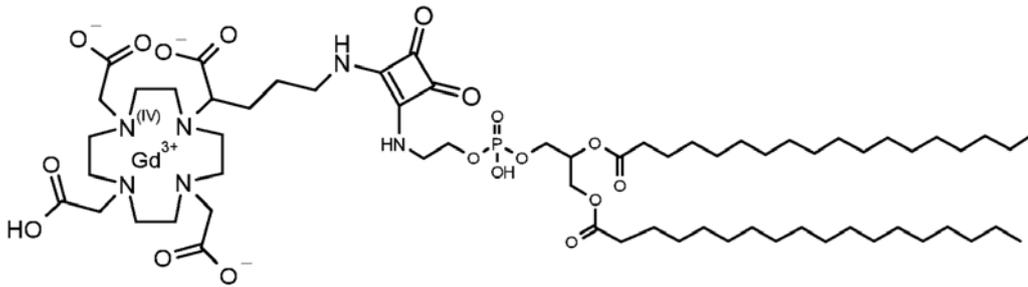
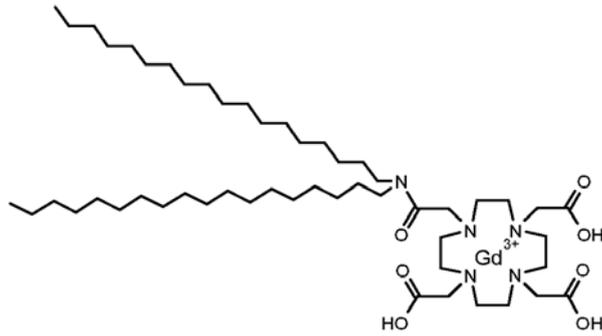


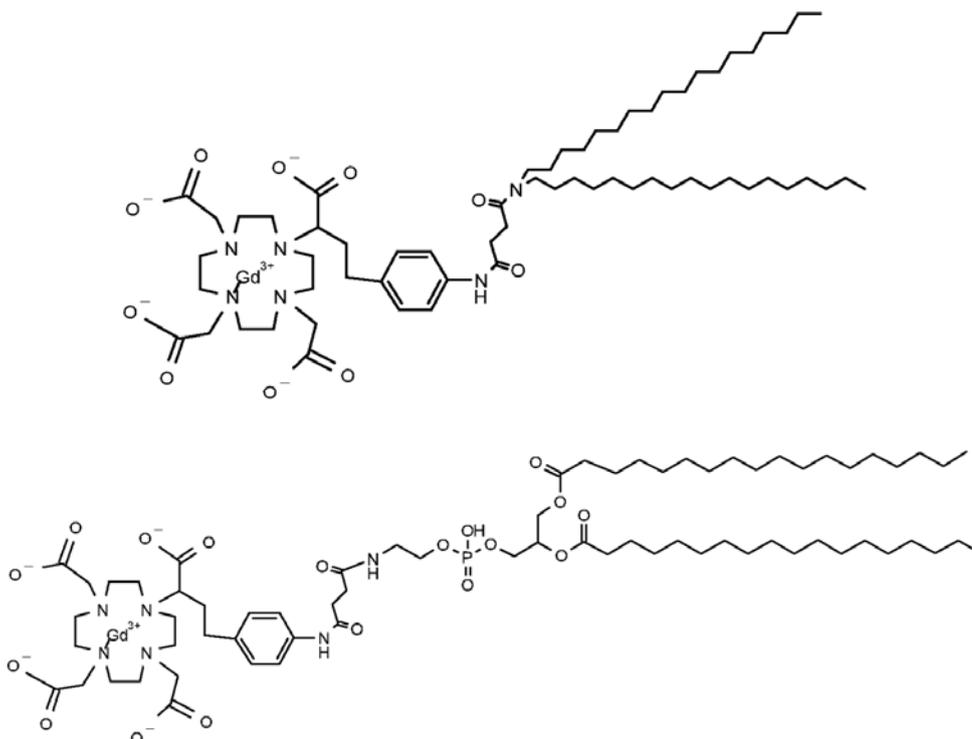
5 con X un grupo capaz de coordinar un catión metálico, preferiblemente O-, OH, NH<sub>2</sub>, OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NHR con R una cadena alifática.

10 Se mencionarán también los quelatos indicados en el documento WO 03/011115, páginas 8 a 11.

Como ejemplos de macrociclos anfífilos muy ventajosos, se pueden citar las siguientes estructuras derivadas de los núcleos del PCTA y del DOTA.

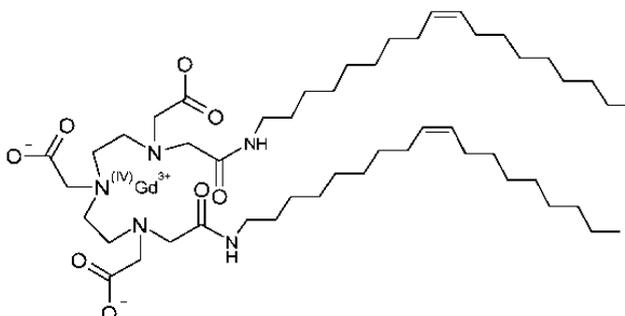






Las fórmulas se presentan en la solicitud, particularmente en los ejemplos detallados, con grupos de unión entre el quelato y la cadena carbonada lipófila. Es utilizable un gran número de grupos de unión, por ejemplo: nada o un enlace simple, los grupos alquilo o alquilenos C1-10, por ejemplo, alquilenos C1-6, PEG, por ejemplo, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-CH<sub>2</sub> con k = entre 1 y 50 particularmente aquí 10, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-CO- con n = entre 2 y 10, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-CO-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NH-CO- con q = 1-10 y r = 2-10, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-PEG, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-HOOC-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-COOH; HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH; HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH; HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH; NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, con n = 0-20; NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO<sub>2</sub>H; NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO<sub>2</sub>H con n = entre 1 y 10, P1-1-P2, idénticos o diferentes, eligiéndose P1 y P2 entre O, S, NH, nada, CO<sub>2</sub>, NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH, SO<sub>2</sub>NH-, NHSO<sub>2</sub>-, escuarato con 1 = alquilo, alcoxilalquilo, polialcoxilalquilo (PEG), alquilo interrumpido por uno o varios escuaratos o por uno o varios anillos, ventajosamente fenilos, alquilenos, alquinilos, alquilo interrumpidos por uno o varios grupos elegidos entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, -(CO)NH-, -O(CO)- o -(OC)O-.

Como ejemplos de los derivados del DTPA anfífilos, se utilizarán los de los ejemplos detallados u otros tales como:



Se recuerda que para obtener los quelatos macrocíclicos particularmente preferidos para las nuevas nanoemulsiones, de tipo DO3A, BT-DO3A, HP-DO3A, DOTA, DOTAM, DOTMA, DOTA-GA, y otros quelatos macrocíclicos portadores de cadenas carbonadas, se utilizará, por ejemplo, el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano o los derivados, preparados como conoce el experto en la materia, a partir de la dietileno triamina o de otros derivados poliazotados lineales.

Se recuerda que el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano se obtiene habitualmente a partir de derivados bicíclicos o de compuestos tetracíclicos (tales como el 2a,4a,6a,8a-decahidrotetraazaciclopenta[fg]acenaftileno).

Estos compuestos tetracíclicos se obtienen por su parte típicamente en un procedimiento que comprende una etapa de adición a la dietileno triamina de agentes conocidos tales como el benzotriazol o compuestos (R1R2) CH-X-CH (R3R4), compuestos mono o dicarbonilados R1C(=O)-C(=O)R2, compuestos CSNH2-CSNH2, siendo R1 a R4 particularmente H, OH, CH3, un alquilo C1-C3, un halógeno.

5 Esta adición conduce a compuestos con tres ciclos conocidos, tales como el 3H,6H-2a,5,6,8a-octahidro-tetraazaacenaftileno, obtenido por ejemplo, a partir del glioxal (y descrito particularmente en Tetrahedron Letters, vol. 22, nº 18, 1980, págs. 1711-1714), compuestos con tres ciclos a los cuales se les injertan a continuación agentes bialquilantes variados [X1-A-X1], que comprenden típicamente dos grupos salientes.

10 Los agentes bialquilantes conocidos son típicamente el dicloroetano o el dibromoetano. El solicitante ha constatado además que sería muy ventajosa la utilización de agentes bialquilantes [X1 - A - X2] que comprendan grupos salientes X1 y X2 diferentes (halógenos, tosilo, mesilo, etc ...), tales como el bromo cloro etano, el bromo cloro propano. En efecto, el rendimiento de la reacción de bialquilación se mejora significativamente a escala industrial.

15 Un procedimiento de preparación muy ventajoso de macrociclos poliazotados como el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano y el 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (ciclám), es un procedimiento que comprende las siguientes etapas sucesivas:

20 1) adición a un compuesto con tres ciclos azotados fusionados, particularmente a uno de los siguientes compuestos:

- 3H,6H-2a,5,6,8a-octahidro-tetraaza-acenaftileno,
- octahidro-1,3a,6a,9-tetraazafenaleno,
- 5a,8b dimetil-octahidro-2a,5,6,8a-tetraaza-acenaftileno
- 25 - 9a,9b-dimetil-octahidro-1,3a,6a,9-tetraazafenaleno
- octahidro-2a,5,6,8a- tetraaza-acenaftileno

30 de un agente bialquilante [X1 - A - X2] que comprende dos grupos salientes X1 y X2 diferentes y elegidos preferiblemente entre halógeno, tosilo, mesilo, siendo A preferiblemente un alquilo lineal o ramificado, preferiblemente siendo A CH2-CH2, siendo X1 y X2 preferiblemente un halógeno Cl o Br, por ejemplo, siendo [X1 - A - X2] ClCH2-CH2Br, para obtener los compuestos con cuatro ciclos azotados fusionados, por ejemplo, los compuestos:

- 2a,4a,6a,8a-decahidrotetraazaciclopenta[fg]naftileno
- 35 - 8b-metil 2a,4a,6a,8a-decahidrotetraazaciclopenta[fg]acenaftileno
- 8b,8c dimetil 2a,4a,6a,8a-decahidrotetraazaciclopenta[fg]acenaftileno
- 9b,9c-dimetil decahidro-2a,4a,7a,9a tetraaza ciclopenta [cd]fenaleno
- decahidro-2a,4a,6a,8 a tetraaza ciclopenta [fg]acenaftileno
- 10b, 10c-dimetil decahidro-3a,5a,8a,10a tetraaza pireno
- 40 - decahidro-3a,5a,8a,10a tetraaza pireno

45 2) hidrólisis, por ejemplo, como se describe en la técnica anterior, mediante la adición de una solución acuosa de ácido clorhídrico, de forma que se obtenga el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano o el ciclám o sus derivados sustituidos en al menos un carbono del ciclo con un grupo alifático particularmente alquilo o alquil-arilo, eventualmente sustituidos o interrumpidos por OH, O, N, CONH, NHCO, -OCO-alquilo, -COO-alquilo

3) dado el caso, una alquilación, con los agentes alquilantes apropiados conocidos particularmente en el documento EP 499 501 o en el documento EP 287 465 (Guerbet), por ejemplo, utilizando ácido cloroacético, ácido bromoacético, bromoacetato de tercbutilo y ácido trifluoroacético, dado el caso en presencia de una base tal como NaOH o KOH o LiOH;

50 de forma que se obtengan los derivados de los DO3A, BT-DO3A, HP-DO3A, DOTA, DOTAM, DOTMA, DOTA-GA dado el caso, sustituidos en al menos un carbono con un ciclo poliazotado.

55 Se recuerda que los metales paramagnéticos incluyen los lantánidos de número atómico 58-70 y los metales de transición de número atómico 21-29, 42 o 44, por ejemplo, escandio, titanio, vanadio, cromo. Ventajosamente, el metal paramagnético se elige entre los elementos: manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, molibdeno, rutenio, cerio, praseodimio, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio e iterbio. Particularmente se prefieren los elementos Gd (III), Mn (II), europio, disprosio, ventajosamente Gd.

60 En el caso de una utilización para la obtención de imágenes multimodal (por ejemplo, RM + PET) o en medicina nuclear (imágenes de SPECT y/o de PET), los quelatos pueden ser utilizados para complejar un radioelemento tal como el tecnecio, el indio, el galio.

65 La invención concierne también a las composiciones descritas previamente para su utilización para el diagnóstico de enfermedades, particularmente cancerosas, neurodegenerativas, vasculares.

Según otro aspecto, el solicitante ha conseguido demostrar que la utilización, en la fabricación de las nanoemulsiones, de al menos un disolvente, ventajosamente cloroformo y/o metanol, es muy ventajosa para mejorar la estabilización del nanosistema, la relaxividad de los quelatos de lantánidos, el tiempo de semivida del producto. La invención concierne así igualmente a la preparación de una emulsión del solicitante que comprende la utilización de un disolvente, ventajosamente de cloroformo y/o de metanol. Gracias a la utilización de dichos disolventes, la relaxividad por quelato para un quelato anfífilico de tipo q = 1 (DOTA, HPDO3A, por ejemplo) pasa de un valor de 10 hasta aproximadamente de 15 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

Según otro aspecto, la invención concierne a un procedimiento de preparación de una nanoemulsión lipídica de un lantánido que comprende una fase lipídica formada por nanogotitas lipídicas dispersadas en solución acuosa, que comprende las etapas de:

- preparación de una fase lipídica que comprende

- o un primer tensioactivo lípido anfífilico
- o un aceite que comprende al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 80, el 90, el 95, el 97 % de ácidos grasos saturados C6-C18, ventajosamente C6-C14, y muy ventajosamente C6-C10
- o un quelato de un metal paramagnético anfífilico

- disolución de la fase lipídica en un disolvente o en una mezcla de disolventes
- eliminación del o de los disolventes
- dispersión de la fase lipídica en una solución acuosa de forma que se formen las nanogotitas lipídicas
- recuperación de la nanoemulsión obtenida.

Ventajosamente la fase lipídica se obtiene introduciendo sus componentes en un disolvente apropiado y después evaporando el disolvente.

Las emulsiones del solicitante son mezclas lipídicas heterogéneas obtenidas de una forma apropiada, ventajosamente una agitación mecánica y/o la adición de agentes emulsionantes. Por ejemplo, se mezcla mecánicamente la fase lipídica representada por el aceite y los quelatos transformados en anfífilicos, con disolventes orgánicos tales como cloroformo. Después de la evaporación del disolvente (de forma que se forme una película lipídica), la fase lipídica se pone en suspensión en un medio acuoso (tal como PBS o la solución acuosa de la solicitud), para obtener una emulsión que típicamente experimenta una aplicación de ultrasonidos y una microfluidificación. La nanoemulsión obtenida se utiliza después para la administración al paciente, dado el caso, después de la incorporación de aditivos farmacéuticos diversos. Las emulsiones obtenidas pueden ser liofilizadas, dado el caso, con la utilización de agentes antiaglutinación.

La composición que forma el agente de contraste es administrada preferiblemente por vía intravascular, según el paciente examinado, por ejemplo, a razón de entre 0.1 mg y 1 g del compuesto quelato anfífilico y de entre 1 y 50 micromoles del ion del metal paramagnético por kg de paciente.

El solicitante ha preparado nuevas emulsiones, preferiblemente de lantánidos, con unas composiciones químicas específicas, cuya eficacia y tolerancia *in vivo* están significativamente mejoradas. Las nanoemulsiones lipídicas del solicitante son vectorizadas con la ayuda de biovectores de identificación (denominados igualmente farmacóforos o ligandos de identificación). La nanoemulsión comprende al menos un biovector de identificación de una zona patológica anclado a la nanopartícula, típicamente con la ayuda de un grupo de anclaje del biovector. Ventajosamente, el número de biovectores por nanopartícula es de al menos 1.000 y típicamente del orden de 1.000, de 2.000, de 5.000, de 10.000.

Como ligandos de identificación preferidos, se mencionarán los objetivos biológicos cuya expresión está modificada en una zona patológica (un tumor, por ejemplo), con respecto a la zona sana. Ventajosamente se utiliza como farmacóforo o ligando de identificación o biovector de identificación al menos un ligando elegido entre: los péptidos (ventajosamente de menos de 20 aminoácidos, más ventajosamente de entre 5 y 10 aminoácidos), los pseudopéptidos, los peptidomiméticos, los aminoácidos, los agentes de identificación de integrinas (péptidos y pseudopéptidos, peptidomiméticos particularmente), las glicoproteínas, las lectinas, la biotina, los derivados pteróicos o aminopteroicos, los derivados del ácido fólico y antifólico, los anticuerpos o los fragmentes de anticuerpos, la avidina, los esteroides, los oligonucleótidos, las secuencias de ácido ribonucleico, las secuencias de ácido desoxirribonucleico, las hormonas, las proteínas eventualmente recombinantes o mutadas, los mono- o polisacáridos, los compuestos con un esqueleto de benzotiazol, benzofurano, estirilbenzoxazol / tiazol/ imidazol / quinolina, estirilpiridina y los compuestos derivados, y sus mezclas. Los péptidos, los derivados del ácido fólico y antifólico, los agentes de identificación de integrinas (péptidos y pseudopéptidos, peptidomiméticos particularmente), los agentes de identificación de receptores celulares o de enzimas (particularmente de identificación de cinasas, particularmente de la cinasa de tirosina; de metaloproteasas; de caspasas ...) son particularmente preferidos.

Según algunas realizaciones ventajosas, el ligando de identificación se elige entre la siguiente lista (los documentos y las referencias entre paréntesis son ejemplos):

- 1) Los biovectores que se dirigen a los receptores del VEGF y de la angiopoyetina (descritos en el documento WO 01/97850), los polímeros tales como la polihistidina (documento US 6,372,194), los polipéptidos que se dirigen a la fibrina (documento WO 2001/9188), los péptidos de identificación de integrinas (documento WO 01/77145, documento WO 02 26776 para alfav beta3, documento WO 02/081497, por ejemplo, RGDWXE), los pseudopéptidos y los péptidos de identificación de metaloproteasas MMP (documento WO 03/062198, documento WO 01/60416), los péptidos que se dirigen, por ejemplo, al receptor KDR/Flk-1 como R-X-K-X-H y R-X-K-X-H, o los receptores Tie-1 y 2 (documento WO 99/40947 por ejemplo), los glicósidos de sialil Lewis (documento WO 02/062810 y « Müller et al, Eur. J. Org. Chem, 2002, 3966-3973), los antioxidantes tales como el ácido ascórbico (documento WO 02/40060), los biovectores de identificación de la tuftsin (por ejemplo, documento US 6,524,554), de identificación de receptores de la proteína G GPCR, en particular la colecistocinina (documento WO 02/094873), las asociaciones entre un antagonista de la integrina y miméticos de la guanidina (documento US 6 489 333), las quinolonas que se dirigen al alfav beta3 o 5 (documento US 6,511,648), las benzodiazepinas y los análogos que se dirigen a las integrinas (documento US 2002/0106325, documento WO 01/97861), los imidazoles y los análogos (documento WO 01/98294), los péptidos RGD (documento WO 01/10450), los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos (FGF, TGFb, GV39, GV97, ELAM, VCAM, inducible por el TNF o una IL (documento US 6,261,535), las moléculas de identificación modificadas por la interacción con el objetivo (documento US 5,707,605), los agentes de identificación de depósitos amiloides (documento WO 02/28441, por ejemplo), los péptidos escindidos catepsinas (documento WO 02/056670), la mitoxantrona o la quinona (documento US 6,410,695), los polipéptidos que se dirigen a las células epiteliales (documento US 6,391,280), los inhibidores de las proteasas de cisteínas (documento WO 99/54317), los biovectores descritos en: el documento US 6,491,893 (GCSF), el documento US 2002/0128553, el documento WO 02/054088, el documento WO 02/32292, el documento WO 02/38546, el documento WO 03006059, el documento US 6,534,038, el documento WO 01/77102, el documento EP 1 121 377, Pharmacological Reviews (52, nº 2, 179; factores de crecimiento PDGF, EGF, FGF...), Topics in Current Chemistry (222, W. Krause, Springer), Bioorganic & Medicinal Chemistry (11, 2003, 1319-1341; los derivados de tetrahydrobenzazepinonas que se dirigen a alfa v beta3).
- 2) Los inhibidores de la angiogénesis, particularmente los probados en ensayos clínicos o los ya comercializados, particularmente:
- los inhibidores de la angiogénesis que implican a los receptores FGFR o VEGFR tales como SU101, SU5416, SU6668, ZD4190, PTK787, ZK225846, los compuestos azaciclos (documento WO 02/44156, documento WO 02/059110);
  - los inhibidores de la angiogénesis que implican a las MMP tales como el BB25-16 (marimastat), el AG3340 (prinomastat), el solimastat, el BAY12-9566, el BMS275291, el metastat, el neovastat;
  - los inhibidores de la angiogénesis que implican a las integrinas, tales como el SM256, el SG545, las moléculas de adhesión que bloquean el EC-ECM (tales como el EMD 121-974 o la vitaxina);
  - los medicamentos con un mecanismo de acción antiangiogénico más indirecto, tales como el carboxiamidotriazol, el TNP470, la escualamina, el ZD0101;
  - los inhibidores descritos en el documento WO 99/40947, los anticuerpos monoclonales muy selectivos para la unión al receptor KDR, los análogos de la somatostatina (documento WO 94/00489), los péptidos de unión a la selectina (documento WO 94/05269), los factores de crecimiento (VEGF, EGF, PDGF, TNF, MCSF, interleucinas); los biovectores de identificación del VEGF descritos en Nuclear Medicina Communications, 1999, 20;
  - los péptidos inhibidores del documento WO 02/066512.
- 3) Los biovectores capaces de dirigirse a los receptores: CD36, EPAS-1, ARNT, NHE3, Tie-1, 1/KDR, Flt-1, Tek, neuropilina-1, endoglina, pleientropina, endosialina, Axl., aPi, a2ssl, a4P1, a5pl, eph B4 (efrina), receptor de la laminina A, receptor de la neutrofilina 65, receptor de la leptina OB-RP, receptor de la quimiocina CXCR-4 (y otros receptores citados en el documento WO99/40947), LHRH, bombesina/GRP, receptores de la gastrina, VIP, CCK.
- 4) Los biovectores de tipo inhibidores de la cinasa de tirosina.
- 5) Los inhibidores del receptor GPIIb/IIIa conocidos elegidos entre: (1) el fragmento fab de un anticuerpo monoclonal del receptor GPIIb/IIIa, Abciximab, (2) las pequeñas moléculas peptídicas y peptidomiméticas inyectadas por vía intravenosa, tales como eptifibatida y tirofiban.
- 6) Los péptidos antagonistas de los receptores del fibrinógeno (documento EP 0 425 212), los péptidos ligandos de los receptores IIb/IIIa, los ligandos del fibrinógeno, los ligandos de la trombina, los péptidos capaces de dirigirse a la placa de ateroma, las plaquetas, la fibrina, los péptidos a base de hirudina, los derivados basados en guanina que se dirigen al receptor IIb/IIIa.
- 7) Otros biovectores o fragmentos biológicamente activos de biovectores conocidos por el experto en la materia como medicamentos, con una acción antitrombótica, antiagregante plaquetar, antiaterosclerótica, antirreestenótica, anticoagulante.
- 8) Otros biovectores o fragmentos biológicamente activos de biovectores que se dirigen a alfa v beta3, descritos en asociación con los DOTA en la patente US 6 537 520, elegidos entre los siguientes: mitomicina, tretinoína, ribomustina, gemcitabina, vincristina, etopósido, cladribina, mitobronitol, metotrexato, doxorubicina, carbocina, pentostatina, nitracrina, zinostatina, cetrorrelis, letrozol, raltitrexed, daunorrubicina, fadrozol, fotemustina, timalfasina, sobuzoxano, nedaplatino, citarabina, bicalutamida, vinorelbina, vesnarinona,

- aminoglutetimida, amsacrina, proglumida, acetato de eliptinio, ketanserina, doxifluridina, etretinato, isotretinoína, estreptozocina, nimustina, vindesina, flutamida, drogenilo, butocina, carmofur, razoxano, sizofilano, carboplatino, mitolactol, tegafur, ifosfamida, prednimustina, picibanilo, levamisol, tenipósido, improsulfano, enocitabina, lisurida, oximetolona, tamoxifeno, progesterona, mepitostano, epitostanol, formestano, interferón alfa, interferon-2 alfa, interferón beta, interferón gamma, factor estimulante de colonias 1, factor estimulante de colonias 2, denileucina diftitox, interleucina 2, factor liberador de la hormona luteinizante.
- 5) 9) ciertos biovectores que se dirigen a unos tipos particulares de cáncer, por ejemplo, los péptidos que se dirigen al receptor ST asociado al cáncer colorrectal, o el receptor de la taquicinina.
- 10) 10) los biovectores que utilizan los compuestos de tipo fosfinas.
- 10) 11) los biovectores de identificación de la P-selectina, la E-selectina; por ejemplo, el péptido de 8 aminoácidos descrito por Morikawa et al, 1996, 951, así como diferentes azúcares.
- 12) 12) la anexina V o los biovectores que se dirigen a los procesos apoptóticos.
- 13) 13) cualquier péptido obtenido mediante las tecnologías de identificación, tales como la expresión en fago, eventualmente modificado por aminoácidos no naturales (<http://chemlibrary.bri.nrc.ca>), por ejemplo, los péptidos procedentes de bancos de expresión en fago: RGD, NGR, CRRETAWAC, KGD, RGD-4C, XXXY\*XXX, RPLPP, APPLPPR.
- 15) 14) otros biovectores peptídicos conocidos de identificación de placas de ateroma, citados particularmente en el documento WO 2003/014145, y particularmente el VCAM
- 15) 15) las vitaminas.
- 20) 16) los ligandos de receptores hormonales como las hormonas y los esteroides.
- 17) 17) los biovectores que se dirigen a los receptores opioides.
- 18) 18) los biovectores que se dirigen a los receptores TKI.
- 19) 19) los antagonistas LB4 y VnR.
- 20) 20) los compuestos nitriimidazoles y bencilguanidinas.
- 25) 21) los biovectores mencionados en Topics in Current Chemistry, vol. 222, 260-274, Fundamentals of Receptor-based Diagnostic Metallopharmaceuticals, particularmente:
- los biovectores de identificación de los receptores peptídicos sobreexpresados en los tumores (los receptores de la LHRH, bombesina/GRP, los receptores del VIP, los receptores de la CCK, los receptores de la taquicinina, por ejemplo), particularmente los análogos de la somatostatina o de la bombesina, los péptidos derivados de octreotida eventualmente glicosilados, los péptidos VIP, los alfa-MSH, los péptidos CCK-B
  - los péptidos elegidos entre: los péptidos cíclicos RGD, fibrina-cadena alfa, CSVTCR, tuftsin, fMLF, YIGSR (receptor: laminina).
- 30) 22) los oligosacáridos, los polisacáridos y los derivados de osas, los derivados que se dirigen a los receptores Glut (receptores de osas).
- 23) 23) los biovectores utilizados para los productos de tipo smart.
- 24) 24) los marcadores de la viabilidad miocárdica (tetrofosmina y hexakis2metoxi-2metilpropilisonitrilo).
- 25) 25) los trazadores del metabolismo de los azúcares y de las grasas.
- 40) 26) los ligandos de los receptores de neurotransmisores (los receptores de D, 5HT, Ach, GABA, NA).
- 27) 27) los oligonucleótidos.
- 28) 28) el factor tisular
- 29) 29) los biovectores descritos en el documento WO 03/20701, en particular el ligando PK11195 del receptor periférico de las benzodiazepinas.
- 45) 30) los péptidos que se unen a la fibrina, particularmente las secuencias peptídicas descritas en el documento WO 03/11115.
- 31) 31) los inhibidores de la agregación de las placas amiloides (descritos por ejemplo, en el documento WO 02/085903).
- 50) 32) los farmacóforos compuestos de identificación de la enfermedad de Alzheimer, en particular los compuestos que comprenden los esqueletos de tipo benzotiazol, benzofuranos, estirilbenzoxazoles / tiazoles / imidazoles / quinolina, estirilpiridinas.
- 33) 33) los farmacóforos compuestos de identificación obtenidos a partir de los esqueletos químicos con actividad farmacológica descritos en el documento US2007098631, particularmente las fórmulas de las páginas 4 a 10 y de las páginas 13 -14 (incorporado como referencia), particularmente los compuestos de la tabla de la página 4 en la columna titulada « scaffolds and derivatives »: bifenilo; arilpiperidina; arilpiperacina; 1,4 dihidropiridina dihidropirimidona; 1,4 benzodiazepin-2-ona; 1,5 benzodiazepin-2-ona; 1,4-benzodiazepin-2,5 dionas; pirrolo2,1-c 1,4 benzodiazepinas 5,11 dionas; 1,4 benzotiazepin-5-onas; 5,11-dihidro-benzo pirido 3,2b 1,4 diazepin-6-onas benzopirano; cromona; benzopirano; cumarina, piranocumarina; benzopiperacinas; quinazolinona; quinazolinona; quinoxalinona; imidazoquinoxalina; indol; bencimidazol, benzofurano, benzotiofeno.
- 60) 34) los compuestos de identificación de integrinas, particularmente los que tienen una afinidad superior a 10.000, 100.000 o más, particularmente los compuestos no peptídicos miméticos de los péptidos RGD, y en particular los compuestos tetrahidro naftiridina descritos, por ejemplo, en: J Med. Chem., 2003, 46, 4790-4798, Bioorg. Med. Chem. Letters, 2004, 14, 4515-4518, Bioorg. Med. Chem. Letters, 2005, 15, 1647-1650.
- 65) 35) los compuestos de identificación de MUC5AC, particularmente los fragmentos de anticuerpos, los péptidos y los compuestos no peptídicos miméticos de péptidos

En particular, para estos compuestos de naftiridina, el solicitante utiliza cualquier compuesto de naftiridina conocido en la técnica anterior (particularmente los del documento WO 2009/114776), describiéndose la utilización de los compuestos de naftiridina como biovector para la obtención de imágenes médicas en el documento WO 2007/042506 página 13 líneas 30-34.

5 Los ligandos de identificación (la parte de biovector del biovector anfílico) para el reconocimiento del objetivo en el medio biológico son injertados, esencialmente en el lado de la superficie externa de las nanogotitas, con la ayuda de los apropiados grupos químicos de anclaje en la capa de tensioactivo.

10 El biovector anfílico se escribe ventajosamente en la forma: Bio - L - Lipo, en la que:

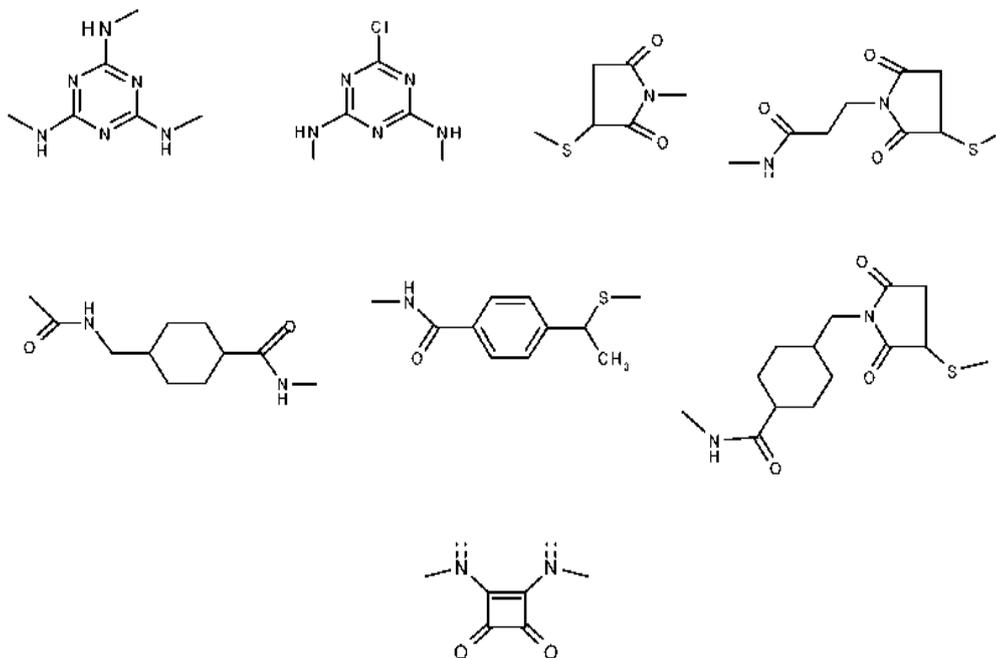
- Bio es la parte de reconocimiento biológico localizada en la superficie externa de las nanogotitas
- Lipo es un grupo lipófilo que permite la inserción del biovector en el seno de la capa de tensioactivo
- L es un grupo de unión que une Bio y Lipo, elegido ventajosamente entre:

15 - nada o un enlace simple, alquileo C1-6, PEG por ejemplo, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-CO- con n = 2 a 10, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-CO-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NH-CO- con q = 1-10 y r = 2-10, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH - PEG, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-HOOC-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-COOH; HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH; HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH; HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH; NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, con n = 0-20; NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO<sub>2</sub>H; NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO<sub>2</sub>H con n = de 1 a 10, escuarato

20 - P1-1-P2, idénticos o diferentes, eligiéndose P1 y P2 entre O, S, NH, nada, CO<sub>2</sub>, NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH, SO<sub>2</sub>NH-, NHSO<sub>2</sub>-, escuarato

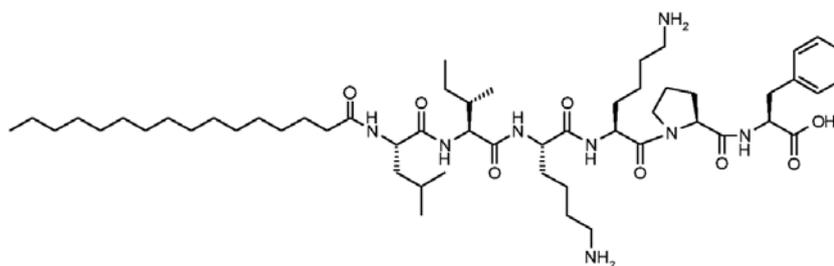
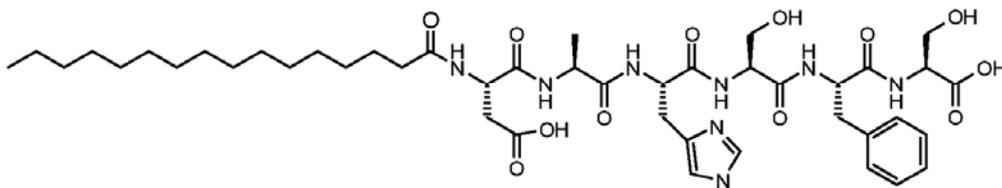
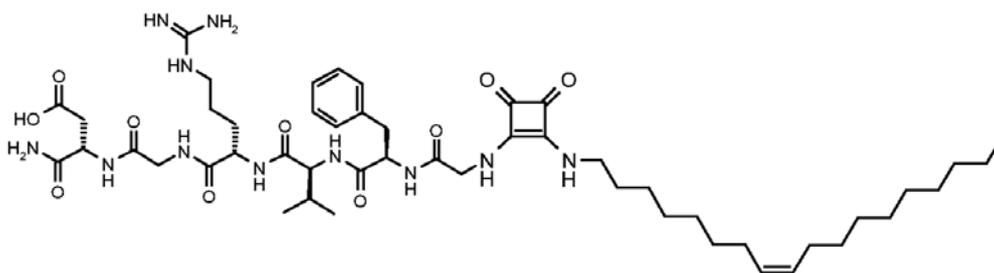
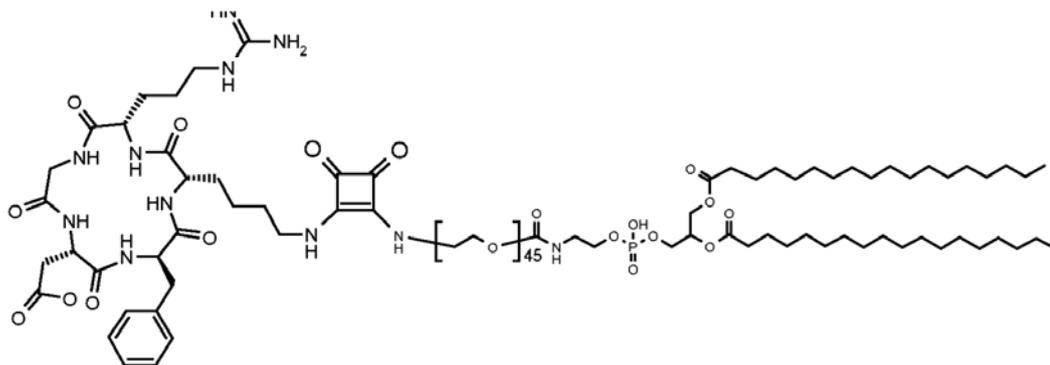
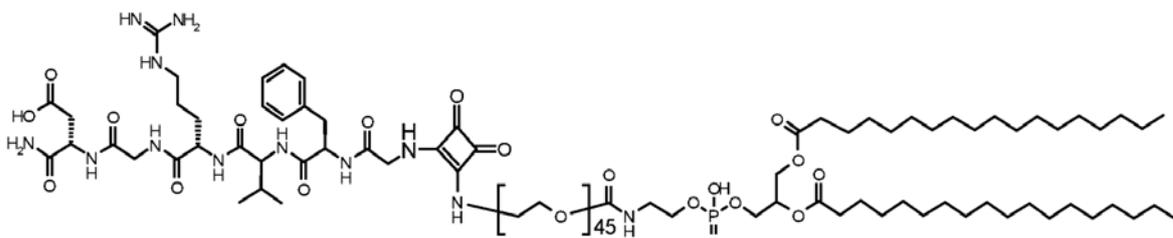
25 con 1 = alquilo, alcoxilquilo, polialcoxilquilo (PEG), alquilo interrumpido por uno o varios escuaratos o por uno o varios arilos, ventajosamente fenilos, alqueno, alquino, alquilo interrumpidos por uno o varios grupos elegidos entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, -(CO)NH-, -O(CO)- o -(OC)O-).

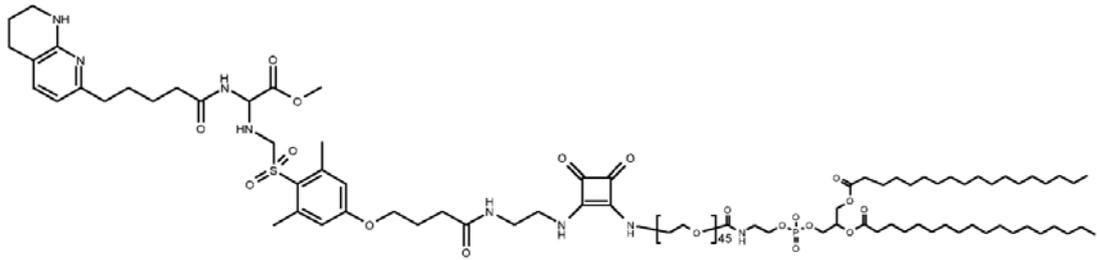
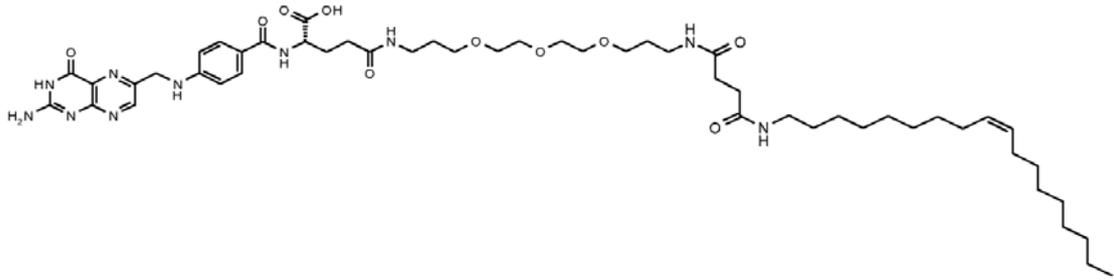
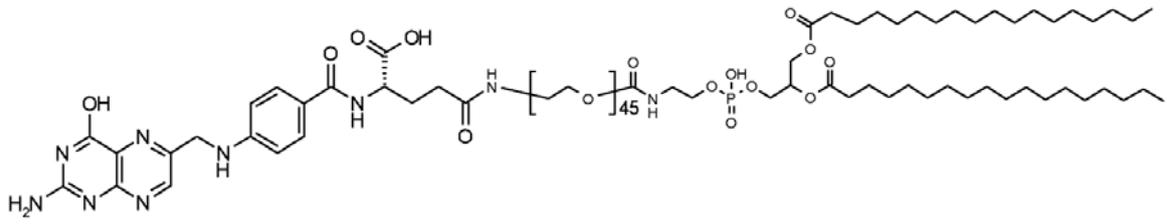
30 Los enlaces covalentes entre Bio y L son ventajosamente de tipo -CONH-, -COO-, -NHCO-, -OCO-, -NH-CS-NH-, -C-S-, -N-NH-CO-, -CO-NH-N-, -CH<sub>2</sub>-NH-, -N-CH<sub>2</sub>-, -N-CS-N-, -CO-CH<sub>2</sub>-S-, -N-CO-CH<sub>2</sub>-S-, -N-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, -CH=NH-NH-, -NH-NH=CH-, -CH=N-O-, -O-N=CH- o que responden a las siguientes fórmulas:

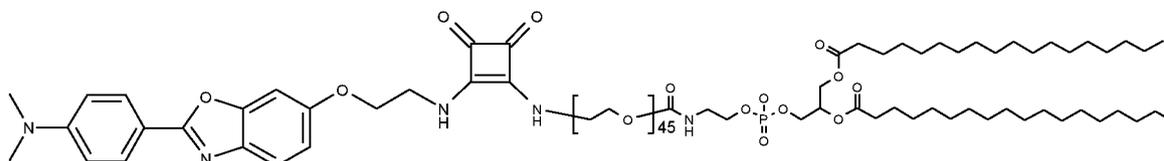
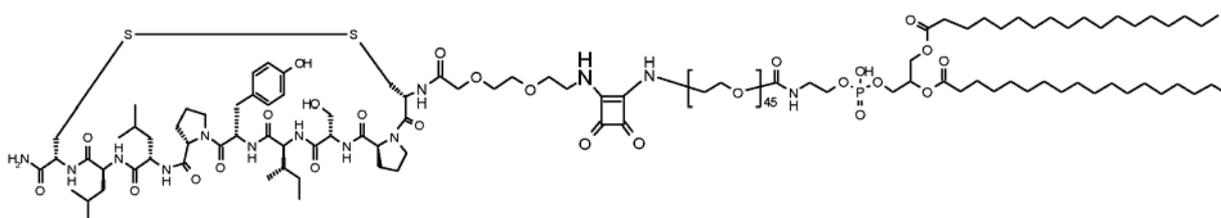
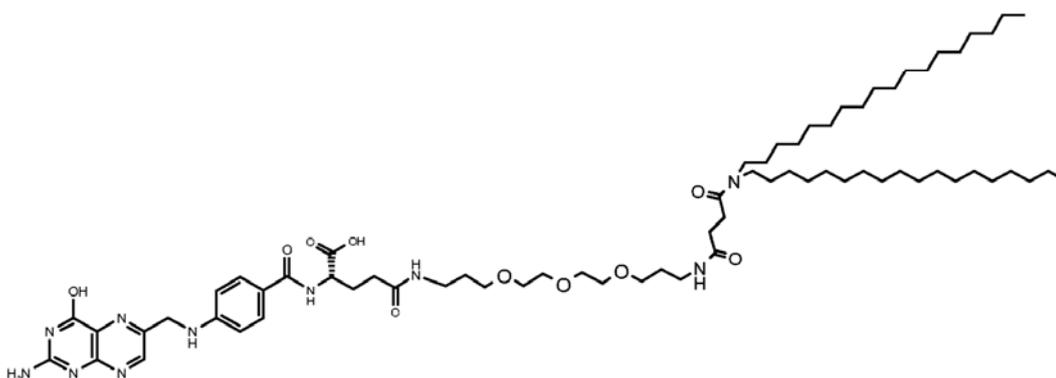
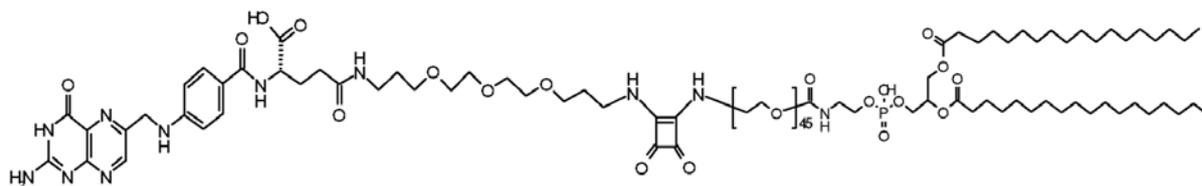


35 Se presentan algunos ejemplos de biovectores farmacóforos, pequeñas moléculas orgánicas de identificación (en lo sucesivo: péptidos, derivados del ácido fólico, derivados de la naftiridina), transformados en anfílicos para su anclaje a la superficie externa de la nanopartícula.

40 La solicitud presenta algunos ejemplos ilustrativos de su síntesis.







5 Como se ha explicado en la solicitud, los ligandos de identificación mencionados tienen esencialmente una vocación de obtención de imágenes diagnósticas. No obstante, se pueden preparar nanoemulsiones que comprendan además los ligandos igualmente con el objetivo de un tratamiento terapéutico. Las nanogotitas comprenderán entonces por un lado un ligando de identificación para alcanzar el objetivo biológico (la zona patológica), y por otro lado un ligando utilizado como medicamento para el tratamiento terapéutico. La invención concierne así también a las composiciones descritas previamente, cuando incorporan un fármaco terapéutico, para su utilización para el tratamiento de enfermedades, particularmente cancerosas, neurodegenerativas, vasculares.

15 Según algunas realizaciones, el tensioactivo comprende además al menos un agente de furtividad anfífilo, ventajosamente un derivado del PEG, un derivado de tipo gangliósido (residuos osídicos esterificados típicamente por ácido siálico o NAC), un polisacárido (particularmente el dextrano o uno de sus derivados conocidos). Estos agentes de furtividad son integrados sin alterar la afinidad de la nanopartícula por el objetivo biológico.

20 La composición que forma el agente de contraste es administrada preferiblemente por vía intravascular, según el paciente examinado, por ejemplo, a razón de entre 0,1 mg y 1 g del compuesto quelato anfífilo y de entre 1 y 50 micromoles del ion del metal paramagnético por kg del paciente.

25 Las composiciones lipídicas obtenidas se formulan, dado el caso, con la ayuda de los aditivos conocidos mencionados, por ejemplo, en el documento US 6,010,682, particularmente para una administración mediante una inyección intravenosa. Se citarán particularmente los agentes espesantes, los sacáridos o los polisacáridos, el glicerol, la dextrosa, el cloruro de sodio, los antimicrobianos.

Ventajosamente, gracias a las composiciones según la invención, se puede obtener un aumento en la relaxividad por ion. Típicamente se obtienen las siguientes características, que pueden variar según las composiciones precisas de las emulsiones y su procedimiento de preparación:

- 5 - índice de polidispersidad: de 0,2 a 0,3
- $[Gd^{3+}]$  = de 2 a 10 mM, preferiblemente de 3 a 7 mM
- concentración de partículas: de 50 a 100 nM
- $r1$  ( $mM^{-1}S^{-1}Gd^{-1}$ ): de 5 a 40, preferiblemente de 10 a 40
- $r2$  ( $mM^{-1}S^{-1}Gd^{-1}$ ): de 20 a 40
- 10 -  $r1$  ( $mM^{-1}S^{-1}$  partícula<sup>-1</sup>): de  $10^6$  a  $4 \times 10^6$
- número de biovectores: 50 a 10000, particularmente 1000 a 5000, ventajosamente 1500 a 2500.

Globalmente, el solicitante ha conseguido obtener nuevas nanoemulsiones para RM

- 15 - lo suficientemente estables químicamente como para ser producidas y conservadas con una larga duración (de varios meses a varios años), en particular sin problemas de coalescencia entre las propias gotitas lipídicas
- lo suficientemente estables *in vivo* para no ser degradadas
- adaptadas según el plan de la farmacocinética
- 20 - lo suficientemente eficaces en términos de señales para la obtención de imágenes clínicas (de RM en particular) del paciente
- capaces de incorporar los ligandos de identificación de zonas biológicas en la superficie de las nanogotitas, en una cantidad apropiada y sin una pérdida de afinidad que interfiera con su objetivo biológico.

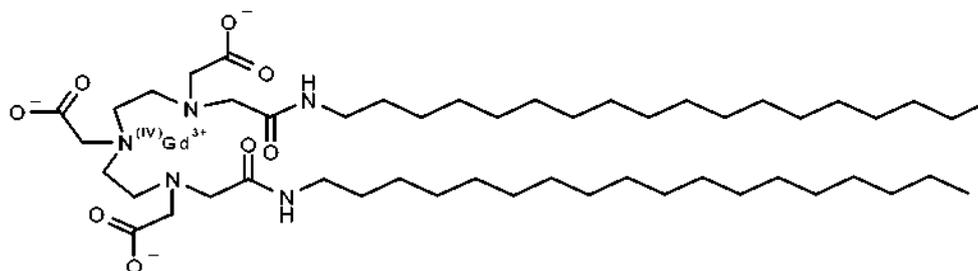
La invención concierne también a:

- 25 - un producto de contraste, preferiblemente para RM, que comprende las formulaciones de las nanoemulsiones de la solicitud
- las nanoemulsiones del solicitante para su utilización en el diagnóstico, particularmente de enfermedades cancerosas, inflamatorias, neurodegenerativas, cardiovasculares.

30 El solicitante ha estudiado además los procedimientos destinados a la recuperación de los lantánidos, por razones de coste y de conservación del medio ambiente, durante la síntesis de los agentes de contraste, y particularmente de las emulsiones de lantánidos, como ya se hace para los productos de contraste yodados. Por ejemplo, para los productos de contraste yodados, existen procedimientos de recuperación del yodo, es decir, mediante una oxidación catalítica (en presencia de cobre, particularmente, y a una temperatura de, por ejemplo, 150 °C), es decir, mediante una oxidación térmica con una combustión de los efluentes de la fabricación de los productos yodados. Por ejemplo, la oxidación térmica se lleva a cabo mediante una incineración, los efluentes, previamente mezclados o no mezclados con una solución de un metal alcalino, son inyectados en contacto con una llama a más de 800 °C de un incinerador, pudiendo inyectarse de manera opcional una solución de un metal alcalino igualmente en contacto con la llama, los humos procedentes de la incineración de dichos efluentes son a continuación absorbidos/pasados a través de una solución acuosa, ventajosamente de sosa, por ejemplo, a aproximadamente 70-90 °C; después de una eventual refrigeración, la solución obtenida contiene típicamente iones yoduro y eventualmente cloruros y sulfatos, se añade un agente oxidante, agua oxigenada, por ejemplo, en medio ácido, por ejemplo, a un pH inferior a 1 o 2, y a una temperatura preferiblemente de entre 10 y 40 °C, particularmente de aproximadamente 20 °C. El yodo de la solución obtenida después de la oxidación se recupera a continuación mediante diferentes tipos de tratamiento posibles, por ejemplo, un tratamiento mecánico (decantación, absorción sobre soportes, precipitación, filtración...) o un tratamiento químico de conversión en compuestos yodados valiosos. De una forma análoga, los procedimientos de recuperación son interesantes para la recuperación del gadolinio a partir de los efluentes gadolinados procedentes de la síntesis de los productos de contraste gadolinados, utilizando, por ejemplo, unos tratamientos ácidos adaptados y/o unas resinas dedicadas.

La invención se ilustra con la ayuda de los ejemplos que siguen.

55 Ejemplo 1: síntesis de un derivado del DTPA lipófilo



## Etapa 1:

5 Se ponen en suspensión 6 g de anhídrido de DTPA bis en 240 ml de DMF. La suspensión se calienta a 50 °C y pasa a una solución. Se añade octadecilamina de una vez. La reacción se mantiene 1 noche a 50 °C. El medio de reacción se enfría y después se filtra a través de vidrio sinterizado. El precipitado se lava una vez con DMF y después abundantemente con metanol. Se obtienen 13.5 g de un polvo de color amarillo blanquecino con un rendimiento (Rdt) del 90 %. El análisis de la espectrometría de masas se lleva a cabo mediante la infusión de la muestra en ES+.

10  $C_{50}H_{97}N_5O_8$ ; m/z (ES+) = 896

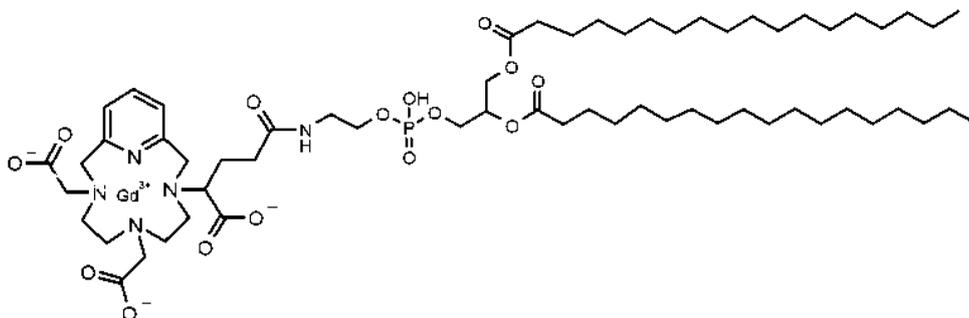
## Etapa 2:

15 Se ponen en suspensión 13.4 g de ligando (Int 3) en 600 ml de metanol. Se añaden 6.67 g de  $GdCl_3 \cdot 6 H_2O$ . Instantáneamente se produce una solubilización. El pH de la solución se ajusta a 7 con la ayuda de una solución de metanolato de sodio en metanol (2.68 g de  $CH_3ONa$  en 400 ml de  $CH_3OH$ ). La solución se lleva a reflujo durante 45 min. El metanol se evapora y el residuo se recoge con agua. El polvo se lava abundantemente con agua. Se obtienen 15 g de producto en bruto con un rendimiento del 96 %. El producto se purifica mediante una cromatografía ultrarrápida en gel de sílice. Se purifican 15 g con una fase eluyente formada por un 90/10 de metanol-diclorometano. Después de la purificación se obtienen 10 g de producto puro (polvo graso de color blanco).

20  $C_{50}H_{94}GdN_5O_8$ ; m/z (ES-) = 1049

Ejemplo 2: síntesis de derivados del PCTA lipófilos

Ejemplo 2.1: DSPE - PCTA



5

Etapas 1:

Se ponen en suspensión 576 mg del Int 1 en 3 ml de DMSO. Se introducen los agentes activadores, 1,1 eq de EDCI, es decir, 219 mg, y 1,1 eq de NHS, es decir, 131 mg. Al cabo de una noche, pasa a una solución (se ha formado el éster).

10

$C_{24}H_{28}GdN_5O_{10}$ ; m/z (ES-) = 703

Etapas 2:

15

Se disuelve la DSPE (1 eq, 711 mg) en un mínimo de de piridina a 90 °C. Una vez solubilizada, la solución se vierte lentamente en la solución de DMSO que contiene el éster activado; la reacción se deja 10 min a 90 °C y después se deja reaccionar dejando disminuir la temperatura durante 1 noche. El medio de reacción se precipita con agua fría y se centrifuga. El sedimento se lava con agua y después se centrifuga de nuevo. El sedimento se recoge en metanol y después se evapora a sequedad. Se obtienen aproximadamente 400 mg del producto en bruto, que a continuación se purifica mediante una cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (cartuchos de 30 g).

20

En un primer momento se utiliza una fase eluyente formada por DCM-MeOH 88-12 con ácido fórmico para eliminar la DSPE residual, después se consigue el producto esperado con la mezcla cuaternaria DCM/MeOH/agua/ácido fórmico a 65/25/4/1.

25

$C_{61}H_{105}GdN_5O_{15}P$ ; m/z (ES-) = 1335

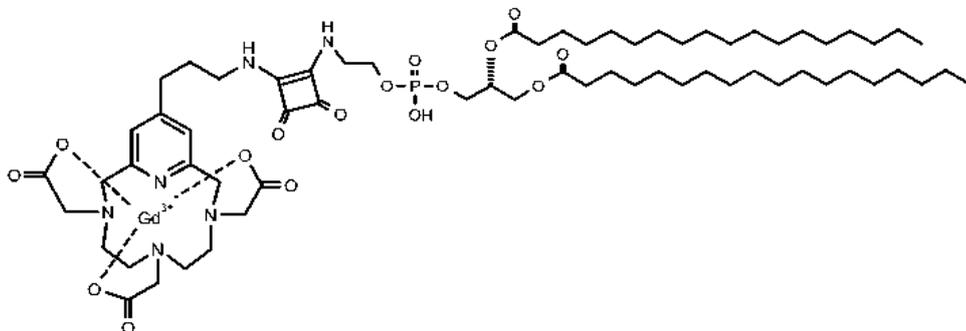
Ejemplo 2.2: otros ejemplos de quelatos del PCTA lipófilos

Ejemplo 19 del documento WO 2006/100305

30

b) Complejo de gadolinio del éster 3-[(2-{3,4-dioxo-2-[3-(3,6,9-tris-carboximetil-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-13-il)-propilamino]-ciclobut-1-enilamino}-etoxi)-hidroxi-fosforiloxi]-2-octadecanoiloxi-propílico del ácido octadecanoico

35



Según el modo operativo de la etapa a) del ejemplo 18 del documento WO 2006/100305, partiendo de 500 mg del compuesto preparado en la etapa a) del ejemplo 12 del documento WO 2006/100305 y 520 mg de DSPE.

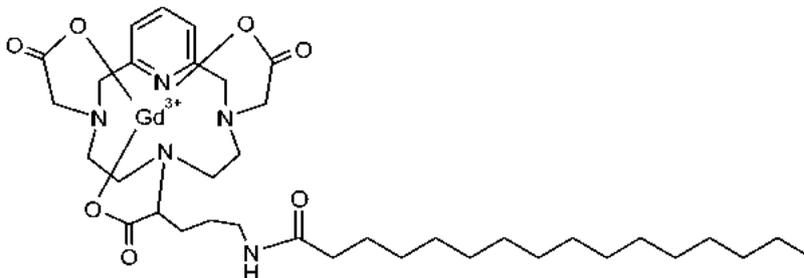
40

m = 350 mg  
m/z: ES- 1417

Ejemplo 20 del documento WO 2006/100305

a) Complejo de gadolinio del ácido 2-(3,9-bis-carboximetil-3,6,9,15-tetraaza-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-6-il)-5-hexadecanoilamino-pentanoico

5



Según el modo operativo de la etapa a) del ejemplo 6 del documento WO 2006/100305 partiendo del compuesto obtenido en la etapa c) del ejemplo 13 del documento WO 2006/100305 (300 mg) y de 150 mg de cloruro del ácido palmítico.

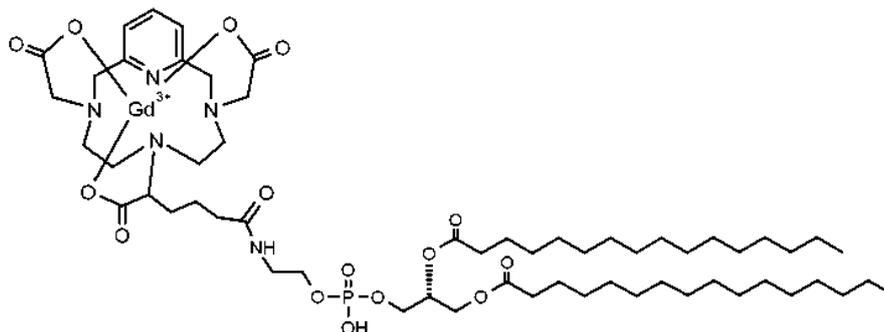
10

m = 230 mg  
m/z: ES- 829

Ejemplo 21 del documento WO 2006/100305

15

a) Complejo de gadolinio del éster 3-({2-[5-(3,9-bis-carboximetil-3,6,9,15-tetraaza-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-6-il)-5-carboxi-pentanoilamino]-etoxi}-hidroxi-fosforiloxi)-2-hexadecanoiloxi-propílico del ácido hexadecanoico



20

Según el modo operativo de la etapa a) del ejemplo 8 del documento WO 2006/100305, partiendo de 100 mg del compuesto preparado en la etapa d) del ejemplo 15 del documento WO 2006/100305 y de 120 mg de DPPE.

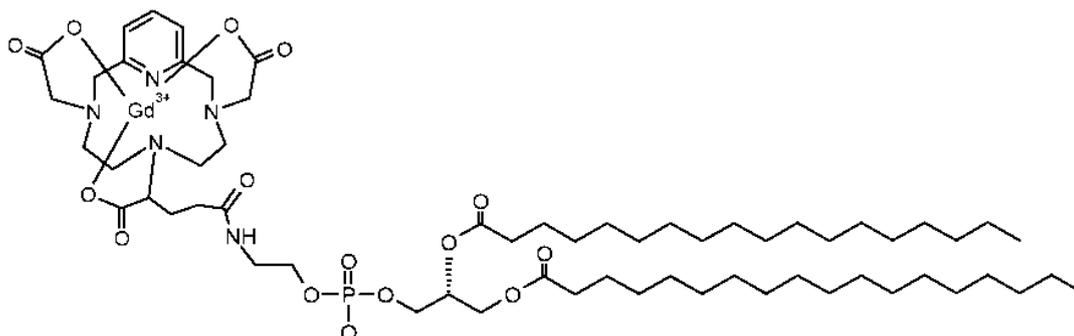
25

m = 80 mg  
m/z: ES- 1293

Ejemplo 5 del documento WO 2006/100305

a) Complejo de gadolinio del éster de ácido 3-({2-[4-(3,9-bis-carboximetil-3,6,9,15-tetraaza-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-6-il)-4-carboxi-butirilamino]-etoxi}-hidroxi-fosforiloxi)-2-octadecanoiloxi-propil octadecanoico

30

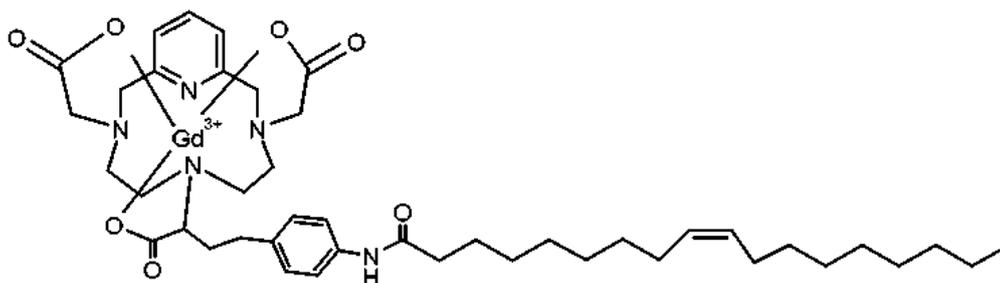


Se disuelven 200 mg del compuesto obtenido en la etapa c) del ejemplo 3 del documento WO 2006/100305 en 10 ml de dimetilformamida. A esta solución se añaden 204 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida y 40 mg de N-hidroxisuccinimida. La mezcla se agita 1 h a la temperatura ambiente y se añade una solución de 250 mg de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE, AVANTI® Polar Lipids, Inc.) en 5 ml de piridina. El medio de reacción se agita 20 h a la temperatura ambiente, después se precipita en 50 ml de etanol. El producto se purifica a continuación sobre gel de sílice.

m = 190 mg.  
m/z: ES- 1335

10 Ejemplo 6 del documento WO 2006/100305

a) Complejo de gadolinio de ácido 2-(3,9-bis-carboximetil-3,6,9,15-tetraaza-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trien-6-il)-4-(4-octadec-9-enoilamino-fenil)-butírico

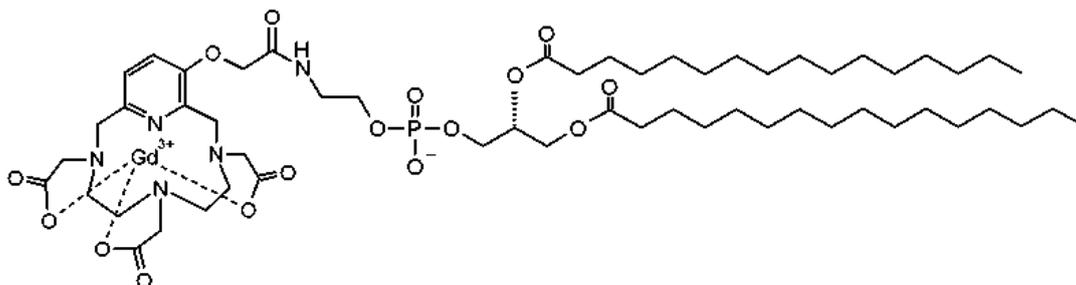


15 Se disuelven 500 mg del compuesto obtenido en la etapa j) del ejemplo 1 del documento WO 2006/100305 en 30 ml de DMSO anhidro. Se añaden 230 mg de trietilamina, después 400 mg de cloruro del ácido oleico (ALDRICH®). La mezcla se agita 6 h a la temperatura ambiente y se precipita con etanol. El producto se purifica a continuación sobre gel de sílice.

m = 300 mg.  
m/z: ES- 917

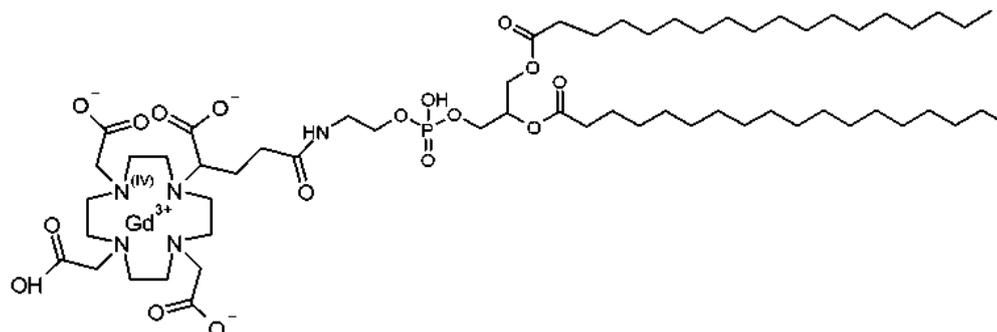
25 Ejemplo 8 del documento WO 2006/100305

a) Complejo de gadolinio del éster 2-hexadecanoiloxi-3-(hidroxi-{2-[2-(3,6,9-tris-carboximetil-3,6,9,15-tetraaza-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien-12-iloxo)-acetilamino]-etoxi}-fosforilo)-propílico del ácido hexadecanoico



30 Ejemplo 3: síntesis de derivados del DOTA lipófilos

Ejemplo 3.1: DOTA-DSPE

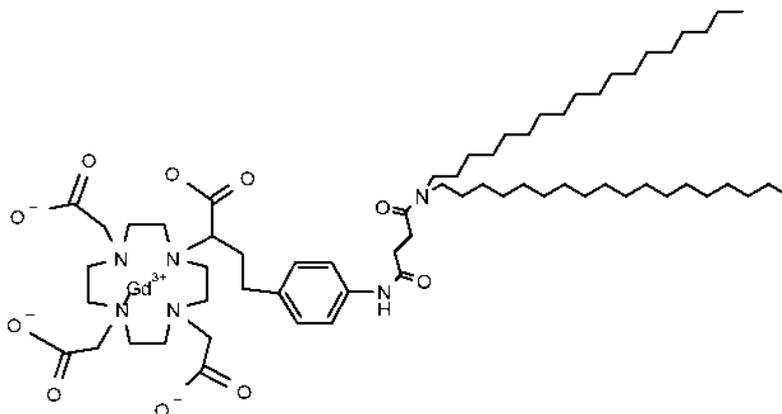


35

Se ponen en solución 200 mg de carboxilato de DOTA-Gd en 1.5 ml de agua. Se añaden 238 mg de 1,2-dioctadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) solubilizada en 70 ml de piridina a 80 °C, así como 85 mg de EDCI y 22 mg de HOBT. El medio de reacción se agita a 40 °C durante 24 h. La piridina se evapora a continuación y el residuo se recoge con etanol, después se filtra.

5  $C_{60}H_{108}GdN_5O_{17}P$ ;  $m/z$  ( $ES^-$ ) = 1358

### Ejemplo 3.2



10 Etapa 1:

Se disuelven 1.043 g de N-dioctadecilamina y 200 mg de anhídrido succínico en 10 ml de piridina. Después de 2 h a 50 °C, el medio de reacción se precipita en 100 ml de agua acidificada; se filtra y se lava con agua acidificada. Después de seca a vacío. Se obtienen 1.12 g de un polvo de color blanco.

15  $C_{40}H_{79}NO_3$ ;  $m/z$  ( $ES^-$ ) = 621

Etapa 2:

El éster activado de NHS se obtiene haciendo reaccionar 300 mg del compuesto obtenido en la etapa 1 en 5 ml de diclorometano con 100 mg de dicitclohexilcarbodiimida y 56 mg de N-hidroxisuccinimida. Después de 30 minutos, el precipitado formado se filtró. El filtrado se introduce en la siguiente etapa sin concretización.

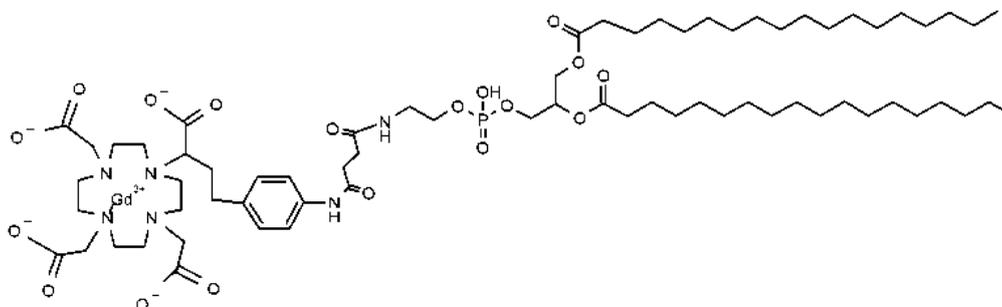
20  $C_{44}H_{82}N_2O_5$ ;  $m/z$  ( $ES^-$ ) = 718

Etapa 3:

El filtrado obtenido en la etapa 2 se añade gota a gota a 360 mg del complejo de gadolinio disuelto en 3 ml de DMSO y 20  $\mu$ l de trietilamina. El medio de reacción se agita 3 horas a la temperatura ambiente. Después de la evaporación del diclorometano, el medio de reacción se precipita con agua, después se filtra. A continuación el precipitado se purifica sobre sílice normal con una elución con una mezcla de diclorometano/metanol. Se obtienen 30 mg del producto.

30  $C_{64}H_{111}GdN_6O_{10}$ ;  $m/z$  ( $ES^-$ ) = 1280,8

Ejemplo 3.3:



35

Etapa 1:

La reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones que la etapa 1 del ejemplo 3.2, sustituyéndose la N-dioctadecilamina por 1.495 g de DSPE.

40  $C_{45}H_{86}NO_{11}P$ ;  $m/z$  ( $ES^-$ ) = 846.6

## Etapa 2:

Idéntica a la etapa 2 del ejemplo 3.2; a partir del compuesto obtenido en la etapa 1, 41 mg de NHS y 73 mg de DCC.  
 $C_{49}H_{89}N_2O_{13}P$ ;  $m/z$  (ES<sup>+</sup>) = 944

5

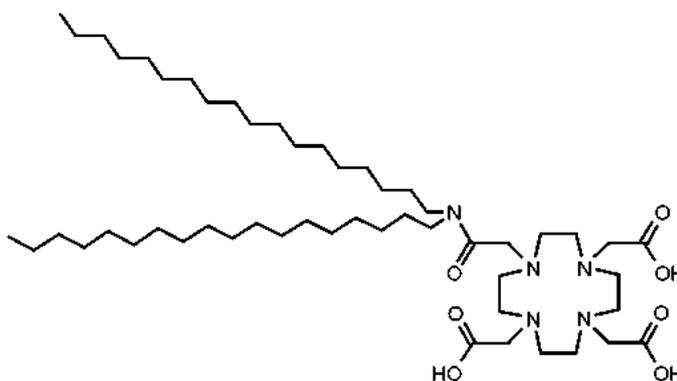
## Etapa 3:

Idéntica a la etapa 2 del ejemplo 3.2.  
 $C_{69}H_{118}GdN_6O_{18}P$ ;  $m/z$  (ES<sup>-</sup>) = 1508

10

Ejemplo 3.4: Ejemplo 33 del documento WO 2010/066815

e) Síntesis del ácido (4,7-bis-carboximetil-10-doctadecilcarbamoilmetil-1,4,7,10tetraaza-ciclodode-1-il)-acético



15

En un globo de 25 ml se disuelven 40 mg del intermedio obtenido en d) del documento WO 2010/066815 (0,037 mmol; 1 eq) en 4 ml de ácido trifluoroacético y 1 ml de  $CH_2Cl_2$  durante 5 h. Después de la evaporación de la mezcla de disolventes, el sólido de color amarillo (32 mg) se precipita en éter dietílico, después se filtra a través de vidrio sinterizado.

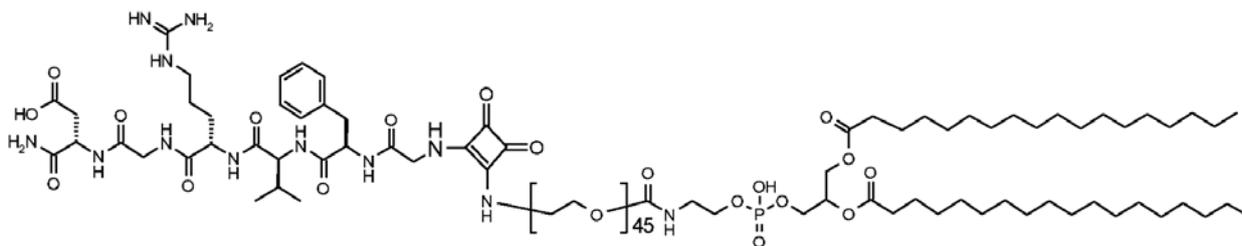
20

$C_{52}H_{101}N_5O_7$ ; MALDI-TOF en modo positivo  $m/z$  908,76

Los siguientes ejemplos ilustran la síntesis de ligandos de identificación anfífilos, con la utilización de ciertos conectores, el experto en la materia sabrá adaptar los protocolos para otros conectores, por ejemplo, alquilo C1-C10, PEG, alquileo C1-C10 - PEG - alquileo C1-C10, escuarato, alquileo-PEG-alquileo.

25

Ejemplo 4: síntesis de un péptido RGD lipófilo (péptido RGD lineal)



30

## Etapa 1

Se disuelven 100 mg (0,15 mmol) del péptido H-Gly-(D)-Phe-(L)-Val-(L)-Arg-Gly-(L)Asp-NH<sub>2</sub> (H-GfVRGD-NH<sub>2</sub>) adquirido en Bachem bajo argón en 3 ml de DMSO secado sobre un tamiz. Se añaden 23  $\mu$ l de 3,4-dietoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (0,15 mmol; 1 eq) y 25  $\mu$ l de trietilamina. El medio de reacción se deja durante una noche a 40 °C antes de ser precipitado en 40 ml de éter dietílico. Después de una filtración se obtienen 98 mg de un polvo de color blanco (rendimiento: 84 %)

35

$C_{34}H_{48}N_{10}O_{11}$ ;  $m/z$  = 773 (ES<sup>+</sup>)

## Etapa 2

Se disuelven 95 mg del intermedio obtenido en la etapa 1 (0,12 mmol; 1 eq) y 430 mg (0,15 mmol, 1,25 eq) de 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000] (sal de amonio) en 3 ml de DMSO secado sobre un tamiz en presencia de 25  $\mu$ l de trietilamina. El medio de reacción se agita 48 h a la temperatura ambiente antes de ser precipitado en 40 ml de éter dietílico. Después de una filtración se obtienen 400 mg de un polvo de

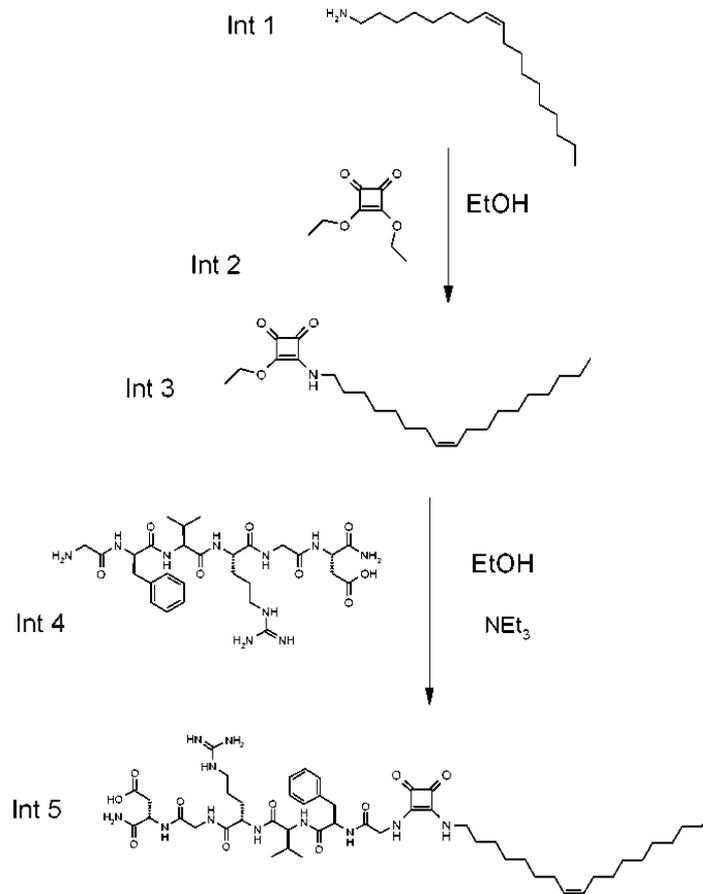
45

color blanco. El producto así obtenido se purifica a continuación en ultrarrápida con un cartucho C4 con un gradiente de formiato de amonio 10 mM a pH 6 / metanol. Se obtienen 260 mg de un polvo de color blanco (rendimiento: 62 %).

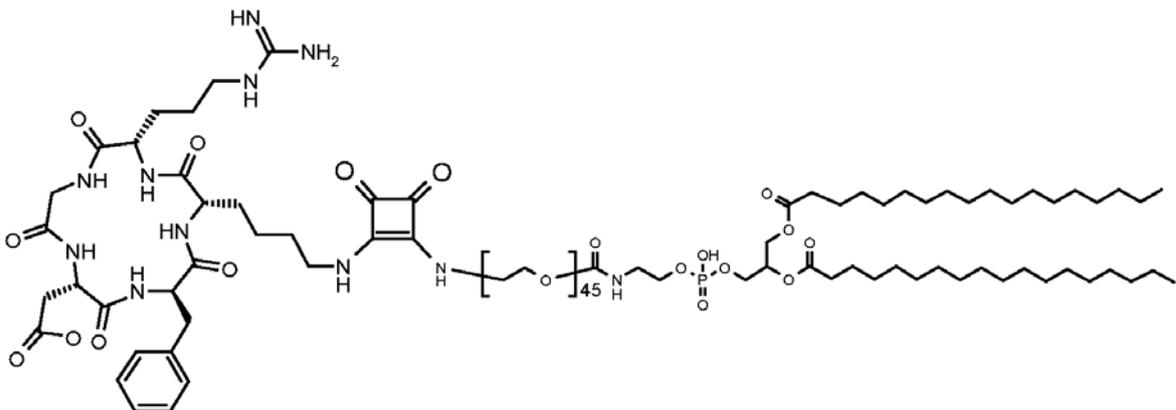
$C_{164}H_{305}N_{12}O_{64}P$ ; MALDI-TOF: modo positivo  $m/z = 3501$

5

Otro ejemplo:



10 Ejemplo 5: síntesis de un péptido lipófilo RGD cíclico

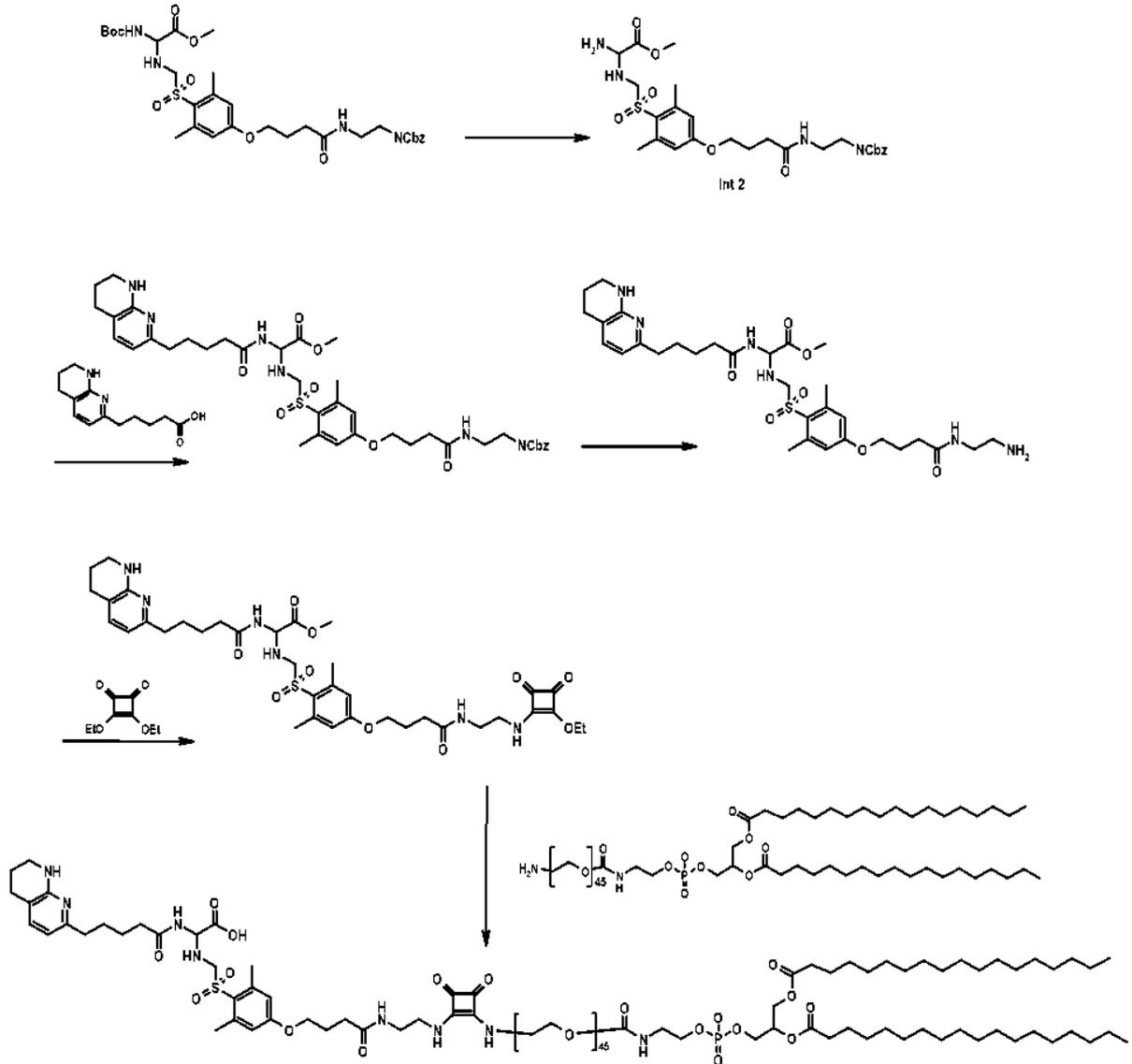


Mismo modo operativo que para el ejemplo 4 partiendo de 90 mg de péptido cíclico RGDfK adquirido en Bachem.  $C_{163}H_{302}N_{11}O_{63}P$ ; MALDI-TOF: Modo positivo  $m/z = 3456$

15

Ejemplo 6: síntesis de un lipófilo con un peptidomimético de RGD; ejemplo de compuesto naftiridina

Esquema de síntesis:



5

Etapa 1:

10 Se disuelve 1 g del int 1 en 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se añaden al medio 5 ml de TFA. Dejar 3 h a la TA, después evaporar a sequedad. Recoger en 2 \* 40 ml de éter iso, recuperar un aceite que se seca mediante evaporación.  
 m<sub>obt</sub> = 0,8 g; Rdt = 90 %; C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S; MALDI-TOF: Modo positivo m/z = 564

Etapa 2:

Reactivos	Cantidades	Disolventes
Int 2	M = 0,564 g (0,001 ml)	DMF V = 10 ml
Int 3	M = 0,235 g (0,00023 ml)	
HOBT	M = 0,131 g	
DIPEA	M = 0,286 g	
EDCI	V = 0,2 ml	
Int. 4		

15

Disolver el ácido en la DMF, después introducir el HOBT y la EDCI y dejar 1 h bajo argón. Añadir el int 2 y la DIPEA; dejar 18 h a la TA bajo argón. Después de una evaporación, el aceite se recoge en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lava con una solución diluida de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; después de una evaporación, obtención de un aceite.  
 $m_{\text{obt}} = 0,600 \text{ g}$ ; Rdt = 77 %; C<sub>39</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>S; M/Z = 780

5

Etapa 3

Reactivos	Cantidades	Disolventes
Int 4	M = 0,6 g (0,0077 ml)	MeOH V = 30 ml
Pd/C al 10 %	1 punta de espátula	
Int. 5		

10

Disolver el int 4 en el metanol e introducir la solución en el autoclave de 125 ml; añadir el catalizador y dejar 3 h bajo presión de hidrogeno (P = 5 bar) a 30 °C.

Después de la filtración del catalizador y de una evaporación, obtención de un aceite que se lava con 50 ml de éter iso.

15

$m_{\text{obt}} = 0,300 \text{ g}$ ; Rdt = 60 %; C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S; HPLC = 90 %; M/Z = 646

Etapa 4:

Reactivos	Cantidades	Disolventes
Int 5	M = 0,300 g (0,000442 ml)	DMSO V = 10 ml
Escuarato de dietilo	M = 0,286 g	
Int. 6		TEA V = 0,25 ml

20

Disolver el int 5 en el DMSO, después añadir el escuarato de dietilo y algunas gotas de TEA; dejar 1 noche a la TA bajo argón. Verter en éter: obtención de una pasta de color blanco.

$m_{\text{obt}} = 0,330 \text{ g}$ ; Rdt = 97 %; C<sub>37</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>S; M/Z = 770

Etapa 5:

Reactivos	Cantidades	Disolventes
Int. 6	M = 0,330 g (0,00043 ml)	DMSO V = 10 ml
DSPE-PEG <sub>2000</sub> -NH <sub>2</sub>	M = 1,07 g (0,000385 ml)	
Solución saturada de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	M = 0,131 g	
Int. 7		

25

Disolver el int 6 y la DSPE-PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> en el DMSO, añadir 3 gotas de una solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 2 ml de H<sub>2</sub>O. El medio de reacción se agita a la temperatura ambiente durante 48 h y se precipita en éter. La pasta obtenida se solubiliza en metanol, después se purifica sobre sílice, eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Después de haber reunido y evaporado las fracciones conformes: obtención de cristales.

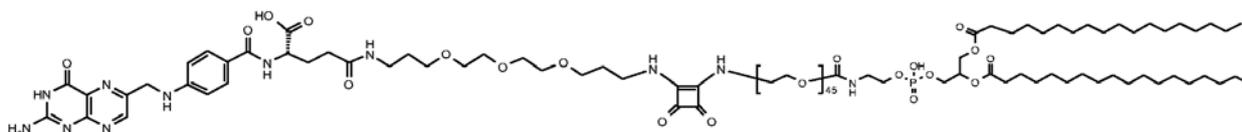
30

Comentario: el producto obtenido está en forma de un ácido por la ruptura del éster de metilo por la presencia del Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

$m_{\text{obt}} = 0,170 \text{ g}$ ; Rdt = 17 %; C<sub>166</sub>H<sub>308</sub>N<sub>9</sub>O<sub>63</sub>PS; M/Z = 3500

35

Ejemplo 7:



40

Etapa 1:

Se ponen en reacción 150 mg del compuesto e) del ejemplo 11 de la solicitud de patente WO 2004/112839 con 35 µl de escuarato de dietilo según el mismo modo operativo que en la etapa 4 del ejemplo 6 de esta patente.

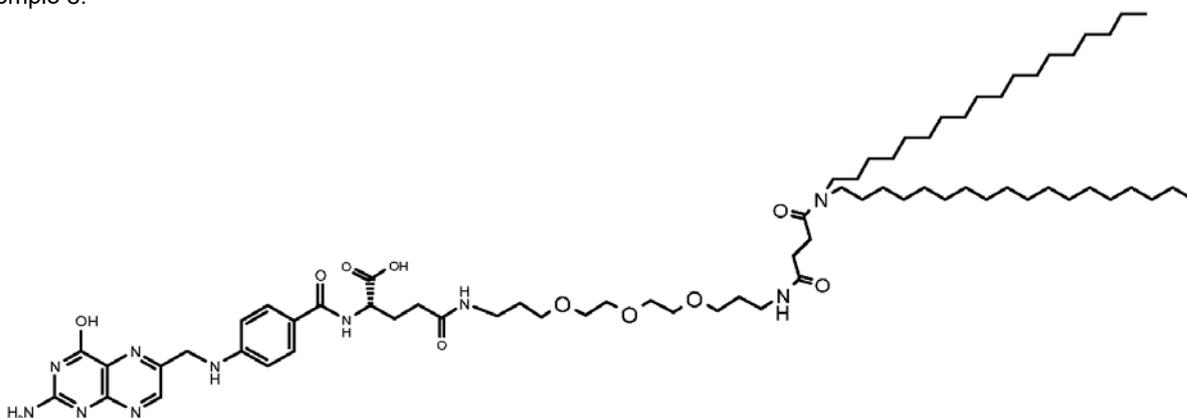
C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>; m/z (ES-) = 766

## Etapa 2:

El compuesto obtenido en la etapa 1 se pone en reacción con 440 mg de DSPE-PEG2000-NH<sub>2</sub> como se describe en la etapa 5 del ejemplo 6.

5 C<sub>165</sub>H<sub>302</sub>N<sub>11</sub>O<sub>64</sub>P; m/z (ES<sup>-</sup>) = 3493

## Ejemplo 8:



10 Se ponen en reacción 0.517 g del compuesto e) del ejemplo 11 de la solicitud de patente WO 2004/112839 con 500 mg del compuesto procedente de la etapa 2 del ejemplo 3.2 en 5 ml de DMSO, 93 mg de NHS y 166 mg de DCC. Después de 24 h a la temperatura ambiente, el medio de reacción se precipita en 50 ml de agua y se filtra. Después de un secado a vacío, se obtienen 515 mg de un polvo de color amarillo.

15 C<sub>69</sub>H<sub>118</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub>; m/z (ES<sup>-</sup>) = 1246

## Ejemplo 9:

## Etapa 1:

20 Se ponen en reacción 200 mg del péptido cíclico 8-amino-3,6-dioxaoctanoilciclo-Cys-Met-Lys(TFA)-Thr-Asp-Thr-Arg-Leu-Cys-COOH sintetizados por Polipéptido en 1 ml de DMSO y 0.23 µl de escuarato de dietilo según el mismo modo operativo que en la etapa 4 del ejemplo 6 de esta patente.

C<sub>55</sub>H<sub>87</sub>F<sub>3</sub>N<sub>14</sub>O<sub>21</sub>S<sub>3</sub>; m/z (ES<sup>-</sup>) = 1432

## 25 Etapa 2:

El compuesto obtenido en la etapa 1 se pone en reacción con 362 mg de DSPE-PEG2000-NH<sub>2</sub> como se describe en la etapa 5 del ejemplo 6.

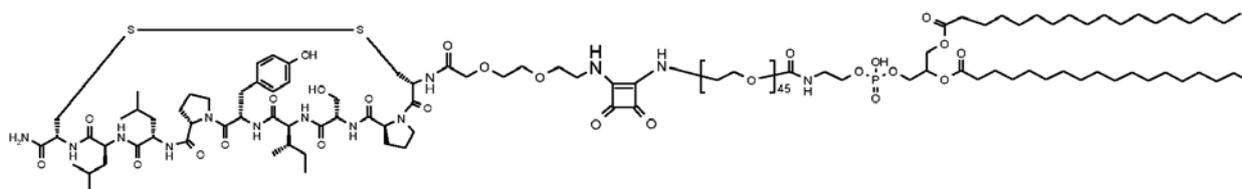
30 C<sub>185</sub>H<sub>344</sub>F<sub>3</sub>N<sub>16</sub>O<sub>74</sub>PS<sub>3</sub>; m/z (ES<sup>-</sup>) = 4160

## Etapa 3:

El compuesto obtenido en la etapa precedente se pone en solución en piperidina 0.2 M en metanol durante 3 horas a 0 °C.

35 C<sub>183</sub>H<sub>345</sub>N<sub>16</sub>O<sub>73</sub>PS<sub>3</sub>; m/z (ES<sup>-</sup>) = 4064

## Ejemplo 10:



40 Etapa 1:

Se ponen en reacción 200 mg del péptido cíclico 8-amino-3,6-dioxaoctanoilciclo-Cys-Pro-Ser-Ile-Tyr-Pro-Leu-Leu-Cys-NH<sub>2</sub> sintetizados por Polipéptido en 1 ml de DMSO y 0.23 µl de escuarato de dietilo según el mismo modo operativo que en la etapa 4 del ejemplo 6 de esta patente.

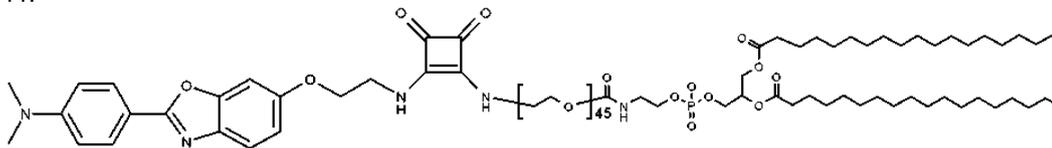
45 C<sub>58</sub>H<sub>87</sub>N<sub>11</sub>O<sub>17</sub>S<sub>2</sub>; m/z (ES<sup>-</sup>) = 1273

## Etapa 2:

El compuesto obtenido en la etapa 1 se pone en reacción con 350 mg de DSPE-PEG2000-NH<sub>2</sub> como se describe en la etapa 5 del ejemplo 6.

5 C<sub>188</sub>H<sub>344</sub>N<sub>13</sub>O<sub>70</sub>PS<sub>2</sub>; m/z (ES<sup>-</sup>) = 4000

## Ejemplo 11:



## 10 Etapa 1:

Se ponen en reacción 100 mg de {4-[6-(2-amino-etoxi)-benzooxazol-2-il]-fenil}-dimetil-amina con 50 µl de escuarato de dietilo según el mismo modo operativo que en la etapa 4 del ejemplo 6 de esta patente.

15 m<sub>obt</sub> = 43 mg; Rdt = 34 %; C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>; m/z (ES<sup>-</sup>) = 421

## 15 Etapa 2:

El compuesto obtenido en la etapa 1 se pone en reacción con 256 mg de DSPE-PEG2000-NH<sub>2</sub> como se describe en la etapa 5 del ejemplo 6.

20 m<sub>obt</sub> = 182 mg; Rdt = 63 %; C<sub>153</sub>H<sub>280</sub>N<sub>5</sub>O<sub>58</sub>P; m/z (ES<sup>-</sup>) = 3148

Ejemplo 12: síntesis de una emulsión que contiene el compuesto del ejemplo 1 y PEG-2000

25 Se disuelven 10 g de Migliol®, 420 mg de Lipoïd S75 (Lipoïd GMBH), 30 mg de DSPE-PEG-2000 (Lipoïd) y 150 mg del compuesto del ejemplo 1 en una mezcla de cloroformo/metanol (90/10). Esto representa un índice del 6 % en masa de tensioactivos totales con respecto a la masa de aceite utilizada.

30 Esta mezcla se pasa por el evaporador rotatorio con el fin de eliminar los disolventes. Se obtiene una fase oleosa perfectamente homogénea. Se añaden 40 ml de agua al 2,5 % m/m de glicerol, después se pre-emulsionan con la ayuda de un Ultraturax. La pre-emulsión se finaliza a continuación con un microfluidificador (Microfluidics M-110-S) en reciclado durante entre 3 y 4 minutos, lo que se corresponde con aproximadamente 25 pases en la célula.

35 El índice en masa de tensioactivos totales con respecto a la solución final es del 1.18 % (0.6/50.6) El pH se controla, después se ajusta a ~ 7. La emulsión se filtra sobre 0,45 µ. Se añade Gentalline a razón de 7 µl/100 ml con el fin de garantizar la conservación.

El diámetro hidrodinámico (Zetasizer de Malvern) de la emulsión obtenida es de 190 nm.

40 Ejemplo 13: síntesis de una emulsión que contiene el compuesto del ejemplo 2

45 Se disuelven 3 g de Migliol® y 180 mg del compuesto del ejemplo 2 en una mezcla de cloroformo / metanol (90/10). Esto representa un índice del 6 % en masa de tensioactivos totales con respecto a la masa de aceite utilizada. Esta mezcla se pasa por el evaporador rotatorio con el fin de eliminar los disolventes. Se obtiene una fase oleosa perfectamente homogénea. Se añaden 27 ml de agua al 2,5 % m/m de glicerol, después se pre-emulsionan con la ayuda de un Ultraturax. La preemulsión se finaliza a continuación con un microfluidificador (Microfluidics M-110-S) en reciclado durante entre 3 y 4 minutos, lo que se corresponde con aproximadamente 25 pases en la célula.

50 El índice en masa de tensioactivos totales con respecto a la solución final es del 0.6 % (0.18/30.18) El pH se controla, después se ajusta a ~ 7. La emulsión se filtra sobre 0,45 µ. Se añade Gentalline a razón de 7 µl/100 ml con el fin de garantizar la conservación.

El diámetro hidrodinámico (Zetasizer de Malvern) de la emulsión obtenida es de 160 nm.

55 Ejemplo 14: síntesis de una emulsión que contiene el compuesto del ejemplo 3 y PEG-5000 (emulsión al 20 % de aceite)

60 Se disuelven 10 g de Migliol®, 420 mg de Lipoïd S75 (Lipoïd GMBH), 30 mg de DSPE-PEG-5000 (Lipoïd) y 150 mg del compuesto del ejemplo 3 en una mezcla de cloroformo/metanol (90/10). Esto representa un índice del 6 % en masa de tensioactivos totales con respecto a la masa de aceite utilizada.

Esta mezcla se pasa por el evaporador rotatorio con el fin de eliminar los disolventes. Se obtiene una fase oleosa perfectamente homogénea.

Se añaden 40 ml de agua al 2,5 % m/m de glicerol, después se pre-emulsionan con la ayuda de un Ultraturax. La pre-emulsión se finaliza a continuación con un microfluidificador (Microfluidics M-110-S) en reciclado durante entre 3 y 4 mn, lo que se corresponde con aproximadamente 25 pases en la célula.

5 El índice en masa de tensioactivos totales con respecto a la solución final es del 1.2 %.(0.6/50.6) El pH se controla, después se ajusta a ~ 7. La emulsión se filtra sobre 0.45  $\mu$ . Se añade Gentalline a razón de 7  $\mu$ l/100 ml con el fin de garantizar la conservación. El diámetro hidrodinámico (Zetasizer de Malvern) de la emulsión obtenida es de 210 nm.

10 Ejemplo 15: síntesis de una emulsión vectorizada de RGD que contiene DSPE-PEG-2000 y el compuesto del ejemplo 1 (emulsión al 20 % de aceite)

15 Se disuelven 10 g de Migliol®, 400 mg de Egg fosfatidilcolina (EPC, Lipoïd GMBH), 110 mg de DSPE-PEG-2000 (Lipoïd), 210 mg del compuesto del ejemplo 1 y 60 mg del compuesto del ejemplo 4 en una mezcla de cloroformo/metanol (90/10). Esto representa un índice del 7.8 % en masa de tensioactivos totales con respecto a la masa de aceite utilizada.

Esta mezcla se pasa por el evaporador rotatorio con el fin de eliminar los disolventes. Se obtiene una fase oleosa (fase lipídica constituida por aceite) perfectamente homogénea.

20 Se añaden 40 ml de agua al 2,5 % m/m de glicerol, después se pre-emulsionan con la ayuda de un Ultraturax. La pre-emulsión se finaliza a continuación con un microfluidificador (Microfluidics M-110-S) en reciclado durante entre 3 y 4 mn, lo que se corresponde con aproximadamente 25 pases en la célula.

25 El índice en masa de tensioactivos totales con respecto a la solución final es del 1.54 %.

El pH se controla, después se ajusta a ~ 7. La emulsión se filtra sobre 0,45  $\mu$ . Se añade Gentalline a razón de 7  $\mu$ l/100 ml con el fin de garantizar la conservación.

30 El diámetro hidrodinámico (Zetasizer de Malvern) de la emulsión obtenida es de 168 nm. Se lleva a cabo un seguimiento del diámetro de la emulsión mediante una difusión dinámica de la luz (Zetasizer de Malvern) durante un año, con una conservación de la emulsión a 4 °C.

El diámetro hidrodinámico a 1 año es de 170 nm.

35 Ejemplo 16: síntesis de una emulsión vectorizada de RGD que contiene el compuesto del ejemplo 1, DSPE-PEG-2000 y rodamina (emulsión al 20 % de aceite)

40 Se disuelven 10 g de Migliol®, 330 mg de Lipoïd S75 (Lipoïd GMBH), 30 mg de DSPE-PEG-2000 (Lipoïd) y 150 mg del compuesto del ejemplo 1, 90 mg del compuesto del ejemplo 4 y 2 mg de DSPE-rodamina en una mezcla de cloroformo / metanol (90/10). Esto representa un índice del 6 % en masa de tensioactivos totales con respecto a la masa de aceite utilizada.

45 Esta mezcla se pasa por el evaporador rotatorio con el fin de eliminar los disolventes. Se obtiene una fase oleosa perfectamente homogénea.

Se añaden 40 ml de agua al 2,5 % m/m de glicerol, después se pre-emulsionan con la ayuda de un Ultraturax. La pre-emulsión se finaliza a continuación con un microfluidificador (Microfluidics M-110-S) en reciclado durante entre 3 y 4 mn, lo que se corresponde con aproximadamente 25 pases en la célula.

50 El índice en masa de tensioactivos totales con respecto a la solución final es del 1.2 %

El pH se controla, después se ajusta a ~ 7. La emulsión se filtra sobre 0.45  $\mu$ . Se añade Gentalline a razón de 7  $\mu$ l/100 ml con el fin de garantizar la conservación.

55 El diámetro hidrodinámico (Zetasizer de Malvern) de la emulsión obtenida es de 206 nm.

Ejemplo 17: síntesis de una emulsión vectorizada de RGD que contiene el compuesto del ejemplo 1, DSPE-PEG-2000 y rodamina.

60 Se disuelven 10 g de Migliol®, 330 mg de Egg fosfatidilcolina (EPC, Lipoïd GMBH), 30 mg de DSPE-PEG-2000 (Lipoïd), 150 mg del compuesto del ejemplo 1, 90 mg del compuesto del ejemplo 5 y 2 mg de DSPE-rodamina en una mezcla cloroformo / metanol (90/10). Esto representa un índice del 6 % en masa de tensioactivos totales con respecto a la masa de aceite utilizada.

65 Esta mezcla se pasa por el evaporador rotatorio con el fin de eliminar los disolventes. Se obtiene una fase oleosa perfectamente homogénea.

Se añaden 40 ml de agua al 2,5 % m/m de glicerol, después se pre-emulsionan con la ayuda de un Ultraturax. La pre-emulsión se finaliza a continuación con un microfluidificador (Microfluidics M-110-S) en reciclado durante entre 3 y 4 mn, lo que se corresponde con aproximadamente 25 pases en la célula.

5 El índice en masa de tensioactivos totales con respecto a la solución final es del 1.2 %.

El pH se controla, después se ajusta a ~ 7. La emulsión se filtra sobre 0,45 µ. Se añade Gentalline a razón de 7 µl/100 ml con el fin de garantizar la conservación.

10 El diámetro hidrodinámico (Zetasizer de Malvern) de la emulsión obtenida es de 206 nm.

Ejemplo 18: mediciones de la relaxividad

Las mediciones de la relaxividad se realizan con Relaxómetros Minispec a 20 y a 60 MHz.

15 La solución madre se diluye en 6 puntos de intervalo en agua milli Q con el fin de poder estudiar la linealidad de las velocidades de relajación en función de la concentración. El intervalo de concentraciones es de entre 0.1 y 2.5 mM de Gd.

20 La medición de la relaxividad se lleva a cabo a 37 °C. La dosificación del Gd se realiza mediante ICP-AES en todos los puntos del intervalo.

Emulsión	20 MHz		60 MHz	
	r1 (mM <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> )	r2 (mM <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> )	r1 (mM <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> )	r2 (mM <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> )
Ejemplo 7	16	19	14	20
Ejemplo 8	39	43	29	52
Ejemplo 9	18	22	16	20
Ejemplo 10	23	25	24	35
Ejemplo 12	27	28	24	34

Ejemplo 19: pruebas de toxicidad de la emulsión del ejemplo 10

25 Prueba *in vivo*:

Con ratones « swiss » de aproximadamente 25 g: inyección IV caudal despierto manual a 2 ml/min en isovolumen (200 µl/animal, es decir, 6,67ml/kg).

30 A las 24 h: anestesia con isoflurano, toma de muestra sublingual para el análisis hematológico con el autómata MS4, después exsanguinación con una jeringa + agujas heparinizadas.

Sintomatología: no se constata mortalidad ni signos clínicos perjudiciales a la dosis y en los plazos probados.

35 Hematología: análisis hematológico normal.

Evolución del peso de los ratones después de la inyección: no hay ninguna variación ponderal significativa.

40 Prueba *in vitro*: prueba de MTT en L929 a las 24 h.

La CEL50 es superior a la dosis probada, que es de 3 mM de Gd.

Ejemplo 20: medición de la IC50

45 La medición de la IC50 de las emulsiones se lleva a cabo con células HUVEC que sobreexpresan  $\alpha v \beta 3$  mediante mediciones de competición con Equistatina<sup>125I</sup>.

50 La suspensión de las HUVEC se distribuye en una placa de 96 pocillos de fondo cónico, a razón de  $2 \times 10^5$  células en 50 µl en tampón de *binding*. Se añaden cincuenta µl de las soluciones de concentración creciente de equistatina o de los productos RGD por pocillo. El control positivo se realiza mediante la adición de tampón de *binding* sin competidor. El conjunto de los puntos de concentración se realiza por duplicado. La placa se incuba 2 h a la temperatura ambiente con agitación. Después se distribuyen cincuenta µl de la solución de equistatina-<sup>125I</sup>-SIB 3 nM en cada uno de los pocillos y la placa se incuba de nuevo 2 h a la temperatura ambiente con agitación. Las mezclas de reacción se transfieren a unas ampollas que contienen 200 µl de un cojín de densidad compuesto por parafina y ftalato de dibutilo (10/90). Los microtubos se centrifugan a continuación a 12.000 rpm durante 3 min. Los tubos se

## ES 2 654 993 T3

congelan finalmente en nitrógeno líquido, después se seccionan con el fin de contar el sedimento celular y el sobrenadante con un contador gamma. Entonces se traza una curva de competición en la que la fijación relativa de la equistatina <sup>125</sup>I-SIB se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Fijación relativa de equistatina-}I^{125}\text{-SIB} = \frac{\text{Radioactividad fijada en presencia del competidor (cpm)}}{\text{Radioactividad de la muestra de control (cpm)}} \times 100$$

5 Los datos son analizados con la ayuda del programa informático GraphPad Prism® 5.0, que determina los valores de la IC<sub>50</sub> para cada producto a partir de la curva de competición.

Compuesto	IC50 (nM del ligando de identificación)	IC50 (nM de la emulsión)
Ejemplo 4	300	
Ejemplo 5	1	
Ejemplo 6	0,4	
Ejemplo 10	4.500	2
Ejemplo 11	13.500	2,1

10

## REIVINDICACIONES

1. Composición de nanoemulsión de aceite en agua para RM, que comprende:

- 5 - una fase acuosa, que representa del 70 al 90 % en peso de la composición, ventajosamente del 75 al 85 %, más ventajosamente del 78 al 82 %  
 - una fase lipídica que comprende un aceite, que representa del 9.5 al 29.5 % en peso de la composición, ventajosamente del 14 al 25 %, más ventajosamente del 17 al 21 %,
 10 - un tensioactivo en la interfase entre las fases acuosa y lipídica, comprendiendo el tensioactivo al menos un quelato de un metal paramagnético anfífilico, al menos un ligando de identificación anfífilico y eventualmente un lípido anfífilico;  
 - estando comprendido el contenido total en tensioactivo en peso con respecto al aceite entre el 4 y el 10 %, ventajosamente entre el 5 y el 8 %;  
 - estando comprendido el contenido total en tensioactivo en peso con respecto a la composición entre el 0.35 y el 15 2.95 %, ventajosamente entre el 0.5 y el 2 %;  
 - comprendiendo el aceite al menos el 70 %, ventajosamente al menos el 80 %, de forma ventajosa al menos el 95 % en peso, particularmente al menos el 97 %, de ácidos grasos saturados C6-C18, ventajosamente C6-C14, más ventajosamente C6-C10.

20 2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el ligando de identificación anfífilico comprendido en el tensioactivo representa del 0,01 al 10 % en peso del total de tensioactivo, ventajosamente del 0.05 al 5 %, particularmente del 0.05 al 1 %.

25 3. Composición según la reivindicación 1 o 2, **caracterizada por que** el tensioactivo representa del 5 al 8 % en peso del aceite.

4. Composición según la reivindicación 1 a 3, **caracterizada por que** los ácidos grasos saturados se encuentran en forma de triglicéridos de ácidos grasos saturados.

30 5. Composición según la reivindicación 1 a 3, **caracterizada por que** el aceite comprende ácidos grasos saturados en las siguientes proporciones:

- 35 - C6-C18 > 70 %, ventajosamente > 80 %, más ventajosamente > 95 %, aún más ventajosamente > 98 %  
 - o C6-C14 > 70 %, ventajosamente > 80 %, más ventajosamente > 95 %, aún más ventajosamente > 98 %  
 - o C8+C10 > 70 %, ventajosamente > 80 %, más ventajosamente > 95 %, aún más ventajosamente > 98 %.

6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** el tensioactivo comprende:

- 40 - del 50 al 95 % en peso del lípido anfífilico,  
 - del 5 al 50 % en peso del quelato del metal paramagnético anfífilico, ventajosamente del 5 al 30 % en peso, y dado el caso  
 - del 0.05 al 5 % en peso de un ligando de identificación anfífilico.

45 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** el tensioactivo comprende del 95 al 99.95 % del quelato del metal paramagnético anfífilico y del 0.05 al 5 % de un ligando de identificación anfífilico.

50 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada por que** el quelato del metal paramagnético anfífilico es un quelato macrocíclico elegido entre: DOTA, DO3A, HPDO3, BTDO3A, PCTA, DOTAM, DOTMA, DOTA-GA, AAZTA, HOPO, así como sus multímeros y sus derivados.

55 9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada por que** el ligando de identificación es un biovector elegido entre: los péptidos (ventajosamente de menos de 20 aminoácidos, más ventajosamente de entre 5 y 10 aminoácidos), los pseudopéptidos, los peptidomiméticos, los aminoácidos, los agentes de identificación de integrinas, las glicoproteínas, las lectinas, la biotina, los derivados pteróicos o aminopteróicos, los derivados del ácido fólico y antifólico, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, la avidina, los esteroides, los oligonucleótidos, las secuencias de ácido ribonucleico, las secuencias de ácido desoxirribonucleico, las hormonas, las proteínas eventualmente recombinantes o mutadas, los mono o polisacáridos,  
 60 los compuestos con un esqueleto de benzotiazol, de benzofurano, de estirilbenzoxazol / tiazol / imidazol / quinolina, de estirilpiridina.

65 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 **caracterizada por que** el lípido anfífilico es un fosfolípido, elegido ventajosamente entre la fosfatidilcolina la dioleilfosfatidilcolina, la dimiristoilfosfatidilcolina, la dipalmitoilfosfatidilcolina, la diestearoilfosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la esfingomielina, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, la lecitina.

11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 **caracterizada por que** el ligando de identificación anfífilico tiene la fórmula Bio - L - Lipo, en la que:

- Bio es la parte de reconocimiento biológico localizada en la superficie externa de las nanogotitas
- Lipo es un grupo lipófilo que permite la inserción del biovector en el seno de la capa de tensioactivo
- L es un grupo de unión que une Bio y Lipo, elegido ventajosamente entre:

- nada o un enlace simple, alquileo C1-6, PEG, por ejemplo, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-CH<sub>2</sub> con k = de 1 a 10, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-CO- con n = de 2 a 10, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-CO-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NH-CO- con q = 1-10 y r = 2-10, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-PEG, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-HOOC-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-COOH; HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH; HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH; HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH; NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, con n = 0-20; NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO<sub>2</sub>H; NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>-O- CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO<sub>2</sub>H con n = de 1 a 10,
- P1-1-P2, idénticos o diferentes, eligiéndose P1 y P2 entre O, S, NH, nada, CO<sub>2</sub>, NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH, SO<sub>2</sub>NH-, NHSO<sub>2</sub>-, escuarato

con 1 = alquilo, alcoxialquilo, polialcoxialquilo (PEG), alquilo interrumpido por uno o varios escuaratos o por uno o varios arilos, ventajosamente fenilos, alquenoilo, alquinilo, alquilo interrumpidos por uno o varios grupos elegidos entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, -(CO)NH-, -O(CO)- o -(OC)O-.

12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada por que** el tensioactivo comprende además un agente de furtividad anfífilico, ventajosamente un derivado de PEG, un derivado gangliósido, un polisacárido.

13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizada por que** el metal paramagnético del quelato del metal paramagnético anfífilico se elige entre: manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, molibdeno, rutenio, cerio, praseodimio, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio e iterbio; ventajosamente entre Gd (III), Mn (II), europio y disprosio.

14. Procedimiento de preparación de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las etapas:

- preparación de una fase lipídica que comprende

- o eventualmente un primer tensioactivo lípido anfífilico
- o un aceite que comprende al menos el 70 % en peso, ventajosamente al menos el 80 %, más ventajosamente al menos el 95 % de ácidos grasos saturados C6-C18, ventajosamente C6-C14, más ventajosamente C6-C10
- o un quelato de un metal paramagnético anfífilico
- o un ligando de identificación anfífilico

- dispersión de la fase lipídica en una solución acuosa, de forma que se forme una nanoemulsión de aceite en agua
- recuperación de la composición de nanoemulsión obtenida.

15. Composición según la reivindicación 1 a 13, para su utilización en el diagnóstico, ventajosamente de enfermedades cancerosas, inflamatorias, neurodegenerativas y/o cardiovasculares.