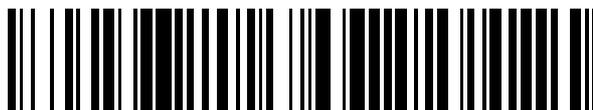


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 925**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2011 PCT/JP2011/072431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12073588**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011 E 11845744 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2647391**

54 Título: **Agente de contraste para IRM que contiene partículas de material compuesto**

30 Prioridad:

02.12.2010 JP 2010269386

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

04.06.2018

73 Titular/es:

**KANEKA CORPORATION (100.0%)
3-18, Nakanoshima 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8288, JP**

72 Inventor/es:

**TAGO, YOSHIYUKI;
YOSHIDA, SHINICHI;
OHNO, KOHJI;
TSUJII, YOSHINOBU y
TABATA, YASUHIKO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 670 925 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

Agente de contraste para IRM que contiene partículas de material compuesto

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente de contraste para IRM que contiene partículas de material compuesto.

Antecedentes de la técnica

10

En el método IRM (método de captación de imágenes por resonancia magnética), que es uno de los métodos diagnósticos de captación de imágenes in vivo, a menudo se usan agentes de contraste para captar imágenes de tejidos específicos más claramente. Los agentes de contraste son agentes farmacéuticos para usar en los reconocimientos, para mejorar el contraste de imagen entre un tejido normal y un tejido objetivo en la diagnosis, y se usan habitualmente mediante inyección intravenosa. Para los agentes de contraste para IRM, se usan generalmente materiales magnéticos que afectan la resonancia magnética nuclear y, por ejemplo, las preparaciones de gadolinio y preparaciones de hierro están disponibles comercialmente.

15

20

Cuando se comparan con las preparaciones de gadolinio, las preparaciones de hierro tienen las ventajas de ser excelentes en seguridad biológica y producir excelentes efectos de captación de imagen a bajas dosis.

25

Generalmente, sin embargo, las preparaciones de hierro convencionales son tomadas por el tejido hepático normal en sólo unos minutos después de administración intravenosa, pero no son tomadas por regiones tumorales en el hígado en absoluto. Por lo tanto, como agentes de contraste para IRM, pueden usarse solamente para captación de imágenes negativas de tumores hepáticos. Por otra parte, aunque las preparaciones de hierro con una alta estabilidad en la sangre y baja acumulación en el hígado también se han desarrollado clínicamente (por ejemplo, documento de patente 1), han mostrado ser fagocitadas principalmente por macrófagos, y tener una alta acumulación en los ganglios linfáticos, y por lo tanto no son diferentes en términos de una tendencia a ser tomados por el sistema reticuloendotelial. De este modo, las preparaciones de gadolinio y las preparaciones de hierro convencionales tienen problemas en farmacocinética cuando se administran a cuerpos biológicos.

30

35

Como ejemplo de los métodos en los que se ha mejorado la farmacocinética después de administración a un cuerpo biológico, se ha propuesto un método para revestir las superficies de nanopartículas de núcleo inorgánico con polímeros con, por ejemplo, grupos de silano (por ejemplo, documento de patente 2).

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

40

Documento de patente 1: WO 2006/068653

Documento de patente 2: publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar nº 2009-519316.

45

Biomacromoléculas, vol. 10, nº 9, 14 de septiembre de 2009, págs. 2662-2671, XP55275164 describe nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas con cadenas injertadas de polímero unidas a las superficies de las partículas a una densidad muy alta para una estabilización estérica.

Descripción de la invención

50

Problema que ha de resolver la invención

Sin embargo, tales preparaciones convencionales tienen poca estabilidad de dispersión y tienden a ser fagocitadas por macrófagos, lo que han sido problemas. Por lo tanto, los inventores de la presente invención tienen por objetivo proporcionar un agente de contraste para IRM que tenga una alta estabilidad de dispersión y funciones mejoradas, y que tienda a no ser fagocitarlo por macrófagos.

55

Medios para resolver el problema

60

La presente invención es un agente de contraste para IRM que contiene partículas de material compuesto, en el que las partículas de material compuesto son aquellas con cadenas injertadas de polímero unidas a las superficies de micropartículas a una densidad muy alta, suficiente para permitir que se produzca una repulsión estérica entre las cadenas injertadas, las micropartículas son micropartículas inorgánicas que muestran superparamagnetismo, y las cadenas injertadas de polímero tienen un peso molecular promedio en número (Mn) de 30.000 a 320.000, una densidad de injerto de 0,15 a 0,45 cadenas/nm², y una distribución de pesos moleculares de 1 a 1,5.

Efectos de la invención

Las partículas de material compuesto conforme a la presente invención a las que están unidas las cadenas de injertadas de alto peso molecular a una muy alta densidad, mediante polimerización por radicales libres, tienen una alta estabilidad de dispersión y tienden a no ser fagocitadas por células reticuloendoteliales, y por tanto, tienden a no acumularse en tejidos tales como hígado y bazo. Además, las partículas de material compuesto mencionadas anteriormente se acumulan en tumores debido al efecto de retención y permeabilidad aumentada (efecto EPR). Además, tienen un alto nivel de relajación y por lo tanto pueden mostrar un efecto de captación de imágenes (contraste) incluso a una concentración inferior. El desarrollo de tal agente de contraste para IRM de altas prestaciones, permite una captación de imágenes diagnóstica de alta precisión y puede contribuir al desarrollo de tratamientos médicos avanzados.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es una fotografía de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de partículas de material compuesto (tabla 1, serie 6) de un agente de contraste para IRM.

[Figura 2] La figura 2 es una imagen fantasma de IRM para medir el nivel de relajación de las partículas de material compuesto (tabla 1, serie 6) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 3] La figura 3 es una imagen de diluciones de 100 veces de partículas de material compuesto (tabla 1, series de 3 a 5 y 8) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención, que se tomó después de almacenarlas a temperatura ambiente durante seis meses.

[Figura 4] La figura 4 es una gráfica que muestra la fagocitosis por macrófagos de las partículas de material compuesto (tabla 1, series de 1 a 13) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 5^a] La figura 5A es una imagen histopatológica del hígado de un ratón, al que se administraron partículas de material compuesto (tabla 1, serie 5) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 5B] La figura 5B es una imagen histopatológica del hígado de un ratón, al que se administraron partículas de material compuesto (tabla 1, serie 8) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 6] La figura 6 es una gráfica que muestra los porcentajes de partículas de material compuesto que permanecen en la sangre de los ratones, a los que se administraron las partículas de material compuesto (tabla 1, series 6 y 9) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 7^a] La figura 7A es una gráfica que muestra los tantos por ciento de acumulación en tejidos de ratones, a los que se administraron las partículas de material compuesto (tabla 1, series 6 y 9) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 7B] La figura 7B es una gráfica que muestra los tantos por ciento de acumulación en tejidos por peso de ratones, a los que se administraron las partículas de material compuesto (tabla 1, series 6 y 9) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 8^a] La figura 8A es una imagen que muestra la posición de un tumor en la región femoral izquierda de un ratón con tumores, al que se administran las partículas de material compuesto (tabla 1, serie 6) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 8B] La figura 8B es una imagen de contraste por IRM de un tumor de ratón antes de la administración de las partículas de compuesto (tabla 1, serie 6) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

[Figura 8C] La figura 8C es una imagen de contraste por IRM de un tumor de ratón tomada 24 horas después de la administración de las partículas de material compuesto (tabla 1, serie 6) del agente de contraste para IRM conforme a la presente invención.

Descripción de la invención

Los inventores de la presente invención encontraron que las partículas de material compuesto con cadenas injertadas de polímero de un peso molecular predeterminado unidas a las superficies de micropartículas a una densidad muy alta, suficiente para permitir que se produzca una repulsión estérica entre las cadenas injertadas, fueron excelentes en estabilidad de dispersión en condiciones fisiológicas durante un periodo prolongado. Basados en este hallazgo, los inventores de la presente invención solucionaron los problemas mencionados anteriormente. Como se ha descrito anteriormente, con la excelente estabilidad de dispersión, el agente de contraste para IRM de la presente invención tiene las ventajas de (a) una manipulación fácil, (b) proporcionar un efecto farmacológico estable, y (c) una seguridad mejorada. Generalmente, ya que el agente de contraste para IRM se prepara en el ámbito médico inmediatamente antes de administrarse a un paciente, el agente de contraste para IRM de la presente invención que es fácil de manipular, puede reducir el tiempo entre la preparación y la administración, y por lo tanto es ventajoso particularmente para el personal médico. Además, ya que los agentes de contraste con partículas de material compuesto que tienden a agregarse (es decir, con baja estabilidad de dispersión) son reconocidas como cuerpos extraños en la sangre y son entonces metabolizadas y excretadas, el efecto farmacológico se reduce, y por lo tanto es difícil obtener un efecto de captación de imágenes suficientemente alto. Por lo tanto, el agente de contraste para IRM de la presente invención con la excelente estabilidad de dispersión permite que el efecto farmacológico sea estable. Además, existe la posibilidad de que los agentes de contraste con

las partículas de material compuesto que tienden a agregarse (es decir, con baja estabilidad de dispersión) puedan formar un trombo en la sangre, y por lo tanto pueden tener una menor seguridad, mientras que el agente de contraste para IRM de la presente invención tiene una alta estabilidad de dispersión y por lo tanto tal posibilidad es baja, lo que da como resultado una seguridad mejorada.

En la presente memoria descriptiva, la frase "las partículas de material compuesto con excelente estabilidad de dispersión" denota el estado en el que no se observan agregados y sedimentos evidentes macroscópicamente en un disolvente convencional. Además, la frase "partículas de material compuesto son excelentes en estabilidad de dispersión durante un periodo prolongado" denota el estado en el que no se observan agregados y sedimentos evidentes macroscópicamente, cuando las partículas de material compuesto se almacenan en un disolvente en condiciones normales de almacenamiento durante unos pocos meses. En este contexto, las condiciones normales de almacenamiento denotan condiciones que incluyen una temperatura alrededor de 18 a 30°C y una humedad relativa de aproximadamente 60% o inferior. Preferiblemente, el disolvente convencional es un disolvente acuoso tal como una disolución salina normal que se usa generalmente para preparaciones farmacéuticas.

Generalmente, cuando las partículas de material compuesto tienen pesos moleculares de cadena injertada más altos, la densidad de las cadenas injertadas en el extremo de la cadena disminuye cuando se compara con la vecindad en la que las cadenas injertadas están unidas a las micropartículas. Por lo tanto, se espera que tiendan a ser fagocitadas por células reticuloendoteliales. Contrariamente a esta expectativa, sin embargo, las partículas de material compuesto contenidas en el agente de contraste para IRM de la presente invención muestran características de tender a no ser fagocitadas por células reticuloendoteliales. La expresión "sistema reticuloendotelial" usada en la presente invención es una expresión genérica para células que están implicadas en la defensa biológica fagocitando cuerpos extraños, y ejemplos típicos de éstas incluyen macrófagos.

Tales partículas de material compuesto hacen posible proporcionar un agente de contraste para IRM que está caracterizado por acumularse en un tejido tumoral a través de un sistema circulatorio sanguíneo y además, que está caracterizado por depender de las condiciones patológicas en el tejido tumoral y mostrar la distribución del grado de acumulación que varía en el tejido tumoral. La demostración de la acumulación en el tejido tumoral puede confirmarse por el hecho que en una imagen de IRM, cuando se compara con el animal de ensayo antes de administrar el agente de contraste para IRM de la presente invención, el contraste mejora en la parte que corresponde al tejido tumoral del animal de ensayo después de la administración.

Esto es, como se ha descrito anteriormente, la presente invención es un agente de contraste para IRM que contiene partículas de material compuesto, en el que las partículas de material compuesto son aquellas con cadenas injertadas de polímero unidas a superficies de micropartículas a una muy alta densidad, suficiente para permitir que se produzca una repulsión estérica entre las cadenas injertadas, las micropartículas son micropartículas inorgánicas que muestran superparamagnetismo, y las cadenas injertadas de polímero tienen un peso molecular promedio en número (Mn) de 30.000 a 320.000, una densidad de injerto de 0,15 a 0,45 cadenas/nm², y una distribución de pesos moleculares de 1 a 1,5.

En la presente invención, el "agente de contraste para IRM" es una sustancia (agente) que se administra en un método diagnóstico de captación de imágenes in vivo que usa un sistema de IRM (captación de imágenes por resonancia magnética) que se usa en la práctica clínica. Cuando la sustancia está presente en el objeto que ha de someterse a determinación por IRM, de qué manera se ve el objeto a determinar en la imagen de determinación parece haber cambiado significativamente cuando se compara con el caso de ausencia de la sustancia. De este modo, se puede dar contraste a la imagen.

En la presente invención, la expresión "cadenas injertadas de polímero" denota cadenas poliméricas, cada una de las cuales está formada con al menos dos monómeros extendidos desde la superficie de una micropartícula mediante una reacción de polimerización. Además, la expresión "una muy alta densidad" denota la densidad de cadenas injertadas en el caso en el que las cadenas injertadas se hayan espesado hasta tal punto que se produce la repulsión estérica entre las cadenas injertadas. En este caso, las cadenas injertadas toman cada una de forma sustancialmente extendida de manera completa en la dirección perpendicular a la superficie. Además, la expresión "unir/unido" denota un enlace que se forma mediante una reacción química común, y sus ejemplos incluyen un enlace covalente y un enlace iónico.

En el agente de contraste para IRM de la presente invención, las cadenas injertadas de polímero tienen un peso molecular promedio en número (Mn) de al menos 30.000, preferiblemente de 30.000 a 320.000.

Controlando el peso molecular promedio en número de las cadenas injertadas, se encuentran diferencia en la fagocitosis de las células reticuloendoteliales, y se puede controlar la retención en la sangre del agente de contraste para IRM de la presente invención. Específicamente, cuando las cadenas injertadas tienen un alto peso molecular promedio en número, la retención en la sangre del agente de contraste por IRM mejora. Además, cuando las cadenas injertadas tienen un alto peso molecular promedio en número, el agente de contraste para IRM tiende a no ser fagocitarlo por las células reticuloendoteliales. Las cadenas de polímero injertado tienen un grado medio de polimerización de 10 a 100.000. Por ejemplo, cuando el monómero tiene un peso molecular de 500, el grado

promedio en número de polimerización es preferiblemente de 50 a 500, más preferiblemente de 50 a 350, y lo más preferiblemente de 70 a 350. El peso molecular promedio en número puede determinarse mediante, por ejemplo, GPC. El grado promedio en número de polimerización puede calcularse dividiendo el peso molecular promedio en número entre el peso molecular del monómero.

En el agente de contraste para IRM de la presente invención, las micropartículas son micropartículas inorgánicas que muestran superparamagnetismo. Los ejemplos de tales micropartículas inorgánicas incluyen hierro (Fe), cobalto (Co), una aleación (por ejemplo, FePt y FeCo), y óxido de hierro (por ejemplo, ferrita y magnetita). La ferrita es preferible ya que se ha usado exitosamente en preparaciones comerciales de hierro para agentes de contraste para IRM. La "ferrita" es una expresión genérica para cerámicas que contienen óxido de hierro como su componente principal, y es usada ampliamente como material magnético. Las micropartículas inorgánicas son más preferiblemente ferrita con una estructura cristalina de tipo espinela y más preferiblemente magnetita (Fe₃O₄). En este contexto, a las que se hace referencia como SPIO (una preparación de óxido de hierro superparamagnética), USPIO (una SPIO ultra-pequeña), y MION (una preparación de nanopartículas de óxido de hierro monocristalinas) están incluidas en las preparaciones de hierro para un agente de contraste para IRM.

La expresión "superparamagnetismo" es un fenómeno que se produce en nanopartículas inorgánicas magnéticas y denota que cuando se aplica un campo magnético externo a ellas, se magnetizan en conjunto. La sustancia superparamagnética tiene propiedades de nanopartículas obtenidas miniaturizando una sustancia ferromagnética hasta un tamaño que permite que sólo esté contenido un único dominio magnético. A diferencia de la sustancia ferromagnética que permanece magnetizada (almacenamiento magnético) incluso cuando se retira el campo magnético, la sustancia superparamagnética pierde magnetización cuando se retira el campo magnético. Por lo tanto, preferiblemente, las micropartículas inorgánicas que muestran superparamagnetismo tienen un tamaño de partículas de 50 nm o inferior. Este tamaño de partículas puede determinarse, por ejemplo, por microscopía electrónica de transmisión. Si las partículas de material compuesto de la presente invención muestran superparamagnetismo puede confirmarse con, por ejemplo, un medidor de flujo magnético SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) (Macromolecules, 42(4), págs. 1219-1228, 2009).

Las micropartículas inorgánicas que muestran superparamagnetismo afectan los tiempos de relajación (tanto T₁ como T₂) de los núcleos (generalmente protones de agua en IRM clínica) que emiten señales de RM usadas para formar imágenes en la determinación de IRM. La preparación de hierro que contiene las micropartículas inorgánicas hace resaltar el contraste en la imagen ponderada en T₂ mediante el efecto de acortar principalmente T₂ (hablando estrictamente, acortando T₂* induciendo no uniformidad en el campo magnético local).

Se usa un nivel de relajación transversal (R₂), que se expresa por la recíproca de T₂ como valor que indica la velocidad de acortamiento de T₂ del agente de contraste. El R₂ de las partículas de material compuesto depende básicamente de la magnetización de las partículas inorgánicas que muestran superparamagnetismo, y el R₂ de la SPIO o USPIO existente es generalmente de 20 a 200 [Fe mM⁻¹.s⁻¹] (Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 58, págs. 1471-1504, 2006). Un R₂ mayor indica un efecto de acortamiento de T₂ mayor a una concentración menor. Cuando las micropartículas inorgánicas que muestran superparamagnetismo son magnetita (Fe₃O₄) y se usan como agente de contraste negativo, las partículas de material compuesto tienen un nivel de relajación transversal (R₂) de preferiblemente al menos 100 [Fe mM⁻¹.s⁻¹] (fuerza del campo magnético: 1,5 T) y más preferiblemente al menos 200 [Fe mM⁻¹.s⁻¹] (fuerza del campo magnético: 1,5 T).

En el agente de contraste para IRM de la presente invención, las cadenas injertadas de polímero tienen una densidad de injerto de 0,15 a 0,45 cadenas/nm². Controlar esta densidad de injerto permite la retención en la sangre de las partículas de material compuesto en el agente de contraste para IRM de la presente invención que ha de controlarse. En la presente invención, la expresión "densidad de injerto" o "densidad" denota el número de cadenas injertadas unidas a la superficie por unidad de área (nm²) de las superficies de las micropartículas. La densidad de injerto (s) se calcula como sigue, determinando la cantidad de las cadenas injertadas de polímero (la cantidad de injertos, p) que se forman extendiéndose desde las superficies de las micropartículas, mediante análisis elemental y usando el valor obtenido de este modo, el área superficial (S, nm²) de las micropartículas de núcleo, el peso molecular promedio en número Mn y el número de Avogadro (Av) de los polímeros de injerto.

$$\text{Método de Cálculo : } s = (p/Mn)Av/S$$

En el agente de contraste para IRM de la presente invención, las partículas de material compuesto tienen un tamaño medio de partículas de preferiblemente 1000 nm o inferior, más preferiblemente de 10 a 500 nm, y más preferiblemente de 10 a 250 nm. En el agente de contraste para IRM de la presente invención, su retención en la sangre pocas veces depende del tamaño medio de partículas. Por lo tanto, cuando se tienen cadenas injertadas con un peso molecular predeterminado, el agente de contraste por IRM de la presente invención no se elimina fácilmente de un cuerpo biológico, incluso cuando el tamaño de partículas de las micropartículas aumenta y como resultado, el tamaño medio de partículas de las partículas de material compuesto aumenta. Por consiguiente, el agente de contraste para IRM de la presente invención es excelente en sensibilidad cuando se compara con agentes convencionales, y puede producir un efecto a una baja dosis. El tamaño medio de partículas denota el diámetro

5 hidrodinámico de una partícula de material compuesto completa que incluye cadenas injertadas proporcionadas para una micropartícula de núcleo. Además, en el caso de partículas de material compuesto en las que la distribución de tamaño de partículas del tamaño medio de partículas es pequeño, el agente de contraste para IRM tiene un tamaño uniforme y por lo tanto es preferible para DDS. El tamaño medio de partículas puede determinarse mediante un método de determinación de distribución de tamaño de partículas de tipo de dispersión dinámica de luz.

10 En el agente de contraste para IRM de la presente invención, las cadenas injertadas de polímero puede obtenerse, por ejemplo, mediante la polimerización por radicales libres de monómeros que usa grupos iniciadores de polimerización localizados sobre las superficies de micropartículas como puntos de base. El tipo de los monómeros es preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un derivado de ácido acrílico, un derivado de ácido metacrílico, un derivado de acrilamida, un derivado de metacrilamida, y un derivado de estireno. Sin embargo, no está limitado a ello y puede seleccionarse adecuadamente en el intervalo reconocido por los expertos en la técnica. Las cadenas injertadas de polímero pueden estar unidas a otras cadenas de polímeros de injerto. Específicamente, en la polimerización por radicales libres, los copolímeros en bloque se injertan usando monómeros de reticulación como un tipo de monómero, y entonces los grupos de reticulación introducidos de este modo pueden hacerse reaccionar. Además, la polimerización por radicales libres puede ser, por ejemplo, polimerización al azar, polimerización en bloque, o de un tipo de gradiente de composición. Las cadenas injertadas de polímero pueden tener cada una un ligando específico introducido en uno de sus extremos o en la vecindad del extremo. Un agente de contraste para IRM que contiene partículas de material compuesto con tales ligados es preferible, ya que puede distribuir selectivamente los ligados a un órgano objetivo. El ligando específico no está limitado particularmente mientras que sea un ligando específico conocido en el presente campo.

25 En el agente de contraste para IRM de la presente invención, las cadenas injertadas de polímero tienen preferiblemente una distribución de pesos moleculares (M_w/M_n) de 1 a 1,5. Esto es porque cuando la distribución de pesos moleculares está en el intervalo de 1 a 1,5, el agente de contraste para IRM tiene superficies de injerto homogéneas.

30 Además, en las partículas de material compuesto del agente de contraste para IRM de la presente invención, las cadenas injertadas de polímero localizadas en una región distante de las micropartículas pueden ser polímeros dirigidos a un tejido enfermo específico. Los ejemplos de los polímeros dirigidos a un tejido enfermo específico incluyen moléculas objetivo para marcadores moleculares que están altamente expresados en el tiempo del desarrollo de la lesión. Tal agente de contraste para IRM puede acumularse también específicamente en una lesión distinta a un tumor. Como resultado, tal lesión puede detectarse como un contraste de la señal de IRM.

35 Preferiblemente, el agente de contraste para IRM de la presente invención se usa para la diagnosis de tumores de, por ejemplo, una parte afectada objetivo (un órgano, un tejido, una célula, un patógeno, etc.). El agente de contraste para IRM de la presente invención se caracteriza por inhibir la adsorción de una proteína que funciona para retirarlo de la sangre, y como resultado, con un alto porcentaje del mismo que permanece en la sangre. Por lo tanto, el agente de contraste para IRM de la presente invención se acumula mucho en el tejido canceroso. La razón posible para esto es un efecto EPR (efecto de retención y permeabilidad aumentada). Es conocido que una sustancia con un tamaño molecular de decenas de nanómetros a 250 nm se acumula debido a las características anatómicas de los vasos sanguíneos de tejido canceroso. El agente de contraste para IRM de la presente invención tiene alta retención en la sangre y como resultado, tiene una alta probabilidad de pasar a través del tejido canceroso por todo el torrente sanguíneo. Por consiguiente, se considera que el agente de contraste para IRM se acumula más en el cáncer.

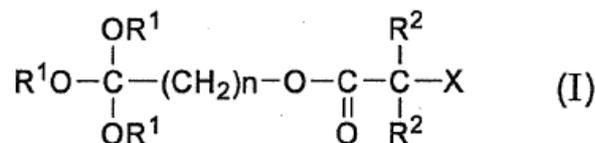
45 Además, el agente de contraste para IRM de la presente invención tiene una baja velocidad de transferencia hacia el hígado, y muestra la propiedad de acumularse en los tumores. Por lo tanto, es posible detectar tumores en diversos órganos mediante el método IRM usando el agente de contraste para IRM de la presente invención.

50 En el agente de contraste para IRM de la presente invención, las partículas de material compuesto pueden prepararse, por ejemplo, como sigue. En primer lugar, se fija un compuesto que ha de usarse como agente de acoplamiento que contiene un grupo iniciador de polimerización a las superficies de micropartículas, mediante un método de quimisorción. Luego, se suministra al menos un tipo de monómero para llevar a cabo una polimerización de injerto por radicales libres. Fijado el agente de acoplamiento que contiene un grupo iniciador de polimerización a las superficies de las micropartículas con antelación, la polimerización de injerto puede avanzar sobre las superficies de las micropartículas, manteniéndose la densidad de injerto constante. Esto es, la cantidad de injerto puede aumentarse en proporción al M_n (el peso molecular promedio en número) de las cadenas injertadas, y se permite que la polimerización avance de una manera viva, y por lo tanto se permite que casi todas las cadenas injertadas localizadas sobre la superficie de las micropartículas de la presente invención crezcan sustancialmente de manera uniforme. Esto es, en las partículas de material compuesto de la presente invención, se reduce el impedimento estérico entre cadenas injertadas adyacentes localizadas sobre las superficies de las micropartículas. Además, durante la polimerización de injerto por radicales libres, puede permitirse que coexista un iniciador de polimerización que no esté fijado a las superficies de las micropartículas.

El compuesto que ha de usarse como agente de acoplamiento que contiene un grupo iniciador de polimerización puede seleccionarse en vista de, por ejemplo, una afinidad con las micropartículas. Específicamente, cuando las micropartículas son partículas de óxido de hierro, el agente de acoplamiento que contiene un grupo iniciador de polimerización del mismo es preferiblemente un grupo de silano representado por la fórmula siguiente (I).

5

[Fórmula Química 1]



En la fórmula anterior, n denota un número entero y es preferiblemente de 3 a 10, y más preferiblemente de 4 a 8. R¹ es un grupo alquílico C₁-C₃ y es preferiblemente un grupo alquílico C₁ o C₂. R² es un grupo alquílico C₁ o C₂. X es un átomo de halógeno y es preferiblemente un átomo de bromo o cloro. Los ejemplos del compuesto representado por la fórmula (I) incluyen (2-bromo-2-metil) propioniloxipropiltriétoxissilano (BPE) y (2-bromo-2-metil) propioniloxihexiltriétoxissilano (BHE).

10

Cuando las micropartículas son óxido de hierro, los ejemplos del agente de acoplamiento que no contenga un grupo iniciador de polimerización del mismo incluyen un agente de acoplamiento de alquilsilano.

15

Es posible cambiar la densidad de injerto sobre las superficies de las micropartículas ajustando la relación entre el agente de acoplamiento que contiene un grupo iniciador de polimerización y el agente de acoplamiento que no contiene un grupo iniciador de polimerización. Específicamente, en el caso en el que las micropartículas son nanopartículas de óxido de hierro, la densidad de injerto es al menos 0,1 cadenas/nm² cuando la relación entre el agente de acoplamiento un grupo iniciador de polimerización y el agente de acoplamiento que no contiene un grupo iniciador de polimerización es 1:0.

20

Después de completarse la polimerización, las partículas de material compuesto deseadas pueden aislarse de la disolución de reacción mediante un método usado generalmente en el presente campo, por ejemplo, mediante uno de los métodos tales como extracción, destilación, lavado, concentración, precipitación, filtración, secado, adsorción, deposición, y cromatografía, o una de sus combinaciones.

25

Preferiblemente, el agente de contraste para IRM de la presente invención se usa para diagnosis de tumores como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos del tumor incluyen tumoraciones no neoplásicas y tumores auténticos. Los tumores auténticos incluyen un tumor benigno y un tumor maligno. Los ejemplos del tumor maligno incluyen tumor cerebral, cáncer de lengua, cáncer de laringe, cáncer de faringe, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de la vías biliares, cáncer duodenal, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, osteosarcoma, condrosarcoma, mesotelioma, cáncer de piel, leucemia, neuroblastoma, mieloma y linfoma.

30

El agente de contraste para IRM de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral. En el caso de administración por vía oral, el agente de contraste para IRM de la presente invención puede administrarse en forma de, por ejemplo, un comprimido, una cápsula, gránulos, polvo o jarabe. En el caso de administración parenteral, el agente de contraste para IRM de la presente invención puede administrarse en forma de, por ejemplo, una inyección, un supositorio, un colirio, un inhalador, un agente transnasal, un ungüento, o una crema. En el caso de la inyección, se administra por, por ejemplo, administración intravenosa, administración intramuscular, o administración intraperitoneal. Estas preparaciones pueden producirse mediante los métodos conocidos convencionalmente, que usan aditivos farmacéuticamente aceptables tales como un excipiente, un lubricante, un aglutinante, un agente disgregante, un estabilizante, y un diluyente.

45

De aquí en adelante, la presente invención se describe con más detalle usando ejemplos. Sin embargo, el intervalo de la presente invención no está limitado por los siguientes ejemplos.

50

En las descripciones de la presente memoria descriptiva, se usan las siguientes abreviaturas:

THF: tetrahidrofurano
 BPE: (2-bromo-2-metil)propioniloxipropiltriétoxissilano
 BPP: 1-(2-bromo-2-metil)propioniloxi-2-propeno
 PEGMA: metacrilato de polietilenglicol
 PEMA: metacrilato de (4-hidroxifenil)etilo

55

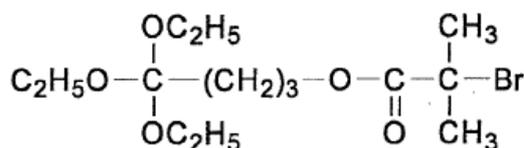
dN-biby: Cu(I)Cl, dinonilbipiridina
 EBIB: 2-bromoisobutirato de etilo
 RMN: resonancia magnética nuclear
 GPC: cromatografía de filtración en gel
 TGA: análisis termogravimétrico
 TEM: microscopio electrónico de transmisión
 IRM: captura de imágenes por resonancia magnética

Ejemplos

Ejemplo de producción de partículas de material compuestos (siendo las micropartículas nanopartículas de óxido de hierro)

(1) Síntesis de un agente de acoplamiento que contiene un grupo iniciador de polimerización, (2-bromo-2-metil)propioniloxipropiltriethoxisilano (BPE)

[Fórmula Química 2]



BPE

La síntesis de BPE se llevó a cabo mediante una reacción en dos etapas. Como primera etapa, se enfrió en hielo una disolución mixta que contenía alcohol alílico (170 g), trietilamina (237 g) y diclorometano (2 l), y luego se añadió gota a gota bromuro de 2-bromoisobutirilo (450 g). Después de eso, la disolución de reacción se agitó a 0°C durante tres horas, y luego se agitó más a temperatura ambiente durante diez horas. La disolución de reacción se concentró, se añadió THF, y de este modo las sales se dejaron precipitar, y luego se filtraron. Después de concentrar las aguas de filtrado, el resultante se diluyó luego con cloroformo (1 l). Esto se lavó luego con una disolución acuosa de ácido clorhídrico 1 N (2 x 1 l), una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (2 x 1 l), y agua pura (2 x 1 l) en esta secuencia. La capa orgánica se secó y luego se concentró. Después de eso, esto se purificó mediante destilación a vacío. De este modo, se obtuvo 1-(2-bromo-2-metil)propioniloxi-2-propeno (BPP) con un rendimiento de 90%.

Como segunda etapa, se colocaron secuencialmente en un matriz BPP (100 g), triethoxisilano (170 g) y un catalizador de Karstedt (600 µl). La mezcla de los mismos se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de la reacción, se purificó por destilación a vacío y luego se sintetizó BPE con un rendimiento de 70%.

(2) Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro revestidas con ácido oleico

De acuerdo con el informe de Hyeon et al. (Nature Materials, vol. 3, págs. 891-895, 2004), se sintetizaron nanopartículas de óxido de hierro revestidas con ácido oleico.

En primer lugar, se sintetizó un complejo de oleato de hierro. Se disolvieron cloruro férrico (FeCl₃6H₂O, 10,8 g) y oleato sódico (36,5 g) en un disolvente mixto de etanol (80 ml), agua (60 ml), y hexano (140 ml). La disolución obtenida de este modo se agitó a 70°C durante cuatro horas. Después de completarse la reacción, se recuperó una capa orgánica superior y la capa orgánica se lavó luego con agua pura tres veces. Después de eso, la capa orgánica se concentró a presión reducida para retirar el disolvente, usando un rotavapor. El residuo obtenido de este modo se secó a vacío a 70°C durante la noche, y se obtuvo de este modo un complejo de oleato de hierro. Este complejo de oleato de hierro (36 g) y ácido oleico (5,7 g) se disolvieron en trioctilamina (200 g). La disolución obtenida de este modo se calentó a 370°C con una velocidad de calentamiento de 5°C/min. La disolución se calentó adicionalmente a reflujo para mantener una temperatura de 370°C durante 30 minutos. Después de eso, la disolución de reacción se enfrió a temperatura ambiente y después de diluirla con THF, se recuperaron nanopartículas de óxido de hierro revestidas con ácido oleico mediante centrifugación (12.000 rpm). El diámetro circular equivalente del área proyectada (tamaño medio de partículas) de las nanopartículas de óxido de hierro se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión, y como resultado, se encontró que era de 7, 10, 15 y 20 nm. Se confirmó mediante el método de difracción por rayos X que este óxido de hierro era magnetita (Fe₃O₄).

[Tabla 1]

Tabla 1. Condiciones de polimerización y resultados de polimerización

serie	Condiciones de polimerización para cadenas injertadas de polímero						Propiedades de las cadenas injertadas de polímero				
	EBIB: (PEGMA+PEMA) : Cu(I)Cl : dN - bipy	cantidad de monómero (% en peso)	tamaño de micropartículas de óxido de hierro (nm)	concentración de micropartículas de óxido de hierro (% en peso)	disolvente de polimerización	cantidad total de disolución de polimerización (g)	tiempo de polimerización (h)	peso molecular promedio en número (Mn)	distribución de pesos moleculares (Mw/Mn)	grado promedio en número de polimerización	densidad de injerto (cadenas/nm ²)
Ejemplos											
1	1:15000:150:300	50	7	0,25	THF	20	65,5	160.000	1,43	337	0,29
2	1:2000:10:20	50	7	0,25	THF	20	27	66.000	1,1	139	0,29
3	1:2000:10:20	50	10	0,5	THF	20	24	65.000	1,1	137	0,32
4	1:10000:100:200	50	10	0,5	THF	20	20	101.000	1,15	213	0,38
5	1:10000:100:200	50	10	0,5	THF	20	72	154.000	1,2	324	0,41
6	1:10000:100:200	50	20	0,5	THF	20	20	109.000	1,12	229	0,4
7	1:10000:100:200	40	20	0,5	THF	20	19,5	100.000	1,22	211	0,43
11	1:2000:10:20	50	15	0,5	THF	20	5,5	36000	1,30	76	0,15
12	1:2000:10:20	50	15	3	THF	50	9	57000	1,40	120	0,18

(continuación)

Ejemplos comparativos												
8	1:2000:10:20	50	10	1	THF	10	16	29000	1,13	61	0,11	
9	1:100:0,5:1	50	20	2	THF	10	4	11000	1,22	23	0,06	
10	1:100:0,5:1	50	20	0,5	THF	10	4	12000	1,18	25	0,16	
13	1:100:0,5:1	50	20	2	THF	10	4	26000	1,21	55	0,14	

EBIB: 2-bromoisobutirato de etilo
 PEGMA: metacrilato de polietilenglicol
 PEMA: metacrilato de (4-hidroxifenil)etilo
 dN-biby: dinonilbipiridian
 THF: tetrahidrofurano

<Medida del nivel de relajación de las partículas de material compuesto>

Con respecto a las partículas de material compuesto obtenidas en la serie 2 (7 nm), serie 3 (10 nm) y serie 6 (20 nm) de los ejemplos, que son diferentes en el tamaño de las partículas de las micropartículas de óxido de hierro unas de otras, se determinó en tiempo de relajación usando RMN y IRM, como sigue.

Usando RMN (EX-400, JEOL Ltd.), se determinaron los T_2 mediante un método CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), siendo el objeto a medir una señal de protón del H_2O en presencia de partículas de material compuesto equivalentes a Fe 1 mM (99% de $D_2O/24^\circ C$). Los R_2 determinados a partir del resultado fueron 118 [$Fe\ mM^{-1}\cdot s^{-1}$] (serie 2), 151 [$Fe\ mM^{-1}\cdot s^{-1}$] (serie 3), y 326 [$Fe\ mM^{-1}\cdot s^{-1}$] (serie 6). Por consiguiente, se encontró que las partículas de material compuesto obtenidas anteriormente mostraban un efecto de acortamiento de T_2 requerido como agente de contraste para IRM. Además, se pudieron obtener partículas de material compuesto (serie 6), que indicaron un R_2 de al menos 200 [$Fe\ mM^{-1}\cdot s^{-1}$] y mostraron un alto efecto de acortamiento de T_2 incluso a una concentración inferior. En la RMN usada en esta determinación, la fuerza del campo magnético fue de 9,4 T, pero la relajación de T_2 apenas está afectada por la diferencia en la fuerza del campo magnético (Questions & Answers in MAGNETIC RESONANCE IMAGING, segunda edición, publicado por Medical Science International).

Después, se llevó a cabo un experimento fantasma usando IRM (Unity INOVA 4.7T, Varian Technologies Japan Ltd.). Las partículas de material compuesto (serie 6) se diluyeron con agua destilada hasta una concentración de Fe de 0,001 a 2,0 mM. Se colocaron, como se muestra en el dibujo de la derecha de la figura 2, y sus T_2 se midieron luego mediante eco de espín (condiciones de medida: TR/TE = 4000/0,08 ms). El sujeto de comparación usado en la presente memoria fue un agente de contraste existente basado en gadolinio, Magnevist (MV, Gd 1 mM, Bayer Yakuhin, Ltd.), y el testigo negativo usado en la presente memoria fue agua destilada. Los números indicados en los círculos mostrados en el dibujo de la derecha de la figura 2 son concentraciones (mM) de las partículas de material compuesto, y MV indica el agente de contraste existente basado en gadolinio usado como el sujeto de comparación. El dibujo de la izquierda de la figura 2 muestra una imagen fantasma de IRM para determinar el nivel de relajación de las partículas de material compuesto (serie 6). Como resultado, con referencia a la imagen de determinación de T_2 , las partículas se vuelven oscuras de un modo dependiente de la concentración, y se confirmó que fue posible obtener una imagen de contraste por IRM suficiente incluso a concentraciones inferiores, cuando se compara con el producto existente. Además, se obtuvieron los mismos resultados cuando se usaron otras partículas de material compuesto. La fuerza del campo magnético fue de 4,7 T.

<Evaluación de la estabilidad de dispersión de partículas de material compuesto>

Para evaluar la estabilidad de dispersión de las partículas de material compuesto obtenidas en las series de 1 a 13, se llevó a cabo un ensayo de almacenamiento de larga duración. Usando PBS (disolución salina tamponada con fosfato), se ajustaron las partículas de material compuesto respectivas (series de 3, 4 y 5 de los ejemplos así como la serie 8 del ejemplo comparativo; 5 ml cada una) con las micropartículas de óxido de hierro con tamaño de partículas de 10 nm, para tener una concentración de partículas de 0,038% en peso, y luego se almacenaron a temperatura ambiente durante seis meses. Antes de comenzar el almacenamiento, no se encontró agregación de ninguna partícula de material compuesto. Como resultado de la determinación de distribución de tamaño de partículas por dispersión dinámica de luz, usando LB-550 (fabricado por HORIBA, Ltd.), los tamaños medios de partículas (diámetro hidrodinámico; el tamaño de la mediana se usó en la presente determinación) fueron inferiores a 40 nm, y todos ellos mostraron una excelente estabilidad de dispersión. Cuando estas partículas de material compuesto se almacenaron a temperatura ambiente durante 6 meses, la precipitación se produjo sólo en la serie 8 del ejemplo comparativo (figura 3). De manera similar, se llevó a cabo la determinación de la distribución de tamaño de partículas de las partículas de material compuesto y, como resultado, la serie 8 del ejemplo comparativo fue 296 nm, la serie 3 fue 120 nm, la serie 4 fue 75 nm, y la serie 5 fue 24 nm. De este modo, cuanto mayor fue la longitud de la cadena injertada, mayor fue la dispersabilidad obtenida antes de mantener el comienzo del almacenamiento. A partir de estos resultados, se confirmó que las partículas de material compuesto con mayores pesos moleculares de cadenas injertadas fueron excelentes en estabilidad de dispersión, y fueron adecuadas para un largo periodo de almacenamiento. Este es un resultado sorprendente, que indica que las partículas de material compuesto con cadenas injertadas de polímero unidas a ellas mediante polimerización por radicales libres, muestran la característica que la estabilidad de dispersión se mantiene durante un largo periodo de tiempo incluso cuando están simplemente mezcladas en un disolvente acuoso.

<Fagocitosis de partículas de material compuesto por macrófagos intraperitoneales de ratón>

Para evaluar la tendencia de las partículas de material compuesto de ser tomadas por el sistema reticuloendotelial, se llevó a cabo el ensayo de macrófagos in vitro. Un ratón (de 8 semanas de edad, ratón macho ICR) sometido a administración intraperitoneal de 2 ml de tioglicolato al 3% (fabricado por Sigma Corporation), se sacrificó después de tres días y se recuperaron macrófagos de la cavidad abdominal usando disolución de Hanks (fabricada por Gibco Corporation). Los macrófagos recuperados de este modo se ajustaron para tener 1×10^6 células/ml después de lavarse con disolución de Hanks y un medio de cultivo (DMEM, fabricado por Gibco Corporation), y luego se cultivaron en las condiciones de $37^\circ C$ y CO_2 al 5%. Después de tres horas, el medio de cultivo se retiró y se añadieron partículas de material compuesto (series de 1 a 7, 11 y 12 de los ejemplos así como series de 8 a 10 y 13

de los ejemplos comparativos) ajustadas para tener 30 µg Fe/ml usando el medio de cultivo. Después de 24 horas de cultivo, el medio de cultivo se retiró de ahí, y se lavó luego con PBS tres veces. Después de eso, los macrófagos que fagocitaron las partículas de material compuesto se tiñeron con colorante azul de Prusia de Perl, y se midió la absorbencia (590 nm) (figura 4). El testigo negativo usado en la presente memoria fue PBS, y el testigo positivo usado en la presente memoria fue un agente de contraste existente de óxido de hierro, Resovist (Bayer Ltd.; 30 µg de Fe/ml). Como resultado, cuando se usaron las partículas de material compuesto del ejemplo, no hubo diferencia con el testigo negativo, y por lo tanto se confirmó que no fueron fagocitadas por macrófagos. Generalmente, se considera que cuando las partículas de material compuesto tienen mayores pesos moleculares de cadenas injertadas, la densidad en el extremo de la cadena injertada disminuye cuando se compara con la vecindad en la que las micropartículas estaban unidas, y tienden a ser reconocidas por el sistema reticuloendotelial, y tienden de este modo a ser fagocitadas. Por lo tanto, se consideró que las partículas de material compuesto con pesos moleculares de cadenas injertadas inferiores tendían a no ser fagocitadas por macrófagos. Contrariamente a las expectativas, sin embargo, se confirmó que cuando se comparan con las partículas de material compuesto (ejemplo comparativo) con pesos moleculares de cadenas injertadas inferiores, las partículas de material compuesto (la presente invención) con mayores pesos moleculares de cadenas injertadas tendían a no ser fagocitadas por macrófagos.

<Fagocitosis de partículas de material compuesto por macrófagos de hígado de ratón>

Para evaluar la tendencia de las partículas de material compuesto de ser tomadas por el hígado, se llevó a cabo la evaluación histopatológica del hígado. Cada disolución de las partículas de material compuesto (serie 5 del ejemplo y serie 8 del ejemplo comparativo; 300 µl cada una) con una concentración ajustada a 1,9% en peso usando una disolución salina normal, se administró por vía intravenosa a través de la cola de un ratón (6 semanas de edad, ratón macho ICR). Se sacrificaron tres días después de la administración, y los hígados extirpados se fijaron en formol. Después de eso, se incluyeron en parafina, se seccionaron, y luego se tiñeron con HE. Como resultado de la evaluación histopatológica del hígado, en el caso de la serie 8 del ejemplo comparativo (el tamaño de partículas de las micropartículas de óxido de hierro: 10 nm, Mn: 29.000), los macrófagos del hígado (células de Kupffer) mostrados en los círculos se tiñeron de un color amarillado, y se indicó de ese modo que las nanopartículas de óxido de hierro (partículas de material compuesto) fueron fagocitadas (figura 5B). En el caso de la serie 5 (el tamaño de partículas de las micropartículas de óxido de hierro: 10 nm, Mn: 154.000), sólo se encontraron células de Kupffer normales mostradas en los círculos, y no se observó fagocitosis (figura 5A). A partir de este resultado, se confirmó que las partículas de material compuesto del ejemplo no fueron fagocitadas por las células de Kupffer en el sistema reticuloendotelial del hígado, y no se acumularon en el hígado tres días después de la administración.

<Evaluación farmacocinética de partículas de material compuesto marcadas con isótopos radioactivos (IR)>

(2) Marcado de partículas de material compuesto con isótopo radioactivo (IR)

Dispersiones (la concentración de las partículas de material compuesto: 1% en peso, el disolvente = agua pura, 100 µl) de las partículas de material compuesto de la serie 6 del ejemplo (el tamaño de partículas de las micropartículas de óxido de hierro: 20 nm, Mn: 109.000) y la serie 9 del ejemplo comparativo (el tamaño de partículas de las micropartículas de óxido de hierro: 20 nm, Mn: 11.000) se colocaron cada una en un tubo para microcentrifugadora, y se añadieron adicionalmente Na¹²⁵I (5 µl, Perkinelmer NEZ033) y luego se añadió una disolución de cloramina T (la concentración: 0,2 mg/ml, el disolvente = disolución acuosa tamponada con fosfato 0,5 M (pH 7,5, que contiene NaCl 0,5 M, 100 µl). Cada disolución obtenida de este modo se agitó con un mezclador de vórtice durante dos minutos. Además, se añadió una disolución de metabisulfito sódico (la concentración: 4 mg/ml, el disolvente = agua pura, 100 µl), y luego se agitó con el mezclador de vórtice durante dos minutos. La mezcla obtenida de este modo se separó y purificó (eluato: disolución salina normal) con una columna PD-10 (GE Healthcare Japan Corporation), y de este modo se recuperó una destilación que contenía micropartículas (partículas de material compuesto marcadas con ¹²⁵I) como una dispersión de partículas de material compuesto marcadas con ¹²⁵I.

(3) Evaluación farmacocinética de partículas de material compuesto marcadas con isótopos radioactivos (IR)

Las dispersiones de partículas de material compuesto marcadas con ¹²⁵I (series 6 y 9, 100 µl cada una), preparadas en (1) se administraron por vía intravenosa a través de la cola de un ratón con tumores (8 semanas de edad, ratón hembra BALB/c) con células tumorales de colon-26 transplantadas en él. Después del lapso de un periodo de tiempo predeterminado, se recogió sangre del ojo de un ratón. Se midió luego su radioactividad con un contador gamma (ARC-301B, ALOKA Co., Ltd.), y de este modo se determinó el porcentaje de las partículas de material compuesto que quedaban en la sangre (figura 6). Además, se sacrificaron los ratones con tumores 24 horas después de la administración. Se midió la radioactividad de cada órgano extirpado de los mismos, y de este modo se evaluó la biodistribución de las partículas de material compuesto (figura 7A; tasa de acumulación en los tejidos, figura 7B: la tasa de acumulación en los tejidos por peso). Como resultado del porcentaje de las partículas de material compuesto que quedan en la sangre, en la serie 9 del ejemplo comparativo (el tamaño de partículas de las micropartículas de óxido de hierro: 20 nm, Mn: 10.000), el porcentaje disminuyó desde inmediatamente antes de la administración, mientras que en la serie 6 del ejemplo (el tamaño de partículas de las micropartículas de óxido de hierro: 20 nm, Mn: 109.000), un alto porcentaje (aproximadamente 40%) de las partículas de material compuesto que permanecían en la sangre se mantuvo hasta 24 horas después de la administración, lo que indicó una alta retención en la sangre. En

la biodistribución, con respecto a la tasa de acumulación en los tejidos determinada 24 horas después de la administración, se observó una acumulación de 8 a 18% en el hígado y una acumulación de 1 a 2% en el bazo en ambos productos de ensayo. Ya que la tasa de acumulación en el sistema reticuloendotelial del hígado medida una hora después de la administración de un agente de contraste basado en óxido de hierro convencional fue de aproximadamente 80% (Am J Roentgenol. 152, 167-173, 1989), se confirmó que las tasas de acumulación de las partículas de material compuesto del ejemplo en el hígado y el bazo fueron muy bajas. Además, en la tasa de acumulación en los tejidos por peso medida 24 horas después de la administración de la serie 6 del ejemplo, se probó una alta tasa de acumulación en el tumor. A partir de estos resultados, se confirmó que en las partículas de material compuesto con mayores pesos moleculares de cadenas injertadas, la retención en la sangre se prolongó, y la acumulación en el tumor aumentó debido al efecto EPR, mientras que las tasas de acumulación en el hígado y en el bazo fueron muy bajas.

<Evaluación de la captación de imágenes de las partículas de material compuesto por IRM>

Usando las partículas de material compuesto de la serie 6 del ejemplo (el tamaño de partículas de micropartículas de óxido de hierro: 20 nm, Mn: 109.000), se llevó a cabo un ensayo de IRM. Un ratón con tumores (8 semanas de edad, ratón hembra BALB/c) bajo anestesia se situó en un sistema de IRM (Unity INOVA 4,7T, Varian Technologies Japan Ltd). Después de situar y tomar imágenes del tumor de la región femoral izquierda (antes de la administración) (véanse las figuras 8A y 8B), se administró por vía intravenosa una dispersión (100 μ M de Fe/kg, 100 μ l) de partículas de material compuesto de la serie 6 preparadas con una disolución salina normal a través de la cola, y se tomaron imágenes del mismo tumor después de 24 horas (véase la figura 8C). La captación de imágenes se llevó a cabo en condiciones que incluían: plano transversal, 1 mm de espesor, TR = 300 ms, TE = 10 ms, y un ángulo de inclinación de 20°. Como resultado, en la imagen ponderada en T₂ que fue captada mediante la determinación de eco de gradiente (GE), el interior del tumor, que fue captado como una imagen blanca antes de la administración de las partículas de material compuesto, fue sombreado en su totalidad y particularmente en una parte del mismo se observó un efecto sombra perfecto en la imagen 24 horas después de la administración (véase la figura 8C). Este resultado mostró que las partículas de material compuesto se acumularon en el tumor y mostraron de este modo un efecto de acortamiento de T₂ para reducir la fuerza de la señal. Por consiguiente, se confirmó que las partículas de material compuesto funcionan prácticamente como un agente de contraste para IRM que mejora el contraste.

Aplicabilidad industrial

El agente de contraste para IRM de la presente invención también es aplicable para usar como un vehículo de nanofármacos, o un reactivo para captación de imágenes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente de contraste para IRM que comprende partículas de material compuesto, en el que las partículas de material compuesto son aquellas con cadenas injertadas de polímero unidas a superficies de micropartículas a una densidad muy alta, suficiente para permitir que se produzca una repulsión estérica entre las cadenas injertadas, las micropartículas son micropartículas inorgánicas que muestran superparamagnetismo, las cadenas injertadas de polímero tienen un peso molecular promedio en número (Mn) de 30.000 a 320.000, una densidad de injerto de 0,15 a 0,45 cadenas/nm², y una distribución de pesos moleculares de 1 a 1,5.
- 10 2. El agente de contraste para IRM conforme a la reivindicación 1, en el que las cadenas injertadas de polímero se obtienen mediante polimerización por radicales libres de al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un derivado de ácido acrílico, un derivado de ácido metacrílico, un derivado de acrilamida, un derivado de metacrilamida, y un derivado de estireno, con grupos iniciadores de polimerización localizados sobre las superficies de las micropartículas usadas como puntos de base.
- 15 3. El agente de contraste para IRM conforme a la reivindicación 1 o 2, en el que el agente de contraste para IRM es para usar para diagnóstico de tumores.
- 20 4. El uso de un agente de contraste para IRM conforme a la reivindicación 1 o 2 en IRM.

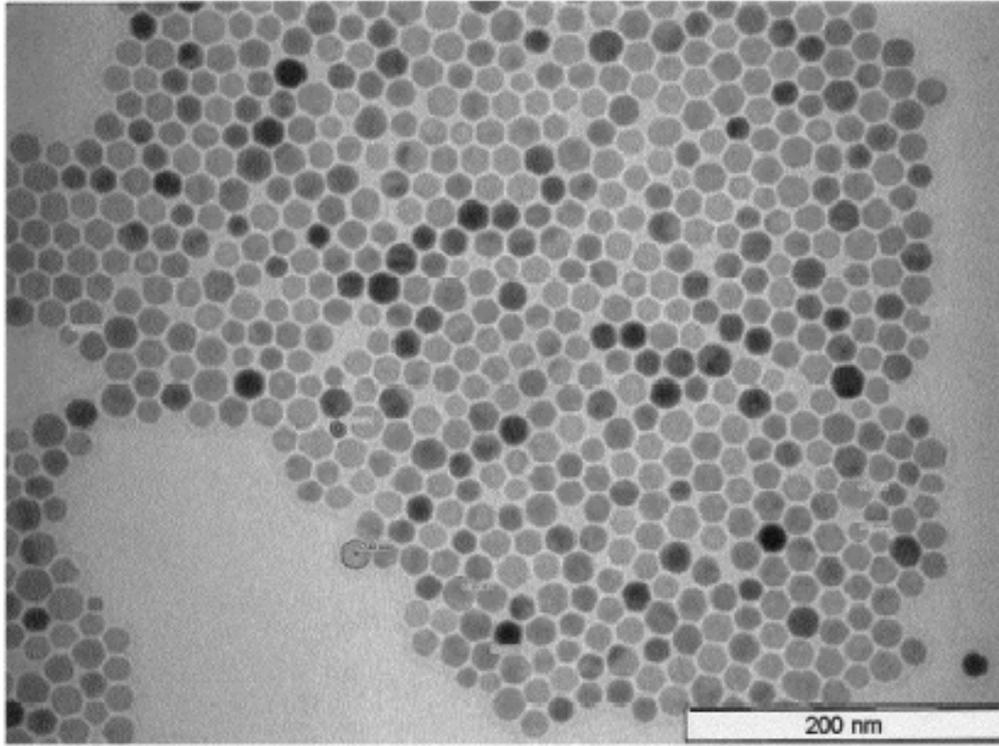


FIG. 1

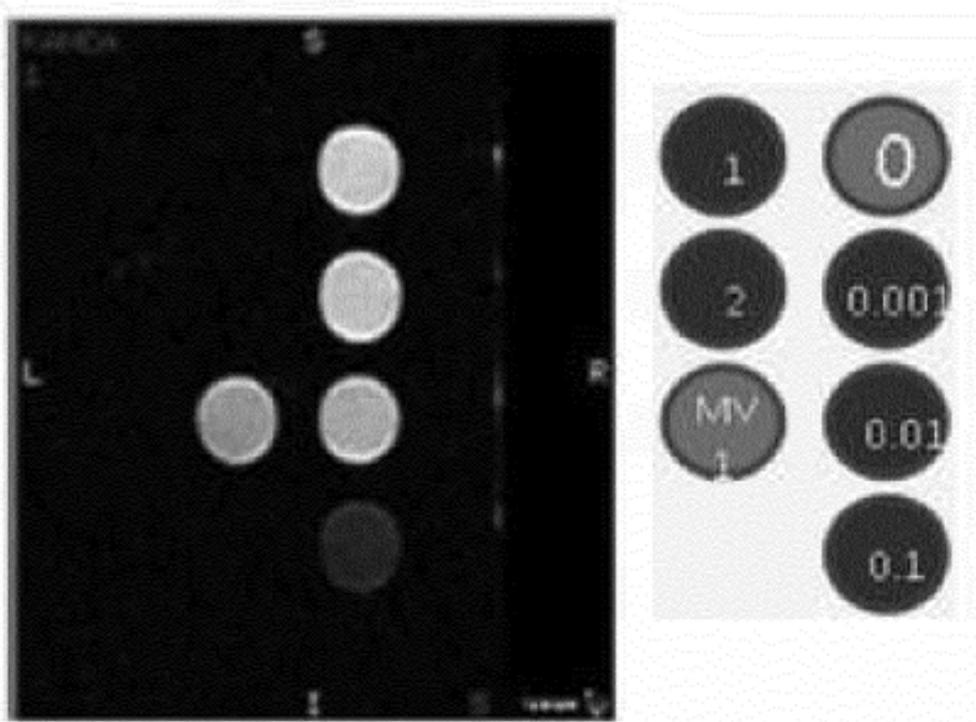


FIG. 2

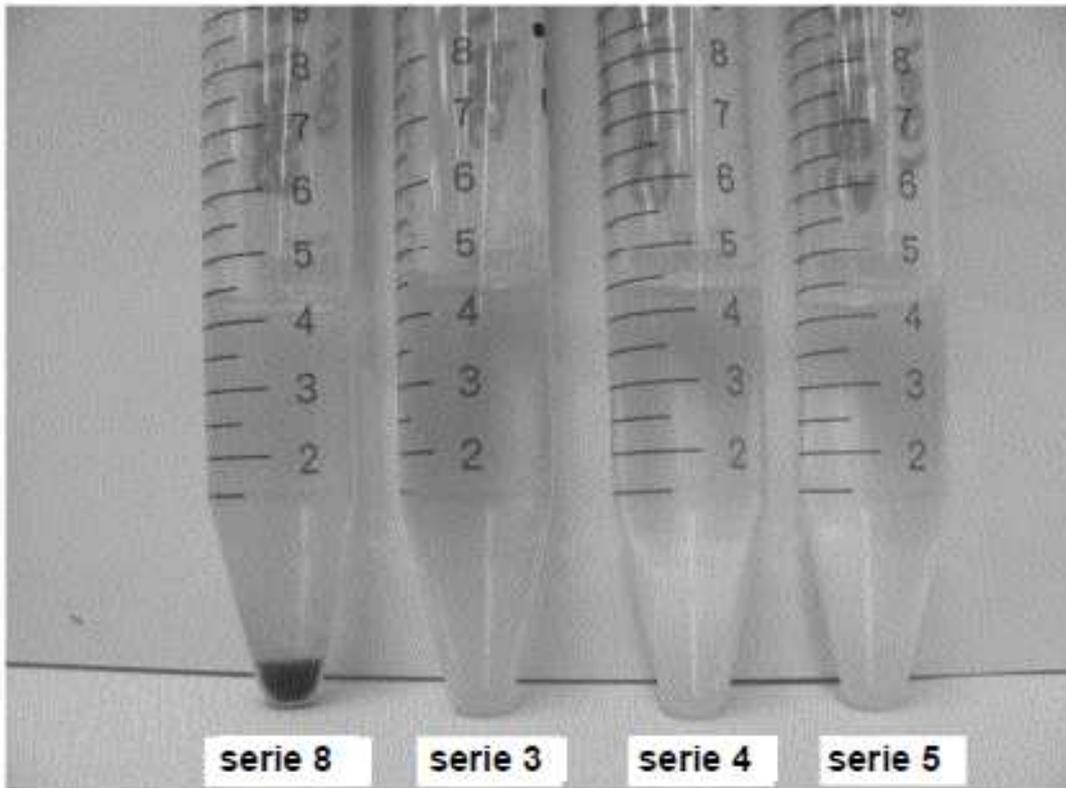
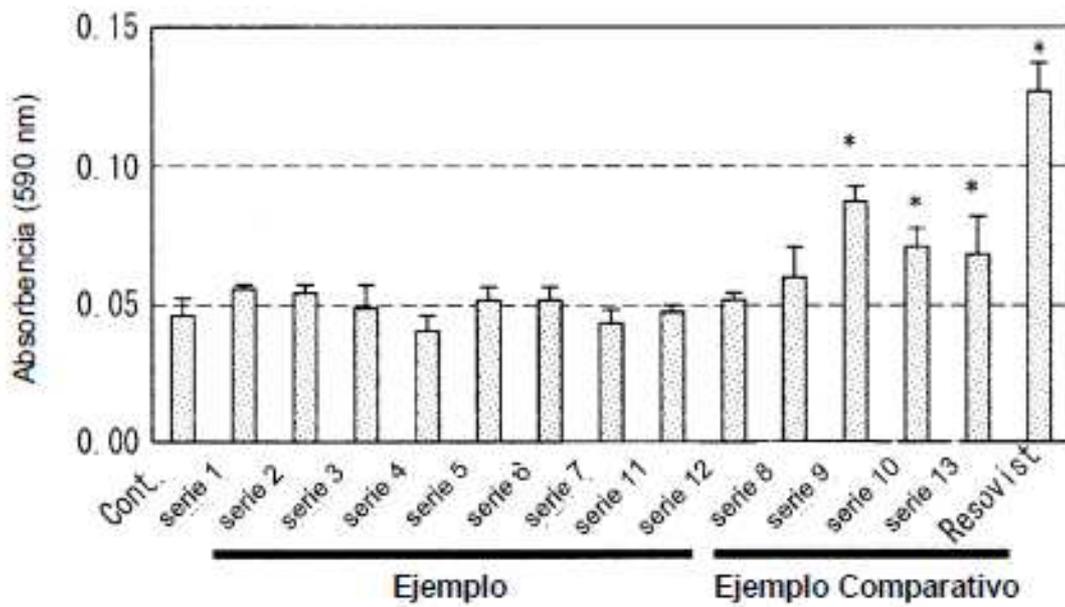


FIG. 3



*; $p < 0,05$ vs Control (prueba de tipo Dunnett)

FIG. 4

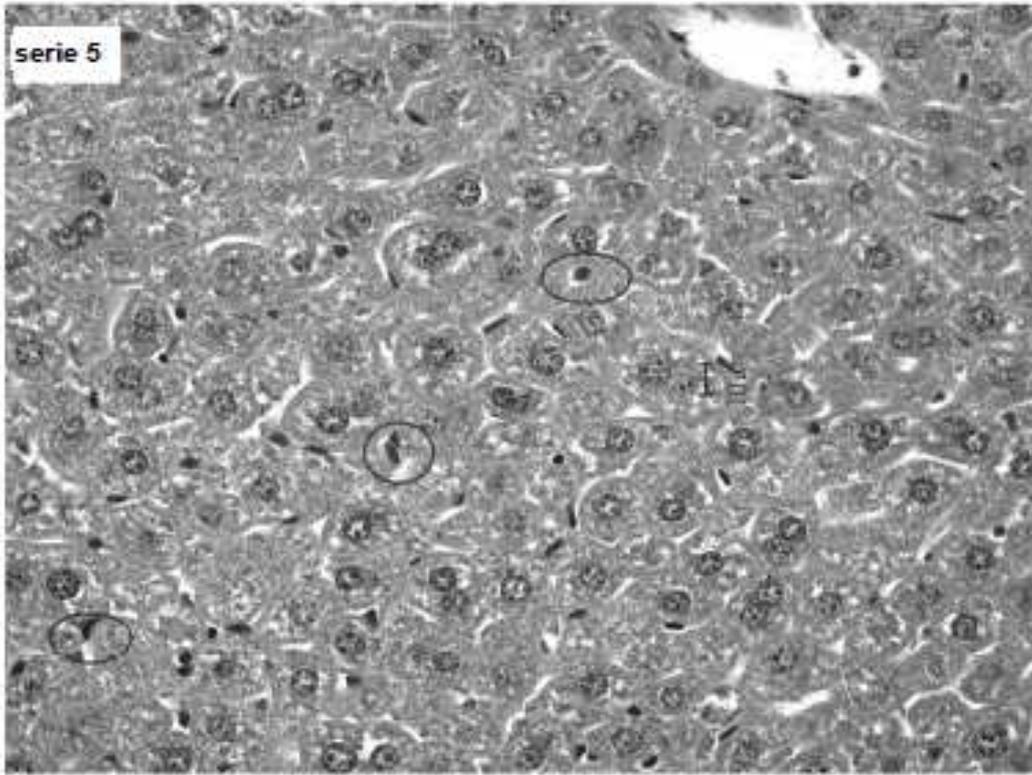


FIG. 5A

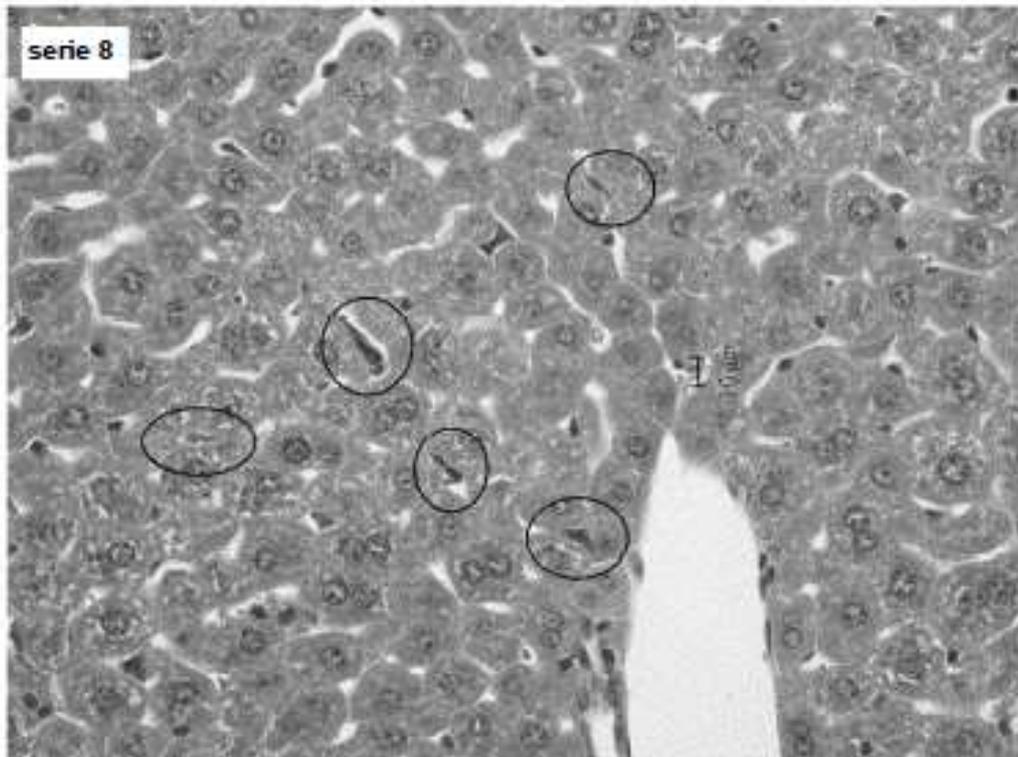


FIG. 5B

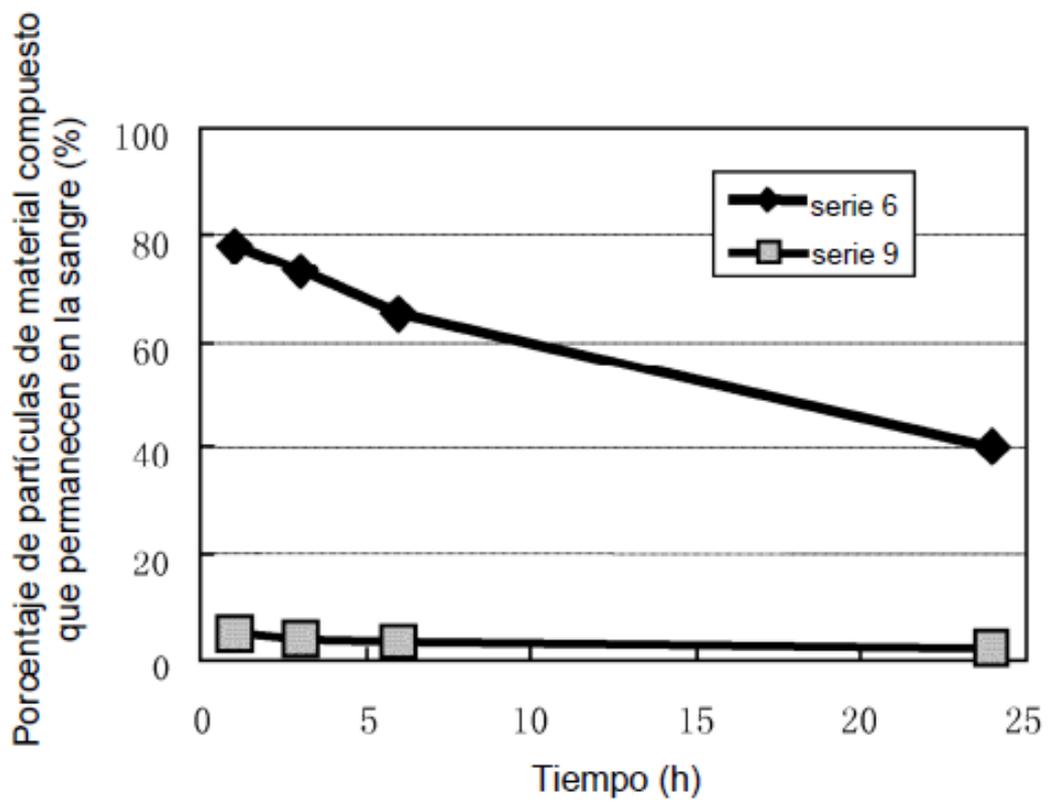


FIG. 6

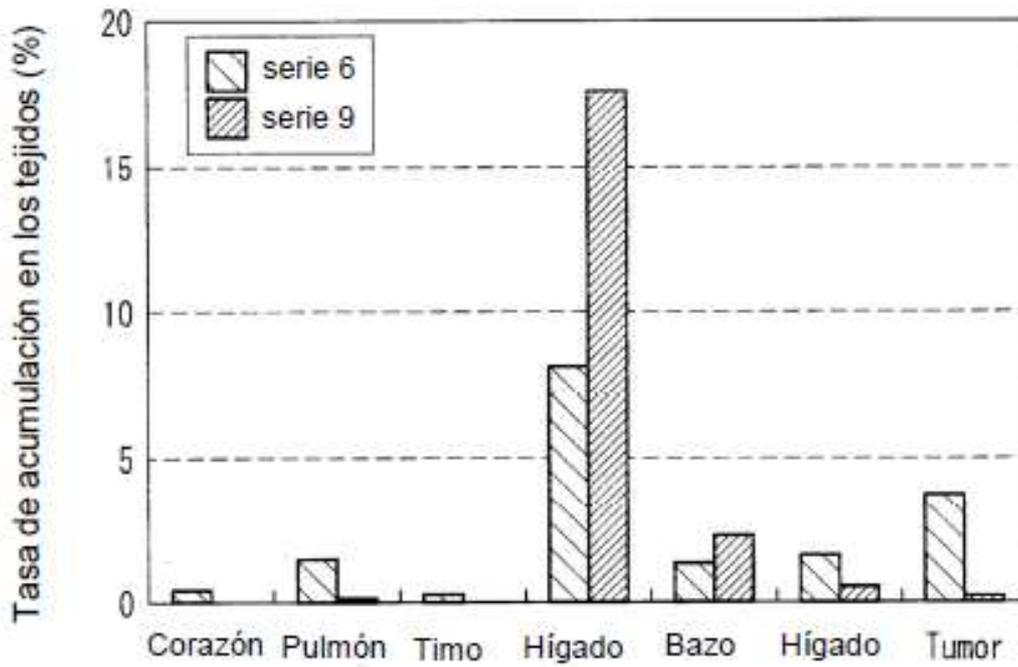


FIG. 7A

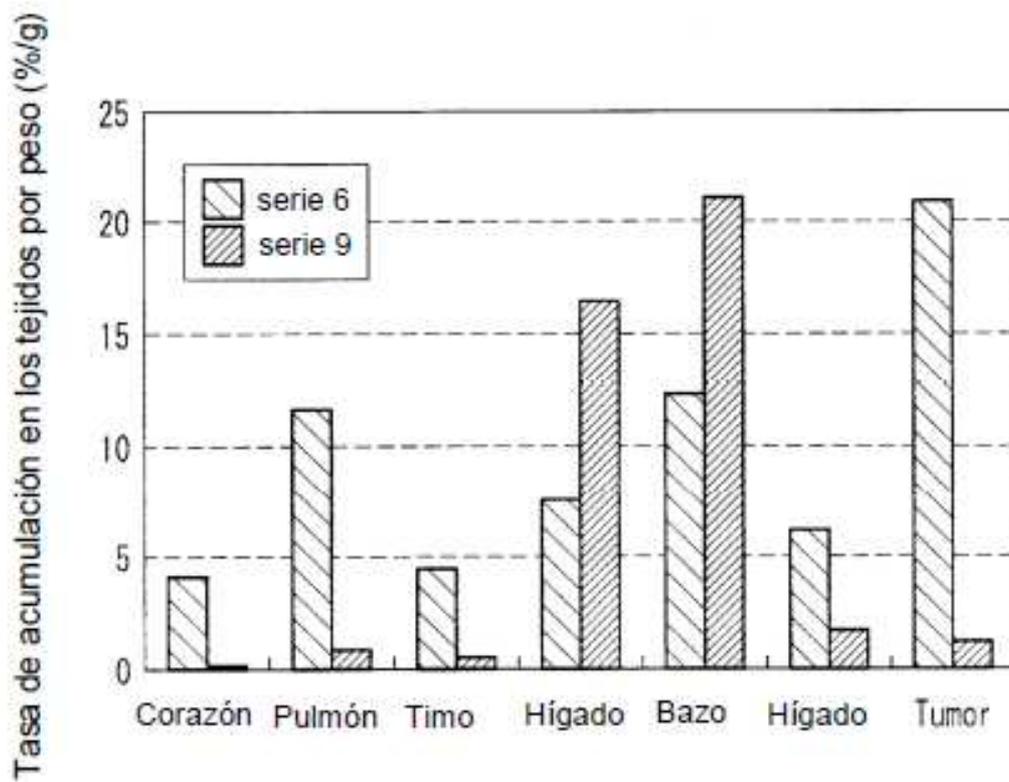


FIG. 7B

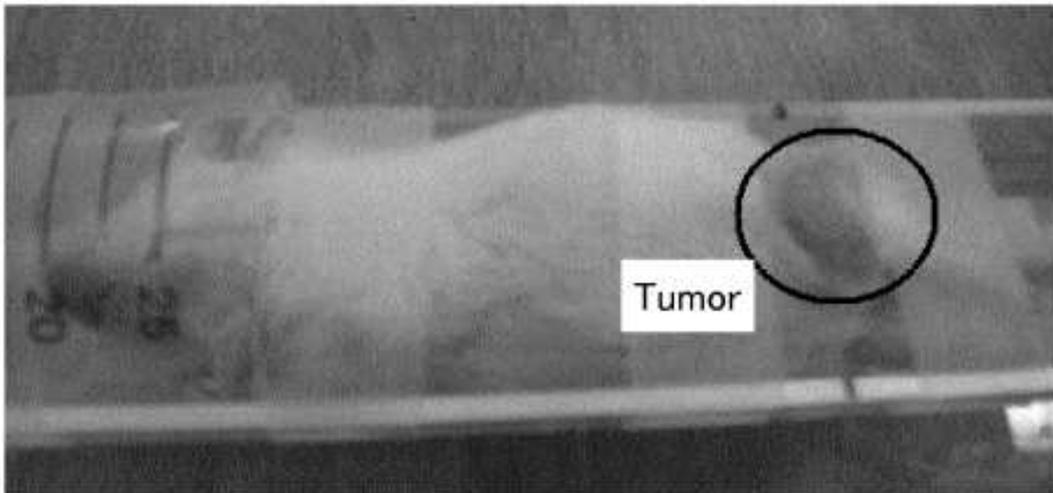


FIG. 8A



FIG. 8B



FIG. 8C