

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 400**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00	(2006.01)
A61K 49/22	(2006.01)
A61K 49/18	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)
B82Y 15/00	(2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2013 PCT/EP2013/069079**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14041150**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2013 E 13762489 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2895201**

54 Título: **Agente de contraste y su uso para obtención de imágenes**

30 Prioridad:

14.09.2012 EP 12184562

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

20.11.2018

73 Titular/es:

**STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT (100.0%)
Geert Grooteplein-Zuid 10
6525 GA Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

**FIGDOR, CARL GUSTAV;
VRIES, DE, INGRID JOLANDA MONIQUE;
SRINIVAS, MANGALA;
CRUZ RICONDO, LUIS JAVIER y
DE KORTE, CHRISTOFFEL LEENDERT**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 690 400 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 y su uso para obtención de imágenes

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la obtención de imágenes médicas potenciada por agente de contraste. En particular, los agentes de contraste proporcionados son útiles para la obtención de imágenes de células, terapia celular y selección como diana *in vivo* y aplicaciones de administración de fármacos.

10

Antecedentes de la invención

La terapia celular es un campo extremadamente prometedor, que podría curar potencialmente estados tales como diabetes, cardiopatía y cáncer. Actualmente hay más de 15.000 ensayos clínicos en curso que implican alguna forma de terapia celular (www.clinicaltrials.gov). Un obstáculo clave en el desarrollo y la optimización de la terapia celular es que hay medios insuficientes para monitorizar las células una vez que están en el paciente, de manera no invasiva.

15

La obtención de imágenes podría proporcionar una solución clínicamente aplicable para monitorizar las células terapéuticas una vez en el paciente, en lo que se refiere a su viabilidad, localización, número y funcionalidad (véase Srinivas M, Aarntzen EH, Bulte JW, Oyen WJ, Heerschap A, de Vries IJ, Figdor CG. *Imaging of cellular therapies*. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 de agosto de 2010;62(11):1080-93).

20

Se ha intentado desarrollar agentes adecuados para marcar células de modo que puedan visualizarse usando varias técnicas de obtención de imágenes, tales como técnicas de ¹H-IRM, ¹⁹F-IRM, obtención de imágenes por fluorescencia y obtención de imágenes acústica, incluyendo obtención de imágenes por ultrasonidos y fotoacústica.

25

El uso de ultrasonidos en los procedimientos médicos de obtención de imágenes se conoce bien en la técnica. Es la modalidad de obtención de imágenes clínica usada más frecuentemente. Los ultrasonidos se conocen como una técnica económica, no invasiva, en tiempo real con un historial de seguridad bien establecido. Puede usarse para estudios longitudinales y el uso repetido no es perjudicial para el organismo. Los dispositivos de ultrasonidos no producen ninguna radiación ionizante y su funcionamiento no implica el uso de radiomarcadores. Los dispositivos para realizar obtención de imágenes por ultrasonidos son portátiles y ya se usan ampliamente. La obtención de imágenes por ultrasonidos es potencialmente cuantitativa y no es una modalidad de obtención de imágenes de cuerpo completo y, por tanto, está limitada a órganos diana. La obtención de imágenes por ultrasonidos está limitada con respecto a la profundidad de la obtención de imágenes.

30

35

Normalmente, se emplean microburbujas llenas de gas como agentes de contraste en la obtención de imágenes por ultrasonidos. Con frecuencia tienen un tamaño relativamente grande (1000-10000 nm de diámetro) lo que generalmente es inadecuado para el marcaje celular. Además, también son inadecuadas para obtener imágenes de vasos sanguíneos más pequeños, por ejemplo en la obtención de imágenes de tumores. Tales microburbujas llenas de gas tienen una vida útil corta, normalmente del orden de segundos a minutos. También adolecen de la desventaja adicional de que puede producirse daño celular cuando las burbujas de gas explotan. Además, las microburbujas llenas de gas son inestables, de modo que no pueden almacenarse durante una cantidad de tiempo significativa; normalmente tienen que usarse inmediatamente tras la hidratación. Finalmente, tales agentes grandes no pueden dejar la circulación y por tanto presentan oportunidades muy limitadas de selección como diana *in vivo* o aplicaciones de administración de fármacos. Su gran tamaño también apoya la eliminación rápida por los riñones, lo que limita adicionalmente su vida útil *in vivo*.

40

45

50

Agentes de contraste de ultrasonidos y su uso se revisan en *Ultrasound contrast agents: basic principles*. *Eur J Radiol.* Mayo de 1998;27 Supl 2:S157-60 y Kiessling *et al.*, *Theranostics* 2011, volumen 1, 127- 134.

La solicitud de patente estadounidense 20100158815 describe el uso de agentes de contraste que se internalizan en una célula para mejorar la visibilidad por ultrasonidos de la célula. Sin embargo, esto tiene la desventaja inherente de que el agente es gaseoso e inestable para el seguimiento celular más allá de algunas horas.

55

La solicitud de patente estadounidense 20110020239 proporciona métodos para marcar células *ex vivo* para aplicaciones de obtención de imágenes, y no describe en detalle ningún agente de contraste particular.

60

El documento WO2012/113733 describe nanopartículas como medios de contraste de TMR (tomografía por resonancia magnética) para el diagnóstico del carcinoma hepatocelular.

El documento WO00/71172 describe un sistema de unión específico de sitio, composiciones de obtención de imágenes nucleares que comprenden compuestos perfluoro-orgánicos y métodos para la obtención de imágenes.

65

El documento XP040626761, Srinivas *et al.* en la Sociedad internacional para resonancia magnética en medicina

(mayo de 2012) da a conocer partículas clínicas, no en emulsión, de gadolinio/perfluorocarbono para ^{19}F -IRM.

Pese a los muchos agentes de contraste que se han descrito hasta la fecha, existe una gran necesidad en la técnica de agentes de contraste estables, asequibles y eficaces, adecuados para la obtención de imágenes celular, preferiblemente con técnicas de obtención de imágenes por ultrasonidos y fotoacústica. Ambos serían métodos ideales mediante los cuales monitorizar células terapéuticas, si las células pudieran marcarse con un marcador o agente de contraste adecuado para la detección. La técnica preferiblemente debe ser cuantitativa. Además, los agentes de contraste por ultrasonidos también podrían aplicarse a angiografía por ultrasonidos, obtención de imágenes de tumores, etc.

Sumario de la invención

Se encontró que la visibilidad por ultrasonidos y fotoacústica de partículas mejora enormemente cuando la partícula contiene un perfluoro-éter corona en combinación con gadolinio.

Tales partículas pueden emplearse ventajosamente en obtención de imágenes cualitativa o cuantitativa, tal como obtención de imágenes acústica incluyendo obtención de imágenes fotoacústica y por ultrasonidos, obtención de imágenes por IRM, tal como obtención de imágenes por ^{19}F , obtención de imágenes por ^1H incluyendo obtención de imágenes ponderadas en T1 y T2, SPECT, PET, escintigrafía y obtención de imágenes por fluorescencia. Esto puede emplearse entonces en marcaje celular, microscopía, histología, aplicaciones dirigidas, administración de fármacos o para obtener imágenes de vasculatura o perfusión *in vivo* e *in vitro*.

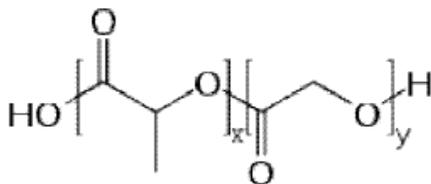
Descripción detallada de la invención

Se presentan ahora en el presente documento agentes de contraste mejorados para su uso en ultrasonidos y otras técnicas de detección. En el presente documento se describe una partícula que contiene un perfluoro-éter corona en combinación con gadolinio.

Se ejemplifica una partícula de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) que comprende un perfluoro-éter corona y gadolinio. Se mostró que tales partículas tienen un rendimiento mejorado en la obtención de imágenes por ultrasonidos, así como en la obtención de imágenes por IRM (^1H y ^{19}F). Las partículas también pueden detectarse usando obtención de imágenes por fluorescencia o bioluminescencia si se incorpora o bien un colorante fluorescente o bien luciferasa (o ácido nucleico que codifica para luciferasa) en la partícula [Pharm Res 2004; 21:354-364].

El término "poli(ácido láctico-co-glicólico)" o PLGA es un término reconocido en la técnica y significa un polímero biodegradable de monómeros de ácido láctico y glicólico de longitud y composición variable. Las partículas de PLGA también pueden comprender polímeros de adición tales como por ejemplo polietilenglicol (PEG, Curr Drug Deliv. Octubre de 2004;1(4):321-33). Las partículas de PLGA se conocen en la técnica y se han descrito para su uso en la obtención de imágenes (por ejemplo, Biomaterials. Septiembre de 2010;31(27):7070-7). La estructura del PLGA se muestra en la fórmula 1 (x e y indican el número de unidades de ácido láctico y glicólico, respectivamente).

Fórmula 1



También se han sugerido partículas de PLGA llenas con gas para su uso en ultrasonidos. La solicitud de patente CN 101574530A describe el uso de un agente de contraste por ultrasonidos de microburbujas multipoliméricas de PLGA-PEG-PLGA en el que la microburbuja comprende un gas, tal como perfluoropropano, decafluorobutano o hexafluoruro de azufre.

Ahora se ha encontrado que las partículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) que comprenden un compuesto orgánico fluorado líquido son particularmente adecuadas para la obtención de imágenes por ultrasonidos y fotoacústica, y que el rendimiento de una partícula de este tipo puede potenciarse enormemente cuando está presente un metal en la partícula.

El término "un" o "una", tal como se usa en el presente documento se refiere a al menos uno. Por tanto, un compuesto orgánico fluorado ha de interpretarse como uno o más compuestos fluorados.

El término "partícula" se usa en el presente documento en su significado típico en la técnica. El término se refiere específicamente a partículas de polímero que están en forma sólida cuando se secan a temperatura ambiente

debido a las propiedades físicas del polímero de matriz.

5 Publicaciones tales como Invest Radiol. Marzo de 2006;41(3):305-12, Radiology. Agosto de 2013;268(2):470-80 y varias más, usan el término “nanopartículas de perfluorocarbono” para describir “gotitas de emulsión de perfluorocarbono” que no son “partículas” tal como se describe en el presente documento. Sólo una publicación, el documento WO2912/113733, enumera verdaderas partículas que contienen un agente específico de perfluorocarbono y gadolinio. Sin embargo, en el presente documento el perfluorocarbono actúa como portador inerte y no es un agente activo, y las partículas están restringidas a 1H-IRM en carcinoma hepatocelular.

10 Por tanto, los liposomas, las micelas y las gotitas de emulsión no están incluidos en el término partículas tal como se usa en el presente documento, ya que consisten en un recubrimiento de tensioactivo líquido (normalmente un lípido) sobre la fase dispersa, que también es un líquido. Las partículas según la invención no contienen tensioactivo y también son estables a ciclos repetidos de congelación/descongelación y liofilización. Las gotitas de emulsión no pueden recuperarse intactas mediante liofilización, y las emulsiones se someten a floculación, flotación, coalescencia y maduración de Ostwald. Estos efectos no se aplican a las partículas en medio líquido, también conocido como “sol”, que en el presente documento se define como un sólido dispersado en una fase continua líquida.

20 Además, las verdaderas partículas, como aquellas según la invención, pueden precipitarse, a diferencia de las emulsiones, que contienen una dispersión de gotitas diminutas que no pueden recuperarse intactas mediante precipitación. Obsérvese que las gotitas de emulsión con frecuencia se denominan inapropiadamente “partículas” o “nanopartículas” en la bibliografía biológica, aunque este término es químicamente inexacto.

25 Además, el término partícula tal como se usa en el presente documento indica un pequeño objeto localizado al que pueden atribuirse varias propiedades físicas o químicas, tales como volumen o masa. Las partículas de la presente invención son micropartículas o nanopartículas con un tamaño de entre 1 y 1000 nanómetros, preferiblemente entre 10 y 1000 nanómetros, tales como entre 50 y 500 nanómetros. La distribución de tamaño es de manera preferible de alrededor de un máximo de entre 50 - 500 nanómetros, tales como alrededor de 100 - 300 tal como 200 nanómetros.

30 En una realización preferida, las partículas son biodegradables y/o biocompatibles.

35 Varias partículas juntas en una disolución pueden formar una materia particulada o suspensión coloidal o sol, que también está dentro del alcance de la invención. El término materia particulada se usa en el presente documento para indicar una composición que consiste esencialmente en partículas, tales como nanopartículas y/o micropartículas.

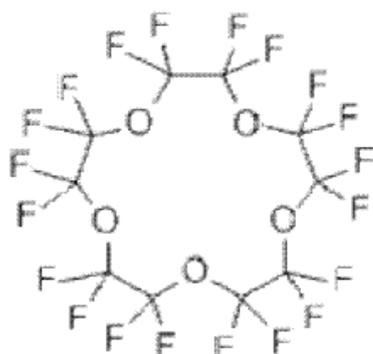
40 El término “líquido”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al estado físico líquido de un compuesto cuando está en forma aislada a temperatura corporal (37 grados Celsius) a presión atmosférica normal (aproximadamente 1000 hectopascales).

45 En determinadas aplicaciones, tal como se ejemplifica en el presente documento, se usaron ventajosamente perfluoro-éter coronas. El término “perfluoro-éter corona” (PFCE) ha de interpretarse como un perfluorocarbono cíclico que contiene carbono, oxígeno y flúor unido covalentemente a una estructura de anillo estable. Normalmente, el PFCE puede ser un polímero.

Un perfluoro-éter corona particularmente útil es perfluoro-éter 15-corona-5, cuya estructura se muestra en la fórmula 2.

50 Debe indicarse que las partículas según la invención están de manera preferible esencialmente libres de tensioactivo, lo que significa que contienen menos del 0,1% de tensioactivo, preferiblemente menos del 0,01% de tensioactivo, más preferiblemente menos del 0,001%, tal como menos del 0,0001% o el 0,00001%. Esto también se indica en el presente documento como esencialmente libre de tensioactivo. Preferiblemente, las partículas no contienen ningún tensioactivo en absoluto. Esto se indica en el presente documento como libre de tensioactivo.

55 Fórmula 2

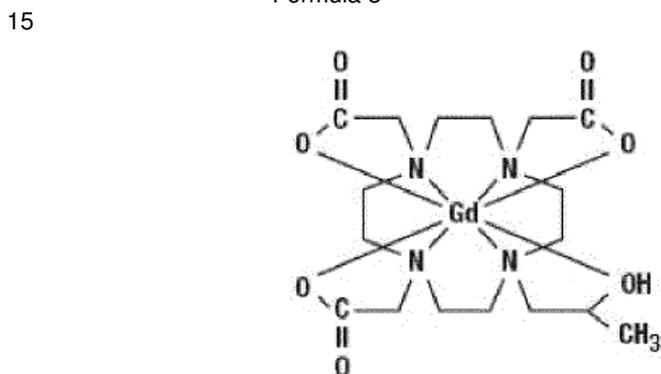


Se encontró que el rendimiento de las partículas que comprenden el perfluoro-éter corona en obtención de imágenes por ultrasonidos y fotoacústica podría mejorarse enormemente cuando se incluía gadolinio en la partícula.

5 Los quelatos de gadolinio están disponibles comercialmente tal como por ejemplo, una composición denominada "Prohance®" que comprende gadoteridol. La estructura del gadoteridol se muestra en la fórmula 3.

10 Por tanto, la invención se refiere a una partícula que está esencialmente libre de tensioactivo, preferiblemente que está libre de tensioactivo, que comprende un perfluoro-éter corona y un quelato de gadolinio. Una partícula particularmente preferida es una partícula que consiste en un polímero, más específicamente una partícula de PLGA.

Fórmula 3



20 Las partículas de PLGA pueden sintetizarse en un amplio intervalo de tamaños. Ventajosamente, las partículas tienen dimensiones de manera que sea factible el marcaje celular, incluyendo las distribuciones de tamaño particularmente ventajosas de 100 - 300 nanómetros, tal como de 150 - 250 nm, tal como alrededor de 200 nanómetros. El término "alrededor de" o "aproximadamente" en este contexto significa más o menos del 10%. Este intervalo de tamaño es particularmente ventajoso para la extravasación de vasos sanguíneos pequeños para aplicaciones de selección como diana *in vivo*.

25 Se encontró que las partículas según la invención eran adecuadas para el marcaje celular *in situ* o *in vivo*, y para ese fin, contienen ventajosamente un agente de selección como diana.

30 El término "agente de selección como diana" se refiere en el presente documento a un agente que dirige las partículas a un sitio relevante o a una célula o tipo celular particular *in vivo* o *in vitro*. Los agentes de selección como diana particularmente ventajosos incluyen anticuerpos y ligandos de receptor.

35 Las partículas también pueden detectarse mediante otros métodos aparte de ultrasonidos. Las partículas pueden detectarse usando obtención de imágenes fotoacústica, sin la adición de colorantes fluorescentes u otros agentes. Sorprendentemente, se ha encontrado que las partículas de PLGA con PFCE pueden detectarse usando obtención de imágenes fotoacústica, potenciando la señal mediante la adición de metal, tal como gadolinio. La absorción máxima se produce a alrededor de 706 nm. Es posible la adición de colorantes o agentes de contraste fotoacústicos, tales como IC-Green®; estos pueden seleccionarse para absorber a una frecuencia máxima igual o diferente que el PFC en las partículas de PLGA. También se encontró que las partículas pueden detectarse *in vivo*, por ejemplo tras inyección intramuscular en ratones. Las células marcadas con las partículas también pueden detectarse usando
40 obtención de imágenes fotoacústica, en simuladores tanto *in vivo* como *in vitro*. Las partículas de PLGA que contienen PFCE son suficientes para la detección usando obtención de imágenes fotoacústica, tanto *in vitro* como *in vivo*; y este efecto se potencia mediante la adición de metales. Un ejemplo de una partícula adecuada es una

partícula de PLGA de alrededor de 200 nm de diámetro que contiene PFCE y gadoteridol.

Encontramos que las partículas también eran adecuadas para la obtención de imágenes por IRM. “Obtención de imágenes por IRM” a este respecto significa obtención de imágenes por resonancia magnética e incluye obtención de imágenes por ¹H y multinuclear, tal como obtención de imágenes por ¹⁹F. Además, la obtención de imágenes puede estar ponderada en T1, T2 o en densidad de protones.

Las partículas según la invención también pueden comprender un colorante, tal como un colorante fluorescente o una proteína fluorescente o un ácido nucleico que codifica para un agente fluorescente. Esto permite la obtención de imágenes por fluorescencia de las partículas, incluyendo análisis *in vivo*, así como análisis histológicos u otros análisis microscópicos.

Otros modos de detectar las partículas es mediante la incorporación de un radionúclido en la partícula. Esto permite la autorradiografía, escintigrafía, SPECT, PET u otros métodos de detección que pueden detectar compuestos radiactivos. Además, mediante la incorporación de la enzima luciferasa o un vector de ácido nucleico que codifica para luciferasa (u otras enzimas relacionadas), puede usarse bioluminiscencia para la detección *in vivo*.

Las partículas también pueden detectarse usando técnicas de coherencia óptica, incluyendo tomografía de coherencia óptica.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Gráfico que muestra la distribución de diámetro de las partículas para partículas de PLGA con PFCE, gadolinio e IC-Geen®. La distribución promedio fue de 181 nm. La representación gráfica muestra la distribución de diámetros de partícula para 6 mediciones independientes. El estrecho solapamiento indica alta reproducibilidad.

Figura 2: Imagen de partículas en gel a valores de MI crecientes. Las imágenes por ultrasonidos se muestran en agua desgasificada (agua con el aire retirado, como control negativo), partícula de PLGA que comprende PFCE (perfluoro-éter 15-corona-5) o PFCE más gadolinio (PFCE - Gd) y agua del grifo normal (que ha disuelto el aire aparece más brillante). La interpretación de la imagen se proporciona como una tabla debajo de la imagen en la que + indica una señal positiva y - una señal negativa en comparación con el control de agua desgasificada.

Figura 3: Diagramas que muestran el cambio en el diámetro, velocidad de recuento o PDI (índice de polidispersidad, indicativo de la extensión de distribución de diámetro) tras la exposición a ultrasonidos de baja (MI = 2,0, oscuridad) y alta energía (MI=0,1, gris claro) durante 30 segundos. Se usaron partículas de PLGA que comprenden PFCE, con un contenido en gadolinio alto y bajo (ejemplo 1) y se compararon con partículas de PLGA sin gadolinio. Los gráficos se representaron gráficamente como un porcentaje del diámetro de partícula inicial tras la exposición a energía de ultrasonidos alta y baja. El diámetro de partícula inicial fue de 180 nm. Los cambios ligeros tras la exposición a ultrasonidos están dentro de un intervalo aceptable para marcaje celular y otras aplicaciones.

Figura 4: Imágenes que muestran el efecto de la concentración de partículas en contraste. Se expusieron las partículas a ultrasonidos de baja energía (MI = 0,2) en pocillos en un gel de agarosa. Se muestra que las partículas de PLGA que contienen PFCE y gadolinio fueron fácilmente visibles a 20 mg por ml, mientras que las concentraciones de 2 y 0,2 mg por ml fueron menos visibles. PFCE indica pocillos con partículas que comprenden partículas de PLGA que comprenden PFCE sin un metal añadido. Las imágenes se tomaron inmediatamente tras la adición de partículas para impedir la sedimentación o coagulación de partículas en el fondo del pocillo. Los datos indican una relación entre la concentración de partículas y el contraste de imágenes que puede aprovecharse para la cuantificación.

Figura 5: Imagen de experimentos *ex vivo* realizada con partículas según la invención y un control de la técnica anterior. Se inyectaron partículas según la invención en tejido hepático y se visualizaron con ultrasonidos (MI=0,2). Las imágenes se tomaron inmediatamente después de la inyección. Las imágenes tomadas tras 5 minutos no indicaron ningún cambio. Se emplearon partículas de PFCE con diferentes cantidades de Gd añadidas durante la síntesis (alta, media y baja, ejemplo 1), junto con partículas de BR14. BR14 es un agente de contraste de microburbujas comercial. Las regiones de inyección se indican mediante los recuadros.

Figura 6: Imágenes de experimentos *ex vivo* empleando partículas según la invención. Se prepararon partículas de PLGA con PFCE y alto contenido en Gd esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1. Se inyectó tejido hepático con 200 microlitros de agua desgasificada (flecha) o 200 microlitros de agua que contenía 5 mg de partículas. Se adquirieron imágenes inmediatamente después de la inyección (panel izquierdo) y tras 2 horas a temperatura ambiente (panel derecho). El contraste con respecto a las partículas es claramente visible y no mostró cambio a lo largo del tiempo.

Figura 7: Gráficos que muestran una caracterización de ultrasonidos en modo A de microburbujas de BR14 tal como se describe en el ejemplo 10. Los recuadros indican la región relevante a lo largo de la muestra. Las señales dentro de esos recuadros (es decir los picos) indican que la muestra es activa a ultrasonidos.

Figura 8: Gráficos que muestran la caracterización en modo A de microburbujas de Sonovue® tal como se describe en el ejemplo 10. Sonovue® es un agente de contraste de microburbujas de ultrasonidos comercial vendido para uso clínico. Los recuadros indican la región relevante a lo largo de la muestra. Las señales dentro de estos recuadros (es decir los picos) indican que la muestra es activa a ultrasonidos.

Figura 9: Gráficos que muestran la caracterización en modo A de partículas según la invención tal como se describe en el ejemplo 10. Los recuadros indican la región relevante a lo largo de la muestra. Las señales dentro de estos recuadros (es decir los picos) indican que la muestra es activa a ultrasonidos.

Figura 10: Imagen que muestra el marcaje de células con partículas según la invención. Se marcaron células dendríticas con partículas de PLGA según la invención tal como se describe en el ejemplo 11. Las células o bien no se marcaron (panel izquierdo) o bien se marcaron con partículas de PLGA que comprenden PFCE y gadolinio (panel derecho) las células marcadas con PFCE-Gd son claramente visibles. Las células no marcadas no son visibles con respecto al fondo. Los círculos indican la región con las células.

Figura 11: Imagen que muestra que las partículas según la invención son adecuadas para la obtención de imágenes celulares multimodal. Pudieron visualizarse dos millones de células dendríticas humanas primarias marcadas con partículas de PLGA que comprenden PFCE, alto contenido en gadolinio e ICG, usando ultrasonidos (panel izquierdo), obtención de imágenes por fluorescencia (segundo panel) y obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM, paneles tercero, cuarto y quinto). Las imágenes de fluorescencia se editaron para mostrar la región fluorescente en imágenes de escala de grises. Los tres paneles de IRM muestran (a la izquierda) una imagen por 1H-IRM ponderada en T1 (la región hiperintensa con las células se indica mediante la flecha, (centro) una imagen por 19F RM donde sólo son visibles las células marcadas y (derecha) una superposición de la exploración de 19F sobre la exploración de 1H.

Figura 12: Imágenes por ultrasonidos de la pata de un ratón antes y después de la inyección de 5 mg de partículas según la invención en el músculo cuádriceps. El panel muestra imágenes tomadas inmediatamente antes y después de la inyección, así como 2,5 horas después de la inyección. La flecha indica potenciación de contraste debido a las partículas, detectables tanto inmediatamente después de la inyección así como 2,5 h después.

Figura 13: (A) Se muestra una representación en diagrama de las partículas para partículas de alrededor de 200 nm de diámetro que contienen perfluoro-éter 15-corona-5 (PFCE) como PFC, IC-Green® como colorante fluorescente y gadoteridol (Prohance®, Bracco) dentro del polímero de PLGA. (B) Se sometieron a prueba 10 mg de diversos PFC para contraste acústico a diferentes valores de MI que oscilan entre 0,2-1. Se usó agua desgasificada como control negativo, seguido por partículas de PLGA vacío (sin PFC) y partículas con diversos PFC, concretamente PFhexano, PFdecalina, PFO y PFCE. La adición de Gd a las partículas de PFCE potencia adicionalmente la señal. Se obtuvieron imágenes de las partículas en pocillos en un simulador de gel. (C) Se inyectaron 10 mg de partículas de PLGA que contienen PFO o PFCE con concentraciones decrecientes de Gd en hígado de cerdo y se obtuvieron las imágenes. Se inyectaron 200 μ l de BR14 como control. La región de atenuación que se produce con BR14 se indica con]; está ausente de todas las partículas. (D) Se obtuvieron imágenes de 0,2, 2 y 20 mg de partículas que contienen PFCE, PFCE-Gd, PFO-Gd y PFO solo en un simulador de gel. Se obtuvieron imágenes de agua desgasificada de manera similar como control. Se representaron gráficamente las intensidades de señal en los pocillos que resultan de las partículas, mostrando una relación lineal entre la concentración de las partículas y el contraste acústico, y las de las partículas de PFCE-Gd dan como resultado un contraste mucho más alto. (E) Imágenes por ultrasonidos de 2,5, 5 y 20 mg de partículas de PFCE-Gd inyectadas en tejido hepático en 100 μ l. (F) Imágenes de EDX (microscopía electrónica con difracción de rayos X) que muestran la localización de IC-Green, PFCE y Gd (de izquierda a derecha, respectivamente) superpuesta sobre la imagen de microscopía electrónica (EM) correspondiente. El PFCE y el colorante se localizan en el borde exterior de la partícula, mientras que el quelato de Gd es interno. La barra de escala indica 200 nm.

Figura 14: (A) También se midió el contenido en 19F de las partículas tras la insonación. Se expusieron las partículas a 60 segundos de excitación por ultrasonidos a un MI de 1,3 (dispositivo de exploración de 7,5 MHz, enfoque a 0,5 cm). (B) Se adquirieron datos de DLS antes y después de que las partículas se expusieran a ultrasonidos, igual que anteriormente. Se muestran el diámetro medio de partícula (nm), la velocidad de recuento media (kcps) y PDI (de arriba abajo). (C) Distribuciones de diámetro de gotitas para las partículas antes y después de la exposición a energía de ultrasonidos. (D) Se adquirieron imágenes de SEM sobre las partículas antes (izquierda) y después de sonicación con sonda. No se observaron cambios en las partículas. La barra de escala bar indica 500 nm.

Figura 15: (A) Comportamiento de diferentes partículas irradiadas por una onda de ultrasonidos de energía creciente. Los resultados se normalizan para la respuesta de agua del grifo y muestran que para las microburbujas de Sonovue (Bracco) la respuesta se colapsa rápidamente a medida que aumenta la presión. En cambio, las partículas muestran una respuesta creciente, lo que demuestra su estabilidad a altas presiones de ultrasonidos. Las partículas con mayor contenido en Gd (PFCE-Gdhi) funcionaron mejor. Se usó PFCE líquido como control. (B) Representación esquemática de la configuración lateral y desde arriba. Una dispersión de las partículas se lava y se

estabiliza en un capilar de vidrio cuadrado y se usa un material eléctrico para crear una onda estacionaria en el microcanal, que enfoca las partículas en el nodo o antinodos de presión. El panel inferior representa el efecto de enfoque sobre las partículas en el tiempo de izquierda a derecha. En el experimento real, las partículas están estacionarias en el canal y se enfocan en el mismo momento en todo el canal. (C) Ejemplos de imágenes procesadas posteriormente para una muestra de partículas de PFCE-Gd (izquierda) y partículas de PFOB (derecha). Las partículas de PFCE se mueven hacia el nodo de presión ubicado en el medio del canal, mientras que el PFOB se mueve hacia los antinodos de presión ubicados en el lateral de los canales. (D) Una sección transversal de dispersión de diversas partículas calculada usando la teoría de la esfera rígida en comparación con la sección transversal de dispersión de una burbuja recubierta, en función del tamaño de las partículas. Un símbolo cuadrado indica un signo positivo para la fuerza de radiación, lo que se traduce en un movimiento dirigido hacia el centro del capilar, mientras que los círculos indican un signo negativo para la fuerza de radiación.

Figura 16: (A) Obtención de imágenes por fluorescencia, 1H y 19F (color falso) IRM y ultrasonidos de 2 millones de DC marcadas con partículas que contienen PFCE, IC-Green y Gd. Se inyectaron las células en una muestra de tejido hepático *ex vivo* antes de la obtención de imágenes. (B) Se marcaron 10 millones de DC con las partículas indicadas y se obtuvieron imágenes usando ultrasonidos en los pocillos. (C) Se marcaron 0,2-3 millones de células con partículas que contienen PFCE, Gd y se obtuvieron imágenes usando ultrasonidos en un simulador de gel. Se representaron gráficamente las intensidades de señal resultantes para células marcadas y no marcadas.

Figura 17: (A) Imágenes por ultrasonidos del músculo cuádriceps de un ratón antes, inmediatamente después (0 h) y 2,5 horas después de la inyección de 5 mg de partículas de PFCE-Gd (flecha). El ratón no tenía trabas y se permitió que se moviera libremente después de la inyección. (B) Imágenes por ultrasonidos de alta frecuencia del nódulo linfático inguinal de un ratón antes (izquierda) y después (derecha) de la inyección de 0,1 mg de partículas de PFCE-Gd. El contraste medio del nódulo cambió desde 230 hasta 2662 unidades arbitrarias después de la inyección. (C) Se inyectaron a los ratones 20 mg partículas de PFCE-Gd s.c. y se monitorizaron durante 2 semanas. Las imágenes (de arriba abajo) muestran los riñones, bazo, hígados y nódulos linfáticos inguinales ipsilaterales de drenaje y contralaterales de control de un ratón de control y dos ratones inyectados. Además, los ratones no mostraron ningún cambio en el peso o el comportamiento (no mostrado).

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de partículas que comprenden perfluoro-éter 15-corona-5.

Se disolvió PLGA (0,09 gramos) en 3 ml diclorometano en un tubo de vidrio. Se añadió perfluoro-éter 15-corona-5 líquido (890 microlitros) seguido por 50 ml de una disolución de Prohance® (una disolución 3 mg/ml de gadoteridol) diluido en agua. Opcionalmente, pueden añadirse agentes adicionales, tales como un colorante fluorescente, al fluorocarbono en esta fase. Si se requería una partícula fluorescente, se añadió 1 mg de IgG o IC-Green (verde de indocianina, Akorn Pharmaceuticals) a la disolución.

Tal como se detalla a continuación en el presente documento, se prepararon partículas con un contenido alto, medio y bajo de gadolinio. Para ese fin, la disolución mencionada anteriormente de Prohance® en agua comprendía 11,5, 5,75 y 2,85 ml respectivamente de Prohance® añadido con agua hasta 50 ml de disolución. Entonces se añadió toda la mezcla gota a gota en 25 ml de una disolución de poli(alcohol vinílico) en agua (20 gramos/litro) bajo sonicación constante (sonicador digital Branson 250; ciclo de 3 minutos con 60 s encendido y 10 s apagado y temperatura máxima de 20 grados Celsius y amplitud del 30%; se usó una copa de cuerno). Entonces se colocó la emulsión resultante a 4 grados Celsius y se permitió que se evaporara con agitación constante durante aproximadamente 12 horas hasta que quedaban 24 ml de disolución. Entonces se colocó un volumen igual de agua y se centrifugó la emulsión a 21000 g durante 30 minutos a 4 grados Celsius. Se lavó el sedimento con agua dos veces y se liofilizó la suspensión resultante a -60 grados Celsius, durante al menos 24 horas. Entonces se colocaron las partículas en tubos sellados y se almacenaron a -80 grados Celsius. A menos que se establezca otra cosa, las partículas usadas en los experimentos descritos en el presente documento son las partículas con el mayor contenido en gadolinio.

Ejemplo 2: Caracterización de partículas

Se encontró que las partículas tal como se prepararon anteriormente eran estables durante al menos un año cuando se mantuvieron a -20 grados Celsius en forma seca. Las partículas eran también estables en disolución a concentraciones de trabajo durante al menos 3 meses a menos 4 grados Celsius.

Se determinó el diámetro de partículas preparadas según el ejemplo 1 usando dispersión de luz dinámica (DLS) tal como se describió previamente (Biomaterials. Septiembre de 2010; 31(27):7070-7). La figura 1 muestra que el tamaño de partícula oscilada entre 80 y 500 nm con un pico nítido a 181 nm. La figura 1 muestra los resultados de 6 síntesis individuales e independientes. Los resultados son idénticos; todas las curvas se solapan esencialmente, indicando una alta reproducibilidad. La distribución de diámetro de partícula permanecía estable durante varios meses. Se liofilizaron las partículas y se congelaron para su almacenamiento. Sin embargo, las partículas almacenadas como alícuotas en agua (congeladas) eran también estables.

Las partículas preparadas según el ejemplo 1 con un contenido en gadolinio alto y medio, disueltas en agua a una concentración de 1 mg/ml parecían ser excepcionalmente estables en las condiciones de obtención de imágenes por ultrasonidos. Se midieron el diámetro de partícula y la velocidad de recuento (indicativa del número de partículas) antes y después de la exposición a MI de ultrasonidos bajo y alto (MI=0,1 y 2,0) durante 30 s. La velocidad de recuento indica aproximadamente el número de partículas por muestra, y por tanto si las partículas se destruyeron por los ultrasonidos. El gráfico de velocidad de recuento indica que el aumento del contenido en Gd mejora la estabilidad de las partículas a la exposición a ultrasonidos. No se encontraron cambios en el diámetro, la velocidad de recuento o PDI (indicativo de la dispersión de la distribución de diámetro) tras la exposición a ultrasonidos de alta energía durante 30 s (figura 3).

Se concluye a partir de los datos presentados en la figura 3 que las partículas según la invención son estables incluso en las condiciones de ultrasonidos más duras y que el aumento del contenido en Gd mejora la estabilidad de las partículas a la exposición a ultrasonidos.

Ejemplo 3: Obtención de imágenes por ultrasonidos *in vitro*.

Se usó un transductor de matriz lineal (L11-3) con frecuencia central de 7,5 MHz para todas las exploraciones de ultrasonidos (SONOS 7500, Philips Medical Systems, Best, Países Bajos). El MI era variable, desde 0,1-2,0, tal como se indica. La ganancia se fijó normalmente al 90%.

Los simuladores de gel consistían en disolución del 8% de gelatina (Dr. Oetker, Ede, Países Bajos) y el 2% de agar (Agar Powder CMN, Boom, Meppel, Países Bajos) (estos geles se mostraban brillantes en las imágenes por ultrasonidos).

Se realizó la exposición a ultrasonidos a un índice mecánico (MI) que oscilaba entre 0,2 y 1. El MI es una métrica de seguridad que indica cuánta energía se transfiere al sujeto o muestra durante la obtención de imágenes; los límites clínicos son 1,9 para obtención de imágenes de diagnóstico y 1,0 para exploraciones obstétricas).

Ejemplo 4: Obtención de imágenes por ultrasonidos *ex vivo*

Se usó un transductor de matriz lineal (L11-3) con frecuencia central de 7,5 MHz para todas las exploraciones de ultrasonidos (SONOS 7500, Philips Medical Systems, Best, Países Bajos). El MI era variable, desde 0,1-2,0, tal como se indica. La ganancia se fijó normalmente al 90%.

Ejemplo 5: Obtención de imágenes por ultrasonidos *in vivo*

Se usó un transductor de matriz lineal (L11-3) con frecuencia central de 7,5 MHz para todas las exploraciones de ultrasonidos (SONOS 7500, Philips Medical Systems, Best, Países Bajos). El MI era variable, desde 0,1-2,0, tal como se indica. La ganancia se fijó normalmente al 90%.

Ejemplo 6: El gadolinio mejora la visibilidad a los ultrasonidos de las partículas.

Se prepararon partículas de PLGA/PFCE según el ejemplo 1 con un alto contenido en Gd y se sometieron a prueba para determinar su visibilidad a los ultrasonidos según el protocolo del ejemplo 3. Los resultados se muestran en la figura 2. Se muestra en la misma que la adición de gadolinio potencia la señal de ultrasonidos. Se concluye que la adición de gadolinio proporciona una mejora de la visibilidad a los ultrasonidos de partículas que comprenden un compuesto orgánico fluorado.

Ejemplo 7: Cuantificación.

Se sometieron a prueba partículas de PLGA/PFCE preparadas según el ejemplo 1 con un alto contenido en Gd para determinar su visibilidad a los ultrasonidos según el protocolo del ejemplo 3. Se usaron diferentes concentraciones de partículas; 20, 2 y 0,2 mg/ml, diluidas en agua. Los resultados se muestran en la figura 4. Se muestra en la misma que la señal de ultrasonidos es proporcional a la concentración de partículas usada. Se concluye que las partículas según la invención son útiles en la obtención de imágenes por ultrasonidos cuantitativa. En experimentos independientes se confirmó que podrían visibilizarse tan sólo 200.000 células cuando se marcan con las partículas según la invención.

Ejemplo 8: Comparación con la técnica anterior

Se inyectaron partículas de PLGA que contenían PFCE líquido y cantidades altas, medias y bajas de gadolinio en hígado de cerdo y se visualizaron mediante ultrasonidos (MI = 0,2), esencialmente según el protocolo del ejemplo 4. Para comparación, también se inyectó en el hígado de cerdo BR14, una partícula comercialmente disponible (Bracco Diagnostics) de 3000 nm que comprende un núcleo de gas perfluorobutano.

Se observó una respuesta cuantitativa de las partículas que contenían Gd que no se destruyó tras la exposición a ultrasonidos. Cuantitativa en este sentido significa que la señal aumenta con el aumento del contenido en gadolinio de las partículas. Además, las partículas según la invención no producen una denominada sombra, tal como se obtiene habitualmente con partículas de núcleo de gas. Este efecto de sombra estaba notablemente presente por debajo del área de inyección de BR14 (figura 5). Se concluye que las partículas según la invención proporcionan propiedades ventajosas en comparación con la técnica anterior, tanto al nivel de una respuesta cuantitativa que no se destruye tras la exposición a ultrasonidos así como la ausencia de una sombra. Esto último permite un análisis mucho más detallado del área en investigación.

Ejemplo 9 Las partículas según la invención permanecen visibles a lo largo del tiempo.

Se inyectaron las partículas preparadas según el ejemplo 1 (5 mg de partículas con un alto contenido en gadolinio en 200 microlitros de agua) en el tejido hepático según el protocolo del ejemplo 4. Se inyectó agua como control. Los resultados en la figura 6 muestran que las partículas eran claramente visibles en tejido hepático incluso tras 2 horas a temperatura ambiente. Los agentes de contraste de la técnica anterior que comprenden un núcleo gaseoso tienen normalmente vidas útiles mucho más cortas especialmente tras la exposición a energía de ultrasonidos [Phys Med Biol. 21 de marzo de 2009; 54(6):R27-57]. Se concluyó a partir de los datos de la figura 6 que las partículas según la invención proporcionan una señal duradera en la obtención de imágenes por ultrasonidos. También se observa la ausencia de un efecto de sombra en este experimento.

Ejemplo 10: comparación cara a cara con partículas de la técnica anterior

Se compararon muestras que contenían agentes de contraste de la técnica anterior con los agentes de contraste según la invención. Se expusieron los agentes tal como se indica (BR14 en la figura 7, Sonovue en la figura 8 y partículas de PLGA que contienen PFCE y alto contenido en gadolinio en la figura 9) a ultrasonidos y se registraron y se representaron gráficamente los ecos resultantes. El modo A o modo de amplitud es una técnica de caracterización de ultrasonidos convencional. El eje y representa la amplitud de la señal recibida y el eje x es el tiempo. También se generan ecos a partir de las paredes del recipiente y otras superficies de contacto. La región relevante (que contiene la muestra) se indica mediante un recuadro en las imágenes. Se muestran datos a 4 voltajes diferentes (equivalentes a diferentes valores de MI). Las representaciones gráficas se muestran para microburbujas de BR14 y SonoVue (ambos disponibles comercialmente) y partículas de PLGA/PFCE más Gd, preparadas tal como se describe en el ejemplo 1.

Todas las estaban a 5 mg en 200 ul. Se colocaron las muestras en soportes en un tanque de agua con un transductor enfocado a 5 MHz (Panametrics NDT A308S, 1,5 pulgadas de distancia focal). Se conectó el transductor a un receptor de pulsos (Squarewave 5066PR) activado por un generador de retardos para funcionar en pulsos individuales (generador de retardos BNC modelo 575). La salida del receptor se encaminó a un osciloscopio (Tektronix 4034) fijado en modo individual. Se fijó el foco al centro del soporte(es decir, a la muestra) y se registró la señal dispersada hacia atrás. Se fijó la frecuencia a 5-6 MHz (frecuencia del centro del transductor) y se varió el voltaje aplicado desde 100-400 V. Se procesaron los datos obtenidos usando una transformada de Hilbert.

Los datos muestran que las partículas que contienen gadolinio según la invención tienen un rendimiento comparable si no superior en comparación con los agentes comerciales. Además, los agentes comerciales se destruyeron por el experimento pero las partículas según la invención no.

Ejemplo 11 Marcaje celular.

Se marcaron células dendríticas (DC) humanas primarias con las partículas esencialmente tal como se describe en Biomaterials. Septiembre de 2010; 31(27):7070-7 y NMR Biomed. Septiembre de 2012; 25(9):1095-103. En los mismos, el marcaje de células se describe con partículas de PLGA que comprenden policarbonos fluorados sin metal en el núcleo. Se encontró que el metal adicional tal como se usa en las partículas según la invención no tenía efecto sobre la viabilidad, el fenotipo, la funcionalidad y la capacidad migratoria de las células. Además, la captación celular de las partículas no se ve afectada por el contenido en metal de la partícula. Esto no es sorprendente ya que sólo se expone el PLGA. Además, el contenido en metal real de las partículas es minúsculo y no se espera que afecte a las células. La carga de gadolinio total suministrada por millón de células es casi 100 veces menor que la dosis clínica aprobada de gadolinio para uso *in vivo*.

Se obtuvieron imágenes de 10 millones de células dendríticas (DC) marcadas colocándolas en pocillos en gel de agarosa. En este caso, se obtuvieron imágenes del fondo del pocillo ya que las células se asientan muy rápidamente en el fondo. Los resultados se muestran en figura 10. Se concluye que las células pueden visualizarse bien usando partículas según la invención en obtención de imágenes por ultrasonidos.

Ejemplo 12 Obtención de imágenes celulares multimodal

Se visualizaron células marcadas con partículas según la invención *ex vivo* con obtención de imágenes por ultrasonidos, obtención de imágenes por fluorescencia e IRM.

Se prepararon partículas que contenían un colorante fluorescente según ejemplo 1 y se usaron en obtención de imágenes multimodal. Los resultados se muestran en la figura 11. Se concluye que las partículas según la invención son visibles con ultrasonidos e IRM (tanto 1H como 19F) y si contienen un colorante adicional, también en obtención de imágenes por fluorescencia. Imagen de ultrasonidos: Las células son los puntos blancos brillantes. Fluorescencia: El asterisco (*) indica las células. La presencia del colorante fluorescente, ICG, permite la obtención de imágenes por fluorescencia. IRM: se produce contraste de T1 (flecha) debido al Gd, y la señal de 19F surge del PFCE (color falso).

10 Ejemplo 13 Análisis histológicos y de microscopía

Se prepararon partículas que contenían un colorante fluorescente según ejemplo 1 y se usaron en análisis histológicos, esencialmente tal como se describe en Biomaterials. Septiembre de 2010; 31(27):7070-7 y NMR Biomed. Septiembre de 2012; 25(9):1095-103. En el mismo, el marcaje de células se describe con partículas de PLGA que comprenden policarbonos fluorados sin metal en el núcleo. No se encontraron diferencias en el comportamiento intracelular e *in vivo* de las partículas según la invención y se concluye que la adición de un colorante fluorescente a las partículas de la invención permite un estudio intracelular de las partículas, así como un análisis histológico tras la transferencia *in vivo*.

20 Ejemplo 14 Obtención de imágenes *in vivo*

Se prepararon partículas según el ejemplo 1 con un alto contenido en gadolinio. Se inyectaron cinco mg de partículas en el músculo cuádriceps y se obtuvieron imágenes por ultrasonidos según el protocolo del ejemplo 5. La figura 12 muestra los resultados antes de la inyección, inmediatamente después de la inyección y 2,5 horas tras la inyección. Puede concluirse a partir de la figura 12 que las partículas son fácilmente visibles *in vivo* y que el contraste debido a las partículas persiste, incluso tras 2,5 horas *in vivo*.

30 Ejemplo 15 Experimentos adicionales

Las partículas consisten en PLGA que atrapa un PFC, con un diámetro de alrededor de 200 nm. Pueden añadirse restos adicionales tales como colorantes fluorescentes o quelatos de metales solubles. Se puso el foco sobre partículas (figura 13A) que contenían perfluoro-éter 15-corona-5 (PFCE) como PFC, gadoteridol (un quelato de Gd soluble; Bracco Diagnostics Inc.) ya que esta combinación daba como resultado el mejor contraste para ultrasonidos y ¹⁹F-IRM. También se incluye el colorante fluorescente IC-Green (Akorn Inc.), pero no necesariamente para contraste acústico. Se sometieron a prueba partículas de PLGA similares con diferentes PFC *in vitro* en un simulador de gel a diversos valores del índice mecánico (MI) (figura 13B). Se encontró que las partículas de PFCE con el quelato de Gd (PFCE-Gd) mostraban el contraste más alto a todos los MI. También se encontró que el contenido en Gd afecta al contraste de ultrasonidos (figura 13C), en donde se sometieron a prueba concentraciones de 40, 20, 10 y 0 mg de Gd por mg de partículas de PFCE; el contenido en Gd más alto da como resultado el mejor contraste. El contenido en 19F de las partículas permaneció constante a 8×10^{18} 19F/mg. En este caso, se usaron microburbujas de BR14 (Bracco) como referencia (microburbujas de gas perfluorobutano con una distribución promedio de aproximadamente 3000 nm). Se usaron partículas de PFO como control negativo. Además, las partículas demuestran una alta razón de dispersión con respecto a atenuación (STAR) deseable que está indicada por la región de atenuación más pequeña bajo las partículas (resaltada bajo BR14 en la imagen). Todos los experimentos adicionales se llevaron a cabo con partículas de PFCE con el mayor contenido en Gd (PFCE-Gd_{hi}, a menos que se indique otra cosa). En las figuras 1d y e, se obtuvieron imágenes de las partículas o bien en simuladores de gel o bien tras inyección en una muestra de tejido *in vitro*. La figura 13D examina la relación entre la concentración de partículas y el contraste, con agua desgasificada como control negativo. Las intensidades de señal para regiones de interés (ROI) a lo largo de la muestras se representaron gráficamente para comparación. Se llevó a cabo un experimento similar usando sólo las partículas de PFCE-Gd inyectadas en tejido (figura 13E), en donde también existe una clara relación entre concentración y señal. Finalmente, se observaron los datos de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) de las partículas de PFCE-Gd superpuestas sobre imágenes de microscopía electrónica (EM) correspondientes. Se muestran las distribuciones para IC-Green, PFCE y Gd. El Gd, y en un menor grado IC-Green, parecen estar distribuidos por toda la partícula, mientras que el PFCE parece más concentrado a lo largo de la periferia, aunque todavía dentro de la matriz de PLGA. La distribución de Gd era diferente con partículas similares preparadas usando un quelato de Gd ligeramente diferente, gadobenato dimeglumina (MultiHance; Bracco), en donde el Gd se confinó a lo largo de la periferia de las partículas como con el PFCE (datos no mostrados). De manera interesante, estas partículas no mostraron contraste potenciado en imágenes por ultrasonidos.

60 Estabilidad de partículas

Se muestra que las partículas son estables a la insonación, incluyendo sonicación con sonda de energía extremadamente alta. Se inyectaron partículas de PFCE-Gd *in vitro* en una muestra de tejido, con agua corriente como control (flecha, figura 6). Se obtuvieron imágenes de la muestra inmediatamente, y 2 horas después, se dejaron a temperatura ambiente. No se observó ningún cambio en el contraste con respecto a las partículas. Todo el

contraste debido al agua corriente (a partir de burbujas de aire disuelto) se dispó inmediatamente tras la inyección, ya que el líquido se dispersa a través del tejido. Se midió el contenido en flúor de partículas que contienen PFCE, Gd y IC-Green o partículas con PFCE y IC-Green sólo usando 19F RMN, antes y después de la exposición a energía de ultrasonidos durante 60 segundos (figura 14A). Ningún cambio en el contenido en PFCE era evidente para ninguna partícula, indicando que el PFCE no se pierde durante la generación de contraste acústico, tal como puede si el PFCE se vaporiza. Además, no se observaron cambios en el diámetro de partícula, la velocidad de recuento media (indicativa del número de partículas por volumen unitario) y el PDI (una medida de la dispersión de la distribución de diámetro; figura 14B). Estos datos muestran que las partículas no se ven afectadas por la energía de ultrasonidos. La figura 14C muestra distribuciones de diámetro de gotita representativas para las partículas de PFCE-Gd antes y después de la insonación. No se produce ningún cambio en la distribución de diámetro de gotita debido a insonación. Se observó lo mismos cuando se observaron las partículas usando EM (figura 14E), aunque en este caso se expusieron las partículas a sonicación con sonda, lo que da como resultado una deposición de energía mucho más alta que la obtención de imágenes por ultrasonidos. Finalmente, las partículas pueden almacenarse fácilmente durante al menos 6 meses sin cambios en las características de DLS (no mostradas), como polvo liofilizado.

Caracterización acústica

Se midió el comportamiento de las partículas cuando se irradiaron mediante una onda de ultrasonidos de energía creciente (figura 15A), junto con microburbujas de Sonovue (Bracco; burbujas de hexafluoruro de azufre con distribución promedio de 2500 nm). La respuesta para microburbujas colapsa rápidamente ya que la presión aumenta debido a la pérdida de burbujas, mientras que las partículas muestran una respuesta creciente. Se usó como control PFCE líquido puro. Las otras partículas sometidas a prueba son PFCE y PFCE con un contenido en Gd alto y bajo (PFCE-Gd_{hi} y PFCE-Gd_{lo}).

Se cuantificó la actividad acústica y la ecogenicidad de las partículas usando un método basado en la fuerza de radiación acústica¹⁶. La señal dispersada hacia atrás mediante un agente de contraste de ultrasonidos y la fuerza de radiación que actúa sobre la misma tienen el mismo origen y por tanto puede lograrse una medida del coeficiente de dispersión midiendo el desplazamiento en un campo acústico definido (figura 15B). Se usó un elemento piezoeléctrico para generar una onda estacionaria en un capilar de vidrio cuadrado, con partículas dispersadas de manera homogénea. La creación de una onda estacionaria de ultrasonidos induce migración hacia el nodo de presión o antinodo ubicado en el medio y los lados del canal respectivamente en el plazo de unos pocos segundos. Se registró el movimiento de las partículas con una cámara de alta velocidad y se analizó (figura 15C).

Las fuerzas que actúan sobre una partícula al azar en un campo acústico incluyen la fuerza de arrastre¹⁷, la fuerza de masa añadida que describe la aceleración del fluido circundante posteriormente al movimiento¹⁸ de la partícula y la fuerza de radiación que dirige el movimiento de la partícula. La ecuación de conservación del momento puede escribirse a partir de estas tres fuerzas con el fin de determinar la trayectoria de una partícula de tamaño dado. En una primera aproximación, se supone que las partículas obedecen la teoría bien aceptada que describe la interacción de una esfera rígida con un campo acústico al azar¹⁶. La fuerza de radiación puede descomponerse en dos participaciones procedentes de la descomposición del campo sobre los armónicos esféricos en donde f_1 sólo depende de la densidad relativa y f_2 sólo de la capacidad de compresión relativa. La fuerza de radiación (F_r) sobre una partícula en una onda estacionaria es entonces:

$$F_r = \frac{V_p P_a^2}{4\rho_0 c_0^2} \left[f_1 + \frac{3}{2} R_{eal}(f_2) \right] \sin(2ky)$$

en donde ρ_0 es la densidad de masa del fluido, P_a es la presión de la onda acústica, V_p el volumen de la partícula, c_0 la velocidad del sonido en el fluido y k el vector de onda.

Puede mostrarse que para una nanopartícula de polímero la parte imaginaria del coeficiente f_2 puede ser insignificante. La presión dispersada hacia atrás se refiere entonces a la fuerza de radiación en la dirección del transductor mediante:

$$p_{sc} = \frac{P_a}{r} \frac{k\rho_0 c_0^2}{\pi} \frac{Fr \left(y = \frac{\lambda}{8} \right)}{P_a^2}$$

A partir de esta expresión, la sección transversal de la dispersión en intensidad puede definirse como la potencia dispersada total con respecto a la intensidad de entrada:

$$\sigma_{sc} = \left(\frac{r p_{sc}}{P_a} \right)^2 = \left(\frac{k \rho_0 c_0^2 Fr \left(y = \frac{\lambda}{8} \right)}{\pi P_a^2} \right)^2$$

El contraste de ultrasonidos se origina a partir de la onda de presión reflejada por superficies de contacto no planas o dispersada a partir de pequeños dispersores o bien presentes en los tejidos o bien inyectados artificialmente. La dispersión de las partículas puede producirse a través de dispersión geométrica, que es el caso para la mayoría de las partículas y corresponde a la teoría presentada en las ecuaciones, o comportamientos de vibración resonante para burbujas de contraste que dispersan por ejemplo una onda acústica mediante vibraciones radiales de amplitud alta. La sección transversal de la dispersión representa entonces la sección eficaz sobre la que la partícula que va a reemitirse absorbe la intensidad acústica de una manera esférica y está relacionada cuadráticamente con la generación de contraste. La sección transversal eficaz para las muestras se presenta en la figura 15D. La línea azul discontinua representa el comportamiento de dispersión de una burbuja recubierta normalmente usada para la generación de contraste de ultrasonidos según la teoría de Rayleigh-Plesset¹⁹. La dispersión geométrica para estas burbujas de contraste es menor que la dispersión por vibración en el intervalo considerado y es por tanto insignificante. Las partículas de PFCE-Gd, no PLGA o PFCE sólo, muestran un coeficiente de dispersión 8 órdenes de magnitud mayor que el predicho para una burbuja del mismo tamaño (figura 15D). De manera interesante, el coeficiente de dispersión de la mayoría de las partículas era similar al esperado para una burbuja recubierta de tamaño comparable. Sin embargo, tales burbujas pequeñas son altamente inestables y no pueden usarse en la práctica. Además la preparación de las partículas con PFCE modifica drásticamente su comportamiento y mejora su eficacia, particularmente tras la adición de Gd. Al contrario que las otras muestras, las nanopartículas a base de PFCE se desplazan hacia el antinodo de presión (figura 15C) como lo haría una burbuja pequeña y presentan un coeficiente de dispersión aumentado en 2 órdenes de magnitud en comparación con burbujas del mismo tamaño (figura 15D). La obtención de imágenes de velocidad ultra alta de las partículas²⁰ no mostró cambios en las partículas con la insonación (datos no mostrados).

25 *Marcaje celular y obtención de imágenes*

Se marcaron DC humanas tal como se usa en ensayos clínicos² y se obtuvieron imágenes de las mismas. No se observaron efectos sobre la viabilidad celular en relación con controles no marcados. El trabajo previo con partículas similares, excepto sin el quelato de Gd, no ha mostrado efecto del marcaje sobre las células con respecto a la expresión de marcadores de maduración, la capacidad para activar células T y la capacidad migratoria^{21, 22}. Se detectaron fácilmente células marcadas usando fluorescencia, MR y obtención de imágenes por ultrasonidos tras la inyección en una muestra de tejido *ex vivo* (figura 16A). Se inyectaron 2 millones de células marcadas. Se llevó a cabo en primer lugar obtención de imágenes por ultrasonidos, seguido por obtención de imágenes por MR y fluorescencia; la persistencia de la fluorescencia y particularmente la señal de ¹⁹F-IRM indica que las partículas no se dañan por la exposición a ultrasonidos. La figura 16B muestra 10 millones de DC en un simulador de gel, en donde las células o bien no se marcaron, se marcaron con partículas de PFO o bien con partículas de PFCE-Gd. De nuevo, queda claro que las células marcadas con partículas de PFCE-Gd muestran el mayor contraste. Finalmente, se realizó una serie de dilución de estas células y se obtuvieron imágenes usando ultrasonidos (figura 16C). Se obtuvieron imágenes de 3-0,2 millones de células marcadas o no marcadas. Se representa gráficamente la intensidad relativa para una ROI que abarca los pocillos, que muestra una clara potenciación del contraste.

45 *Obtención de imágenes in vivo y toxicidad*

Se inyectaron por vía intramuscular partículas de PFCE-Gd en un ratón (figura 17A). Se muestran imágenes antes, inmediatamente después y 2 horas después de la inyección. Se anestesió el ratón durante la inyección, pero entonces se le permitió que se recuperara antes de la siguiente sesión de obtención de imágenes. Por tanto, las partículas se dispersaron dentro del musculo en algún grado debido al movimiento del ratón. Además, no es posible obtener exactamente el mismo plano de obtención de imágenes que con las imágenes previas. A pesar de estos problemas, las partículas inyectadas son claramente detectables. Se adquirieron estas imágenes en un escáner de ultrasonidos clínico.

Se obtuvieron imágenes de las partículas tras inyecciones intranodales en ratones (figura 17B). Estas inyecciones imitan la situación clínica, en donde pueden inyectarse células directamente en los ganglios linfáticos de pacientes en terapia de vacunación con DC²³. Sin embargo, debido al pequeño volumen que puede inyectarse en ganglios linfáticos murinos (menos de 10 µl), sólo se inyectaron partículas (0,1 mg) en lugar de células. En estos experimentos, 0,1 mg corresponden a 100.000 células, dada una captación celular constante, mientras que normalmente se inyectan 3-15 millones de células en ensayos clínicos. Se llevó a cabo ultrasonidos de alta resolución a 21 MHz, con el fin de localizar los ganglios linfáticos que normalmente están 2 mm por debajo en su eje largo. El contraste medio del ganglio cambió más de 10 veces tras la inyección de las partículas. No se detectó contraste a las 18 horas tras la inyección (no mostrado). Tampoco se detectó señal de fluorescencia, incluso con ganglios linfáticos extirpados, lo que sugiere adicionalmente que las partículas se aclararon del nódulo inyectado.

Finalmente, se estudió la toxicidad de las partículas (figura 17C) en ratones en los que se inyectaron por vía subcutánea 20 mg de las partículas, que es una dosis muy grande. Los ratones se monitorizaron durante 2 semanas, en relación con controles no inyectados. No se observaron cambios en el peso, comportamiento o aspecto durante este período. En el punto final, se sacrificaron los ratones y se pesaron y examinaron sus órganos. No se observaron diferencias significativas en relación con animales de control; en particular, se examinaron estrechamente los riñones, los bazo, los hígados y los ganglios linfáticos drenantes. Tomados conjuntamente con la falta de efecto tras el marcaje celular y las evidencias de aclaramiento, estos datos indican que las partículas son biocompatibles.

10 Ejemplo 16 Procedimientos y métodos adicionales

Síntesis de partículas

Se obtuvieron partículas tal como se describió anteriormente²², con la adición de gadoteridol de ProHance (Bracco Imaging Europe, Ámsterdam). Brevemente, se añadió 1 g de poli(alcohol vinílico) disuelto en 50 ml de agua solo o en agua y ProHance, 1780 µl para Gd_{hi} y 1400 para Gd_{lo}, gota a gota a 180 mg de PLGA (Resomer RG 502 H, razón molar de lactida:glicolida de 48:52 a 52:48; Boehringer Ingelheim, Alemania) disuelto en diclorometano con 890 µl de PFCE (Exfluor Inc, Texas EE.UU.) o 232 µl DE PFO (Perfluron, Alcon Inc), en hielo, con sonicación usando un dispositivo Digital Sonifier 250 (Branson, Danbury, EE.UU.) con una copa de cuerno que oscila a una potencia de 40% durante 2 minutos en impulsos de 10 segundos. Se realizó dispersión de luz dinámica en un dispositivo Zetasizer Nano de Malvern. Se midió el contenido en Gd usando espectrometría de masas. Las partículas de PFCE-Gd_{lo} contienen 20 µg/mg y las de PFCEGd_{hi} 40 µg/mg.

Obtención de imágenes in vitro

Se llevó a cabo obtención de imágenes por ultrasonidos *in vitro* en muestras en un simulador de gel o inyectado en tejido hepático bovino usando un dispositivo de exploración SONOS 7500 de Philips usando un transductor de matriz lineal (11-3L) con una frecuencia central de 7,5 MHz. Los valores de MI se limitaron a 0,2. Se usó un transductor de matriz lineal (L11-3) con frecuencia central de 7,5 MHz para las exploraciones de ultrasonidos (SONOS 7500, Philips Medical Systems, Best, Países Bajos). El MI era variable, desde 0,1-2,0, tal como se indica en el texto. La ganancia se fijó normalmente al 90%.

Los simuladores de gel consistían en disolución del 8% de gelatina (Dr. Oetker, Ede, Países Bajos) y el 2 % agar (Agar Powder CMN, Boom, Meppel, Países Bajos) en peso (estos geles se mostraron brillantes en las imágenes por ultrasonidos), o criogel de poli(alcohol vinílico) (se calentó el 15% en peso de PVA (Boom, Meppel, Países Bajos), el 20% en peso de líquido de enfriamiento (Koelvroestof Basic Safe, Halfords, Países Bajos) y el 65% en peso de agua hasta -90 grados Celsius en un cilindro cerrado hasta que se formó un líquido homogéneo. Tras verter en un molde y un ciclo de congelación-descongelación (12 horas a -25°C y posteriormente 12 horas a 20°C)). Se llevaron a cabo análisis en el contraste (figura 13D) trazando una región de interés sobre los pocillos y midiendo la intensidad de píxel promedio usando el dispositivo Image J (Institutos Nacionales de Salud estadounidenses, Bethesda, Maryland, EE.UU.).

Se realizó obtención de imágenes por MR y espectroscopía en un sistema de MR 11.7T (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania), equipado con un imán con perforación horizontal, usando una bobina de volumen doble de 1H/19F. Los ajustes de imagen fueron TR/TE de 800/10,5 ms, vóxeles de 2x2x2 mm, matriz de 256x128 y 2 promedios para 1H usando una secuencia espín eco; 960/46 ms, vóxeles de 4x4x4 mm, matriz de 64x32, 512 promedios usando una secuencia RARE con un factor 8 de RARE.

Para la obtención de imágenes por fluorescencia, se colocaron ratones o tubos de muestra en un dispositivo FluorVivo 300 (INDEC BioSystems, Santa Clara, CA, EE.UU.). Los tiempos de exposición fueron de entre 0,05 y 0,15 s.

Aislamiento y marcaje celulares

Se aislaron DC humanas primarias de sangre de donante tal como se describe²¹, y se marcaron con 5 mg de partículas por millón de células los días 3-8 del periodo de cultivo *in vitro*. Se lavaron las células minuciosamente (tres veces) antes de su uso. Se contaron las células viables usando un contador de células con exclusión de azul de tripano.

Obtención de imágenes in vivo

Se alojaron ratones en condiciones especificadas libres de patógenos en el Central Animal Laboratory (Nijmegen, Países Bajos). Todos los experimentos se realizaron según las directrices para el cuidado de animales del Nijmegen Animal Experiments Committee. Se llevó a cabo la obtención de imágenes por ultrasonidos *in vivo* usando un sistema VisualSonics Vevo 2100 con un transductor MS550S. Se anestesió a los ratones usando isoflurano.

Se realizaron inyecciones intranodales con una jeringa de microlitros NanoFil (World Precision Instruments, Alemania) con guía microscópica.

Mediciones de EM y EDX

5 Se fijó la muestra sobre una placa de vidrio mediante la evaporación del líquido de suspensión. Entonces se depositó una capa de oro sobre la muestra antes de la observación mediante un microscopio electrónico de barrido ambiental FEI ESEM XL30 a 20 kV y ampliaciones de hasta 60.000x.

10 Se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) y TEM-EDS, TEM acoplada con espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDS) en un sistema del estado de la técnica 200 KV JEOL TEM 2100 con un punto de resolución de 0,24 nm. El microscopio está equipado con dos cámaras de Gatan: Gatan 833 Orius y Gatan 890 ultrascan para obtener la mayor resolución y sensibilidad a una tensión de aceleración de 200 kV y dos sistemas detectores, STEM y EDS (espectroscopía de rayos X por dispersión de energía) para el análisis elemental. Se usaron un portamuestras convencional para las mediciones de TEM y un portamuestras de berilio para las mediciones de EDS. Se prepararon las muestras colocando una gota (6 - 10 ul) de la disolución sobre una rejilla de Cu recubierta de carbono (200 de malla, EM science) y se secaron al aire. Las imágenes de TEM permitieron la visualización de las nanopartículas y su distribución de tamaño, mientras que la obtención de imágenes electrónica secundaria permitió el examen de la composición química de las nanopartículas y el mapeo elemental y la distribución de imágenes elemental.

Caracterización acústica

25 Los resultados presentados en la figura 15A se obtuvieron usando un receptor de generador de impulsos Panametrics 5077PR conectado a un transductor Panametrics 5MHz A308S. Un portamuestras que contenía cubetas de 4,4 mm de grosor estaba realizado de polidimetilsiloxano (PDMS) y se colocó en el foco del transductor. Para cada serie, se tomó una referencia de agua. La configuración experimental consistió en un capilar cuadrado de aproximadamente 380 micrómetros de tamaño unido a un cristal piezoeléctrico, con el fin de generar una onda estacionaria acústica en el capilar a la frecuencia de 1,94 MHz, tal como se representa en la figura 15B. El movimiento de las partículas se registra a 125 tramas por segundo mediante el uso de una cámara de alta velocidad photron APX conectada a un microscopio Olympus. Se usa un objetivo 10x para la visualización. Las señales se generaron con un generador de longitud de onda arbitraria Tabor AWG y se amplificaron con un amplificador de potencia ENI 350L. Debido a la rápida acumulación de emisión, los experimentos se realizaron a bajas presiones para limitar el efecto de la emisión en el fluido. El análisis se logra usando Matlab®. En particular, se obtienen las curvas PIV usando OpenPIV, un software gratuito. Se usaron dos métodos simultáneamente para analizar el registro óptico, para una mayor precisión. El primero es un análisis de PIV, que se basa en la correlación transversal de las submatrices de la imagen. Puede obtenerse un desplazamiento relativo a partir del análisis de PIV y reajustarse a la geometría conocida. Un segundo método se basa en la obtención del promedio en la dirección horizontal. Se añade la línea de píxel resultante a las anteriores en una trama individual, tal como se presenta en la figura 15C.

Prueba de toxicidad in vivo

45 Se inyectaron 20 mg de partículas s.c. en ratones, y se observaron los ratones durante 2 semanas en relación con los controles sin tratar. Se extrajeron los órganos para su observación y se pesaron tras el periodo de 2 semanas.

Ejemplo 17. Discusión adicional

50 Los PFC tienen propiedades acústicas únicas, especialmente con respecto a una velocidad de sonido muy baja²⁴ que puede influir en sus propiedades de contraste. Se han usado previamente gotitas de PFC para ultrasonidos, aunque estas requieren vaporización del PFC, y tienden a tener dimensiones submicrométricas^{7, 15, 25-28}. Los PFC también se han mezclado con metales para su uso como agentes de contraste, normalmente para IRM. Sin embargo, estos tienden a estar con nanopartículas metálicas sólidas, tales como cristales de óxido de hierro^{29, 30}. El papel de un quelato de Gd soluble, y específicamente gadoteridol en contraposición a otros quelatos similares, es evidente en los datos (por ejemplo, figura 13C), pero sigue sin estar definido. No hay bibliografía sobre la potenciación de señales acústicas usando quelatos metálicos solubles, aunque frecuentemente se usan partículas metálicas sólidas como CA de ultrasonidos^{29, 31-33}. Por tanto, actualmente no hay bibliografía sobre quelatos metálicos solubles que potencien PFC líquidos que permanecen en forma líquida, para ultrasonidos. Las pruebas de que PFCE permanece líquido en las partículas incluyen su alto punto de ebullición (145°C), la falta de cambios en los datos de DLS y EM, y el contenido en flúor (figura 14), y la capacidad para realizar ¹⁹F-IRM incluso después de la insonación (figura 16A).

65 Se observó de manera indiscutible la actividad acústica de las partículas y se midió en los experimentos presentados aún cuando el mecanismo preciso por el cual las partículas retrodispersan las ondas de ultrasonidos sigue siendo vago. Los registros de velocidad ultraalta²⁰ descartan cualquier acontecimiento de cavitación. Además, las bajas presiones usadas para la caracterización acústica (15 kPa) dejan poca posibilidad para efectos no lineales o cavitación. Por tanto, tienen que investigarse nuevos mecanismos. Este trabajo no puede realizarse con una

configuración típica de 90°, ya que las teorías predicen directividades de las ondas dispersadas, que también parecen indicadas por la baja sombra de las partículas (figura 13C). Se necesitará investigar teorías más complejas ^{34 35} con el fin de tener en cuenta los efectos potenciales de la cubierta sobre el comportamiento acústico. Un estudio acústico exhaustivo para desentrañar completamente el mecanismo físico, está más allá del alcance del trabajo actual. Por ahora, se sospecha una forma de resonancia no trivial de las partículas para explicar la fuerza de la señal recibida, ya que todas las resonancias mecánicas para este tipo de sistema se dan a frecuencias mucho más altas..

Las partículas de PLGA que contienen PFC han mostrado previamente una captación celular excelente con toxicidad mínima. De hecho, la carga de 19F celular, un parámetro clave para estudios de ¹⁹F-IRM, lograda con estas partículas es la mayor notificada hasta ahora ³⁶. No se espera que la adición del quelato de Gd afecte significativamente a la captación o a otras características de las partículas, debido a su concentración extremadamente baja. Además, el contenido en Gd es varias órdenes de magnitud menor que la dosis clínica recomendada actual (tabla 1). Lo mismo es cierto para PLGA, PFC y IC-Green (tabla 1). El aclaramiento de estos componentes también está bien estudiado. Esto es una ventaja importante con respecto a otros agentes de contraste de ultrasonidos estables, que normalmente son sólidos, tales como nanopartículas de oro o sílice ^{9 10 11}, y tienen tiempos de retención prolongados *in vivo* retención ¹² y menos aplicabilidad clínica ¹³.

Las partículas de PLGA de 200 nm con PFCE y quelato de Gd (Gadoteridol, Bracco) descritas en el presente documento producen alto contraste acústico, sin resultar afectadas por la energía de ultrasonidos. En particular, las partículas son lo suficientemente pequeñas como para dejar la circulación (una limitación importante de los agentes de microburbujas actuales, que se limitan a la circulación debido a su gran tamaño y su vida útil más corta). Además, las partículas también son estables a sonicación con sonda de alta energía (figura 14D). Tal estabilidad es esencial para aplicaciones a largo plazo tales como selección como diana *in vivo* para regiones fuera del endotelio, y para marcaje celular. También se ha demostrado que las partículas pueden usarse para la generación de contraste a altas frecuencias (figura 17B), lo que permite obtención de imágenes a alta resolución y por tanto, el desarrollo de modelos animales pequeños para estudios de obtención de imágenes basados en ultrasonidos. Las partículas puede realizarse fácilmente para uso clínico en condiciones de GMP. Esto, junto con la falta de toxicidad observada tanto en células como *in vivo*, demuestra su idoneidad para uso humano. Las partículas de PLGA también se han aplicado ampliamente en la bibliografía a diversos usos tales como administración dirigida de fármacos y vacunas, y se han sometido a diversas modificaciones, incluyendo la adición de radioligandos³⁷ y el recubrimiento con PEG para obtener partículas “discretas” ³⁸. Puede controlarse la velocidad de degradación de partículas y la posterior velocidad de liberación de fármacos, tiempos de circulación y funcionalidades multimodales ^{39 22 40}. Todas estas modificaciones siguen siendo posibles con estas partículas, lo que permite su adaptación cuando es necesario.

La obtención de imágenes por ultrasonidos es idealmente adecuada para el estudio de agentes terapéuticos personalizados, pero su potencial no se ha explotado debido a la falta de agentes de contraste biocompatibles, estables, adecuados. Las partículas descritas en el presente documento pueden adaptarse fácilmente a la obtención de imágenes multimodal en aplicaciones clínicas y preclínicas, incluyendo seguimiento celular y administración de fármacos dirigida.

Tabla 1

Compuesto	Antes del uso humano	Dosis recomendada	Dosis estimada (por millón de DC)	Ruta de aclaramiento
PLGA	Soportes, partículas para administración de vacunas ⁴¹	Varía con la aplicación; normalmente 30 mg	< 1 mg	metabolismo celular normal
PFC, por ejemplo Perfluron (Alcon Inc)	cirugía ocular	8 mg	0,1 – 0,3 ng (dependiendo del subconjunto de DC)	exhalación en pulmones; los PFC no se metabolizan <i>in vivo</i>
Oxygent (Alliance Pharma)	sustituto sanguíneo	> 100 g		
PFCE	señal de ¹⁹ F-IRM	n/d		
Quelato de Gd, por ejemplo ProHance Multihance (ambos de Bracco)	Agente de contraste intravenoso para ¹ H-IRM	4000 mg	< 1 mg	eliminado por los riñones
IC-Green (pulsión)	contraste intravenoso	35 mg	< 5 mg	eliminado por los riñones

Bibliografía

1. Srinivas, M. *et al.* Imaging of cellular therapies. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1080-1093 (2010).

2. Aarntzen, E.H. *et al.* Early identification of antigen-specific immune responses in vivo by [18F]-labeled 3'-fluoro-3'-deoxy-thymidine ([18F]FLT) PET imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 18396-18399 (2011).
- 5 3. Aarntzen, E.H. *et al.* Targeting of 111In-labeled dendritic cell human vaccines improved by reducing number of cells. *Clin Cancer Res* 19, 1525-1533 (2013).
4. Qin, S., Caskey, C.F. & Ferrara, K.W. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering. *Phys Med Biol* 54, R27-57 (2009).
- 10 5. Sirsi, S. & Borden, M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble Sci Eng Technol* 1, 3-17 (2009).
6. Kiessling, F., Huppert, J. & Palmowski, M. Functional and molecular ultrasound imaging: concepts and contrast agents. *Curr Med Chem* 16, 627-642 (2009).
- 15 7. Reznik, N. *et al.* The efficiency and stability of bubble formation by acoustic vaporization of submicron perfluorocarbon droplets. *Ultrasonics* 53, 1368-1376 (2013).
8. Aggeli, C., Giannopoulos, G., Lampropoulos, K., Pitsavos, C. & Stefanadis, C. Adverse bioeffects of ultrasound contrast agents used in echocardiography: true safety issue or "much ado about nothing"? *Curr Vasc Pharmacol* 7, 338-346 (2009).
- 20 9. Delogu, L.G. *et al.* Functionalized multiwalled carbon nanotubes as ultrasound contrast agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 16612-16617 (2012).
- 25 10. Jokerst, J.V., Khademi, C. & Gambhir, S.S. Intracellular aggregation of multimodal silica nanoparticles for ultrasound-guided stem cell implantation. *Sci Transl Med* 5, 177ra135 (2013).
11. Chung, E., Nam, S.Y., Ricles, L.M., Emelianov, S.Y. & Suggs, L.J. Evaluation of gold nanotracers to track adipose-derived stem cells in a PEGylated fibrin gel for dermal tissue engineering applications. *Int J Nanomedicine* 8, 325-336 (2013).
- 30 12. Longmire, M., Choyke, P.L. & Kobayashi, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* 3, 703-717 (2008).
- 35 13. Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y. & Watari, F. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *J Hazard Mater* 170, 578-583 (2009).
14. Kang, S.T. & Yeh, C.K. Intracellular acoustic droplet vaporization in a single peritoneal macrophage for drug delivery applications. *Langmuir* 27, 13183-13188 (2011).
- 40 15. Strohm, E.M., Min Rui, Michael C Kolios, Ivan Gorelikov, Naomi Matsuura in *IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings* 495-498(2010).
- 45 16. Settnes, M. & Bruus, H. Forces acting on a small particle in an acoustical field in a viscous fluid. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 85, 016327 (2012).
17. Mettin, R. & Doinikov, A.A. Translational instability of a spherical bubble in a standing ultrasound wave. *Applied Acoustics* 70, 1330-1339 (2009).
- 50 18. Magnaudet, J. & Eames, I. The Motion of High-Reynolds-Number Bubbles in Inhomogeneous Flows. *Annual Review of Fluid Mechanics* 32, 659-708 (2000).
19. Leighton, T.G. *The Acoustic Bubble*. (Academic Press, 1996).
- 55 20. Gelderblom, E.C. *et al.* Branderis 128 ultra-high-speed imaging facility: 10 years of operation, updates, and enhanced features. *Rev Sci Instrum* 83, 103706 (2012).
21. Bonetto, F. *et al.* A large-scale (19)F MRI-based cell migration assay to optimize cell therapy. *NMR Biomed* 25, 1095-1103 (2012).
- 60 22. Srinivas, M. *et al.* Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using 19F MRI and optical imaging. *Biomaterials* 31, 7070-7077 (2010).
- 65 23. Aarntzen, E.H. *et al.* In vivo imaging of therapy-induced anti-cancer immune responses in humans. *Cell Mol Life Sci* 70, 2237-2257 (2013).

24. Strohm, E.M., Michael C. Kolios in IEEE International Ultrasonics Symposium 2368-2371(2011).
- 5 25. Matsunaga, T.O. *et al.* Phase-change nanoparticles using highly volatile perfluorocarbons: toward a platform for extravascular ultrasound imaging. *Theranostics* 2, 1185-1198 (2012).
26. Reznik, N. *et al.* Optical studies of vaporization and stability of fluorescently labelled perfluorocarbon droplets. *Phys Med Biol* 57, 7205-7217 (2012).
- 10 27. Sheeran, P.S., Luois, S.H., Mullin, L.B., Matsunaga, T.O. & Dayton, P.A. Design of ultrasonically-activatable nanoparticles using low boiling point perfluorocarbons. *Biomaterials* 33, 3262-3269 (2012).
28. Szijarto, C., Rossi, S., Waton, G. & Krafft, M.P. Effects of perfluorocarbon gases on the size and stability characteristics of phospholipid-coated microbubbles: osmotic effect versus interfacial film stabilization. *Langmuir* 28, 1182-1189 (2012).
- 15 29. Li, A. *et al.* Superparamagnetic perfluorooctylbromide nanoparticles as a multimodal contrast agent for US, MR, and CT imaging. *Acta Radiol* 54, 278-283 (2013).
- 20 30. Barnett, B.P. *et al.* Use of perfluorocarbon nanoparticles for non-invasive multimodal cell tracking of human pancreatic islets. *Contrast Media Mol Imaging* 6, 251-259 (2011).
31. Li, F. *et al.* Preparation of gold nanoparticles/functionalized multiwalled carbon nanotube nanocomposites and its glucose biosensing application. *Biosens Bioelectron* 24, 1765-1770 (2009).
- 25 32. Niu, C. *et al.* Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dualmode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes. *Biomaterials* 34, 2307-2317 (2013).
33. Niu, D. *et al.* Facile synthesis of magnetite/perfluorocarbon co-loaded organic/inorganic hybrid vesicles for dual-modality ultrasound/magnetic resonance imaging and imaging-guided high-intensity focused ultrasound ablation. *Adv Mater* 25, 2686-2692 (2013).
- 30 34. Strifors, H.C. & Gaunard, G.C. Differences in the acoustic echoes from submerged elastic shells containing different fluids. *Ultrasonics* 30, 107-112 (1992).
- 35 35. Kovalev, V.A. Matching of asymptotic approximations in the problem of the scattering of acoustic waves by an elastic spherical shell. *Journal of Applied Mathematics and Mechanics* 66, 581-590 (2002).
36. Srinivas, M., Boehm-Sturm, P., Figdor, C.G., de Vries, I.J. & Hoehn, M. Labeling cells for in vivo tracking using (19)F MRI. *Biomaterials* 33, 8830-8840 (2012).
- 40 37. D'Souza, M. & DeSouza, P. Preparation and testing of cyclosporine microsphere and solution formulations in the treatment of polyarthritis in rats. *Drug Dev Ind Pharm* 24, 841-852 (1998).
- 45 38. Avgoustakis, K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv* 1, 321-333 (2004).
39. Mahapatro, A. & Singh, D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology* 9, 55 (2011).
- 50 40. Jain, A.K., Das, M., Swarnakar, N.K. & Jain, S. Engineered PLGA nanoparticles: an emerging delivery tool in cancer therapeutics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 28, 1-45 (2011).
41. Lu, J.M. *et al.* Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn* 9, 325-341 (2009).
- 55 42. Hahn, T. *et al.* Visualization and quantification of intestinal transit and motor function by real-time tracking of 19F labeled capsules in humans. *Magn Reson Med* 66, 812-820 (2011).
- 60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una partícula de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) que comprende un perfluoro-éter corona y gadolinio para obtención de imágenes *in vitro*, en el que la obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en obtención de imágenes acústica, obtención de imágenes fotoacústica, obtención de imágenes por ultrasonidos y obtención de imágenes por coherencia óptica.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el perfluoro-éter corona se selecciona del grupo que consiste en perfluoro-éter 15-corona-5, perfluoro-éter 12-corona-4 y perfluoro-éter 18-corona-6.
3. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 2, en el que el gadolinio es un quelato de gadolinio.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que el quelato de gadolinio es gadoteridol.
- 15 5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, en el que la partícula comprende un agente de detección, tal como un colorante, tal como un colorante fluorescente o un radionúclido.
- 20 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5, en el que la partícula está comprendida en una materia particulada en la que el diámetro medio de partícula es un valor de entre 100 y 300 nanómetros, preferiblemente de entre 150 - 250 nanómetros, tal como 200 nanómetros.
- 25 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 6, en el que la partícula o materia particulada está esencialmente libre de tensioactivo o está libre de tensioactivo.
- 30 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7, en el que la obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en obtención de imágenes de diagnóstico, obtención de imágenes de metástasis o vasculatura, obtención de imágenes cuantitativa, obtención de imágenes cualitativa, obtención de imágenes de vacunas celulares, obtención de imágenes de agentes terapéuticos celulares, obtención de imágenes de vacunas de células dendríticas, obtención de imágenes de células madre y obtención de imágenes de células beta de islotes.
- 35 9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 8, en el que la obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en marcaje celular *in vitro*, microscopía *in vitro* e histología *in vitro*.
- 40 10. Partícula de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) que comprende un perfluoro-éter corona y gadolinio para su uso en la obtención de imágenes *in vivo*, en el que la obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en obtención de imágenes acústica, obtención de imágenes fotoacústica, obtención de imágenes por ultrasonidos y obtención de imágenes por coherencia óptica.
- 45 11. Partícula para su uso según la reivindicación 10, en la que el perfluoro-éter corona se selecciona del grupo que consiste en perfluoro-éter 15-corona-5, perfluoro-éter 12-corona-4 y perfluoro-éter 18-corona-6.
12. Partícula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en la que el gadolinio es un quelato de gadolinio.
- 50 13. Partícula para su uso según la reivindicación 12, en la que el quelato de gadolinio es gadoteridol.
14. Partícula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que la partícula comprende un agente de detección, tal como un colorante, tal como un colorante fluorescente o un radionúclido.
- 55 15. Partícula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en la que la partícula está comprendida en una materia particulada en la que el diámetro medio de partícula es un valor de entre 100 y 300 nanómetros, preferiblemente de entre 150 - 250 nanómetros, tal como 200 nanómetros.
- 60 16. Partícula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, en la que la partícula o materia particulada está esencialmente libre de tensioactivo o está libre de tensioactivo.
- 65 17. Partícula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-16, en la que la obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en obtención de imágenes de diagnóstico, obtención de imágenes terapéutica, obtención de imágenes de metástasis o vasculatura, obtención de imágenes cuantitativa, obtención de imágenes cualitativa, obtención de imágenes de vacunas celulares, obtención de imágenes de agentes terapéuticos celulares, obtención de imágenes de vacunas de células dendríticas, obtención de imágenes de células madre y obtención de imágenes de células beta de islotes.
18. Partícula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-17, en la que la obtención de imágenes se selecciona del grupo que consiste en marcaje celular *in vivo*, microscopía *in vivo*, obtención de

imágenes *in vivo* de vasculatura o perfusión e histología *in vivo*.

- 5 19. Partícula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-18, en la que la partícula comprende un agente terapéutico o un agente de selección como diana, tal como un fármaco, un ligando de receptor o un anticuerpo.

Figura 1

Resultados

	Tamaño (d.n...	% de intensidad	Anchura (d.n...
Promedio de Z (d.nm):	180.7	100.0	69.89
Pico 1:	198.4	0.0	0.000
Pico 2:	0.000	0.0	0.000
Pico 3:	0.000	0.0	0.000
Pdl:	0.129		
Ordenada en el origen:	0.941		
Calidad del resultado	Buena		

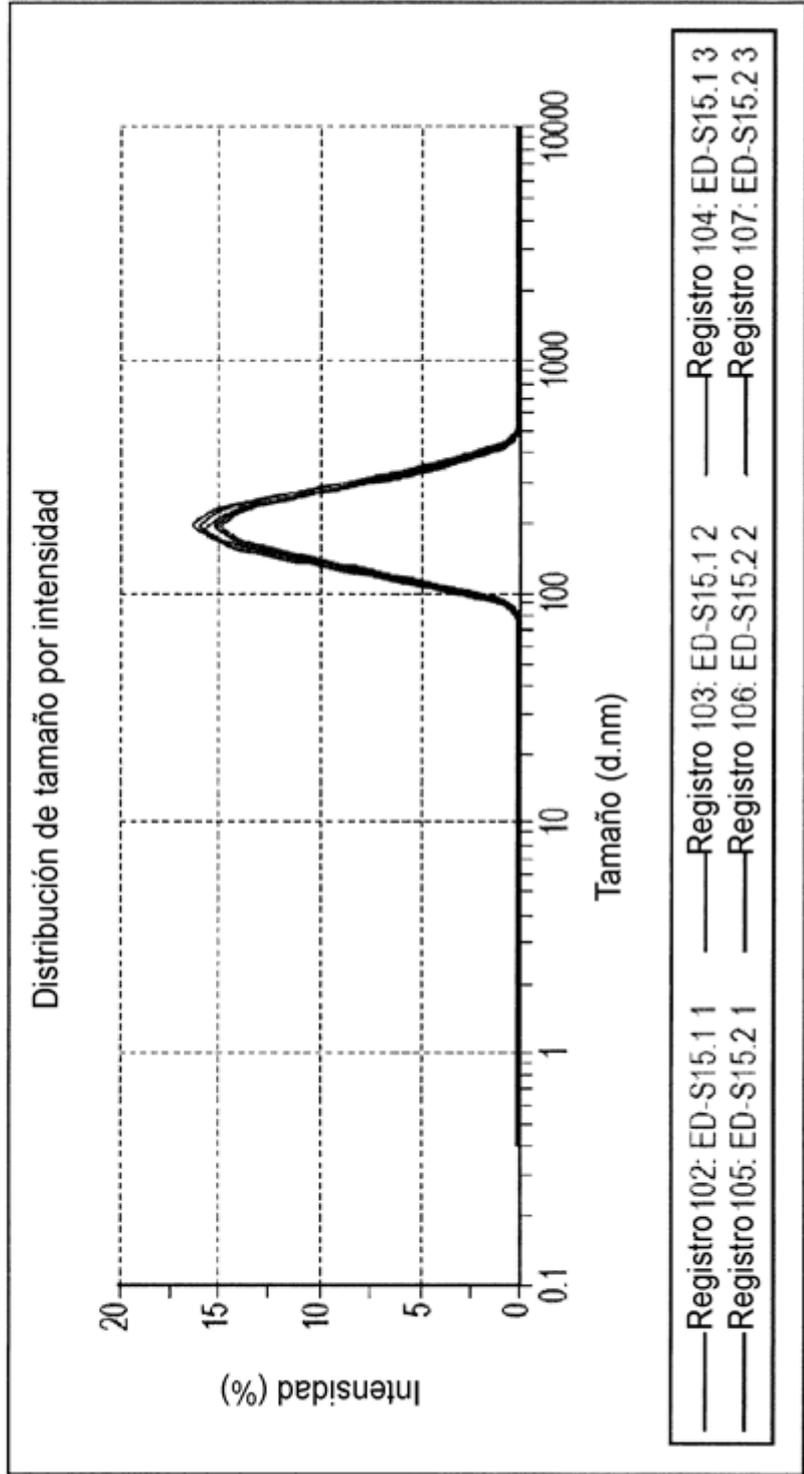
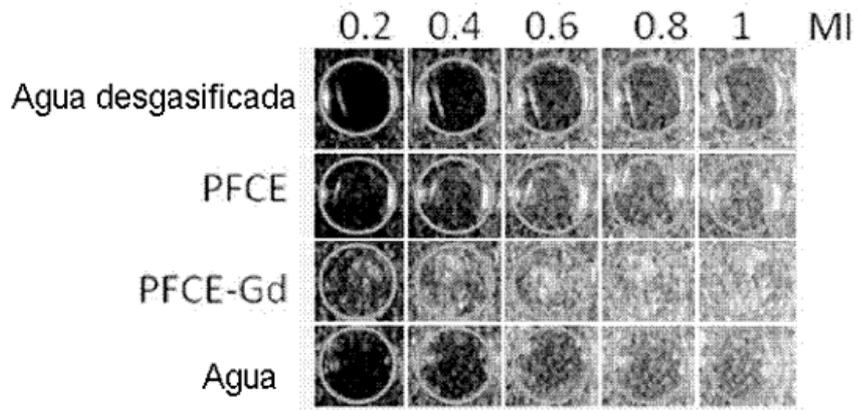


Figura 2



Muestra	0.2 (MI)	0.4	0.6	0.8	1
Agua desgasificada	-	-	-	-	-
PFCE	-	-	-	-	+
PFCE-Gd	+	+	+	+	+
agua (con burbujas de aire)	-	-	+	+	+

Figura 3.

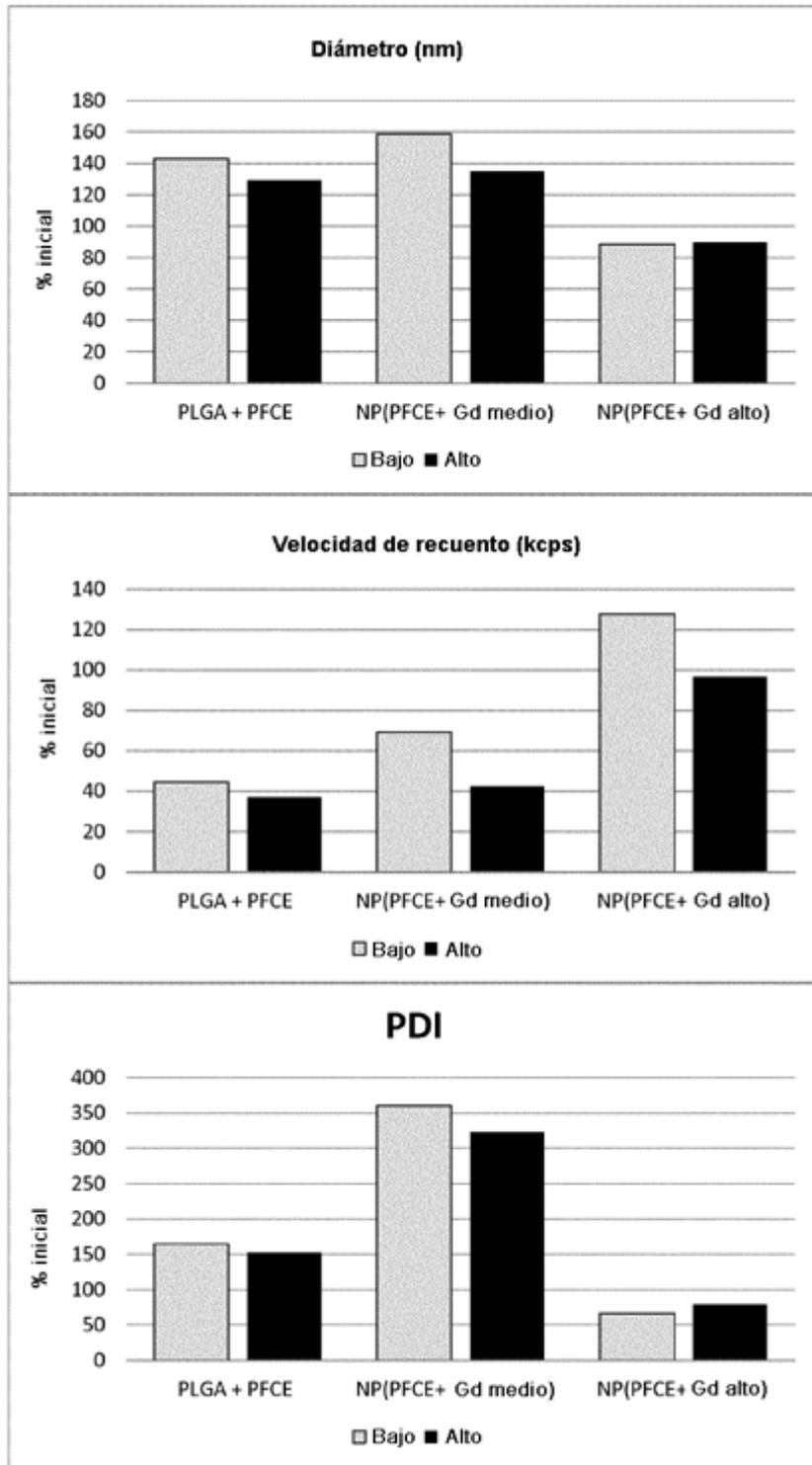


Figura 4

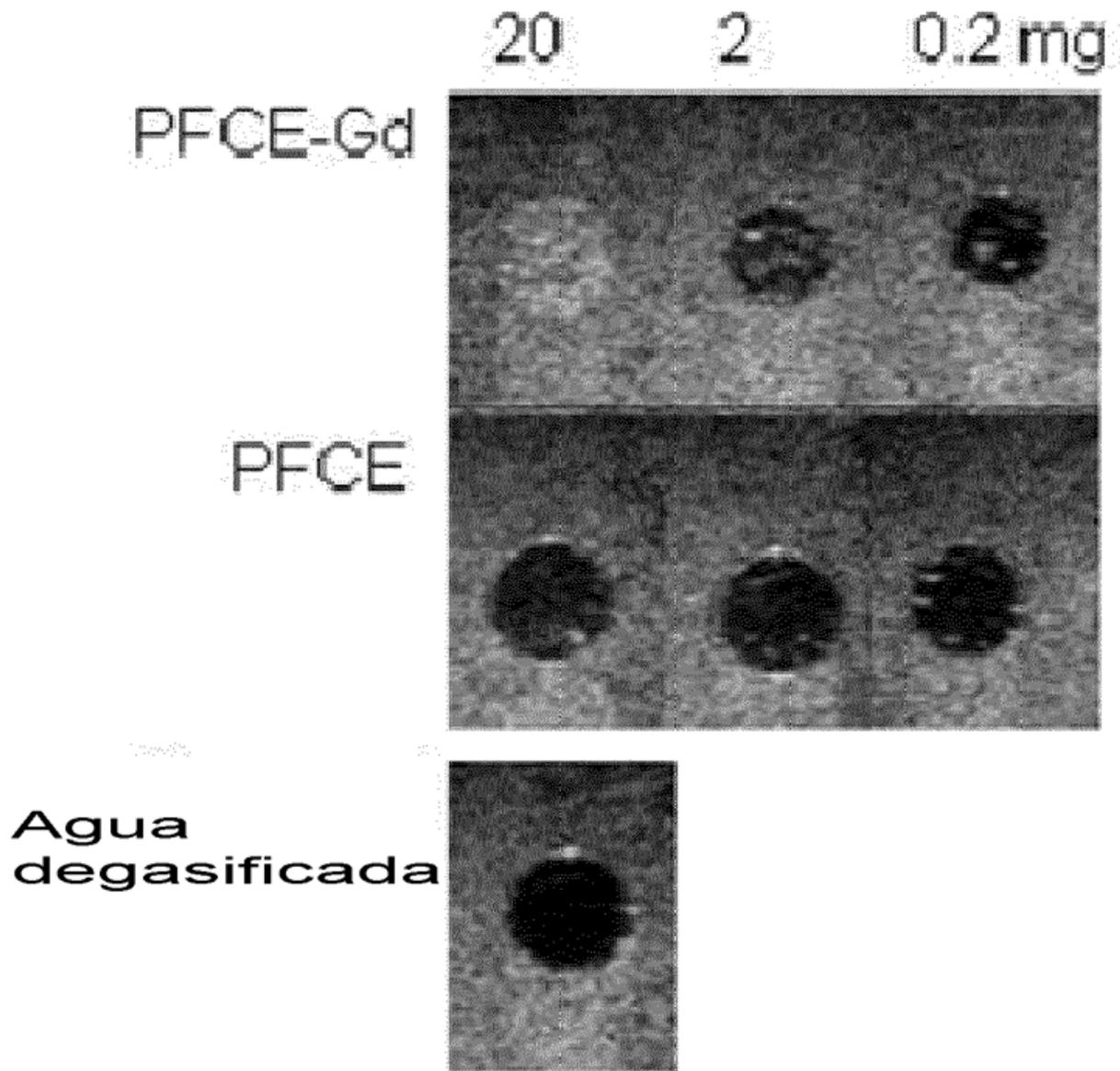


Figura 5

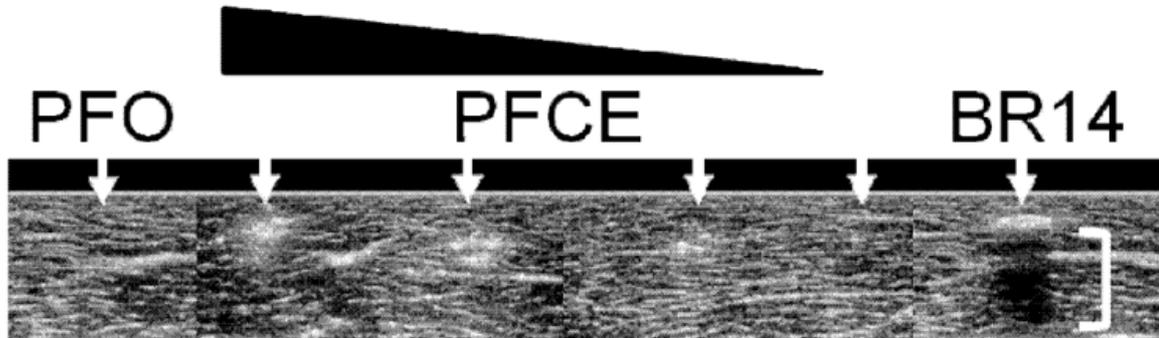
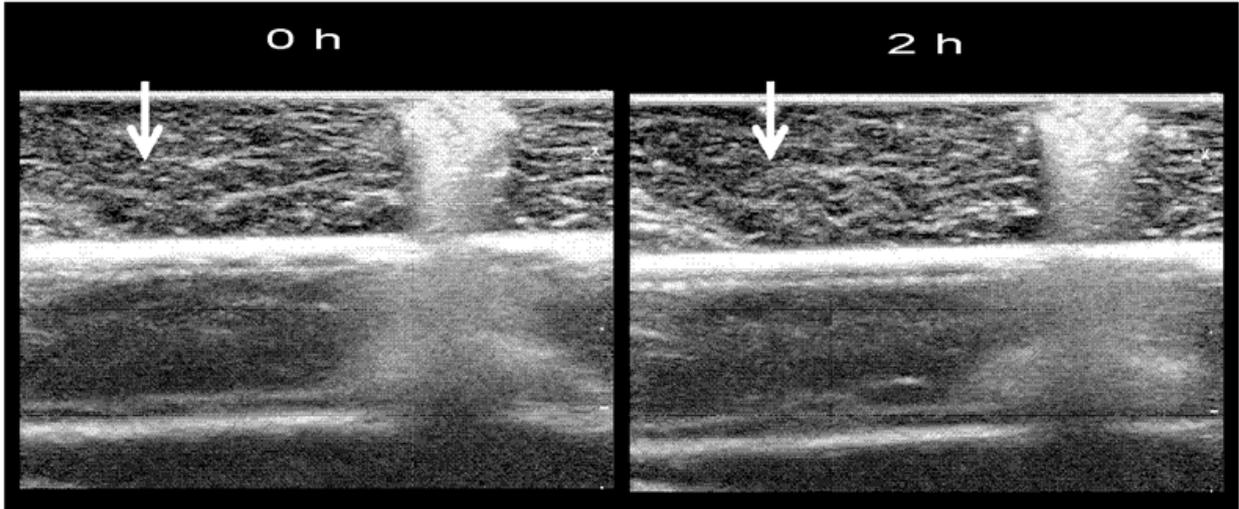


Figura 6



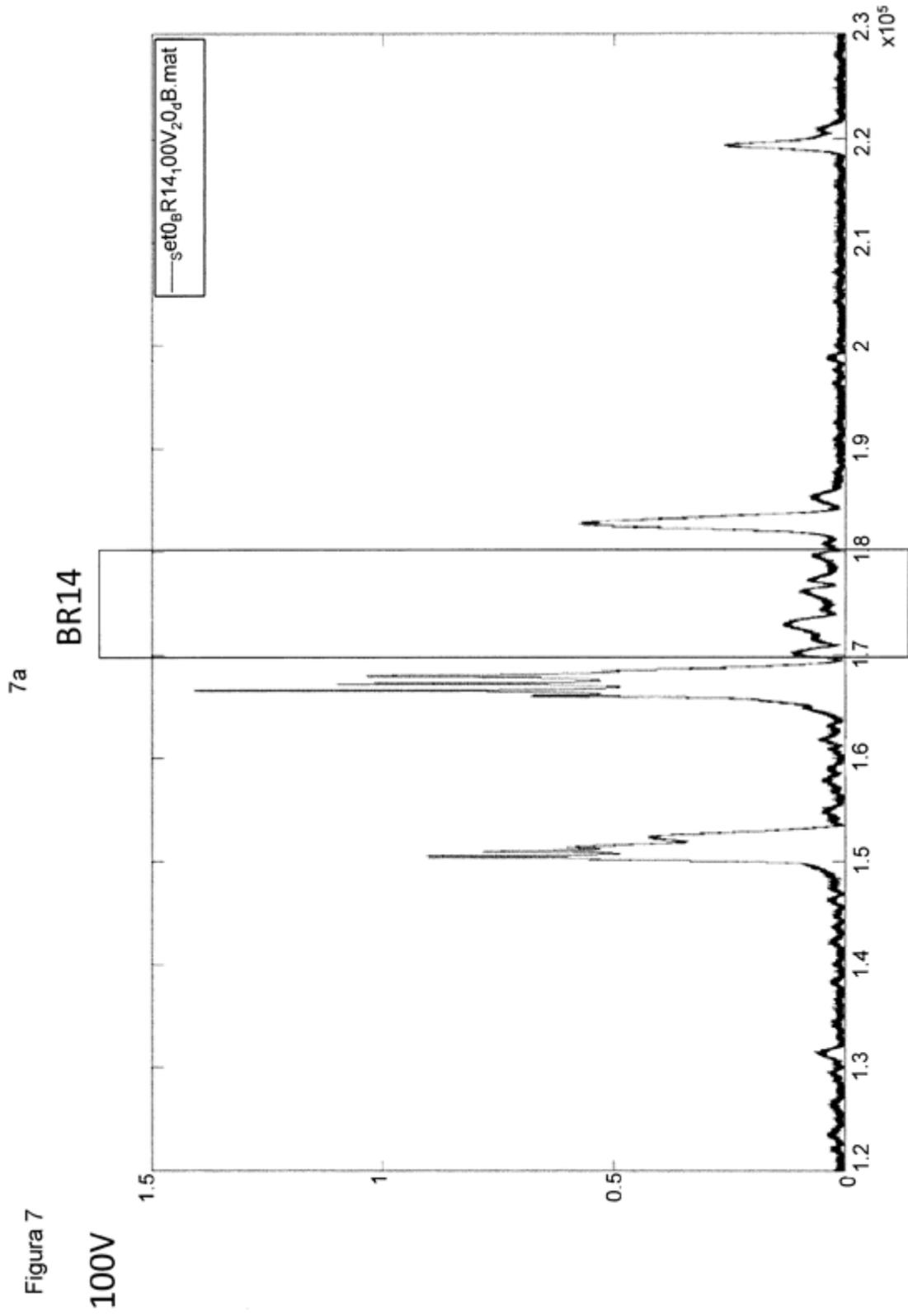
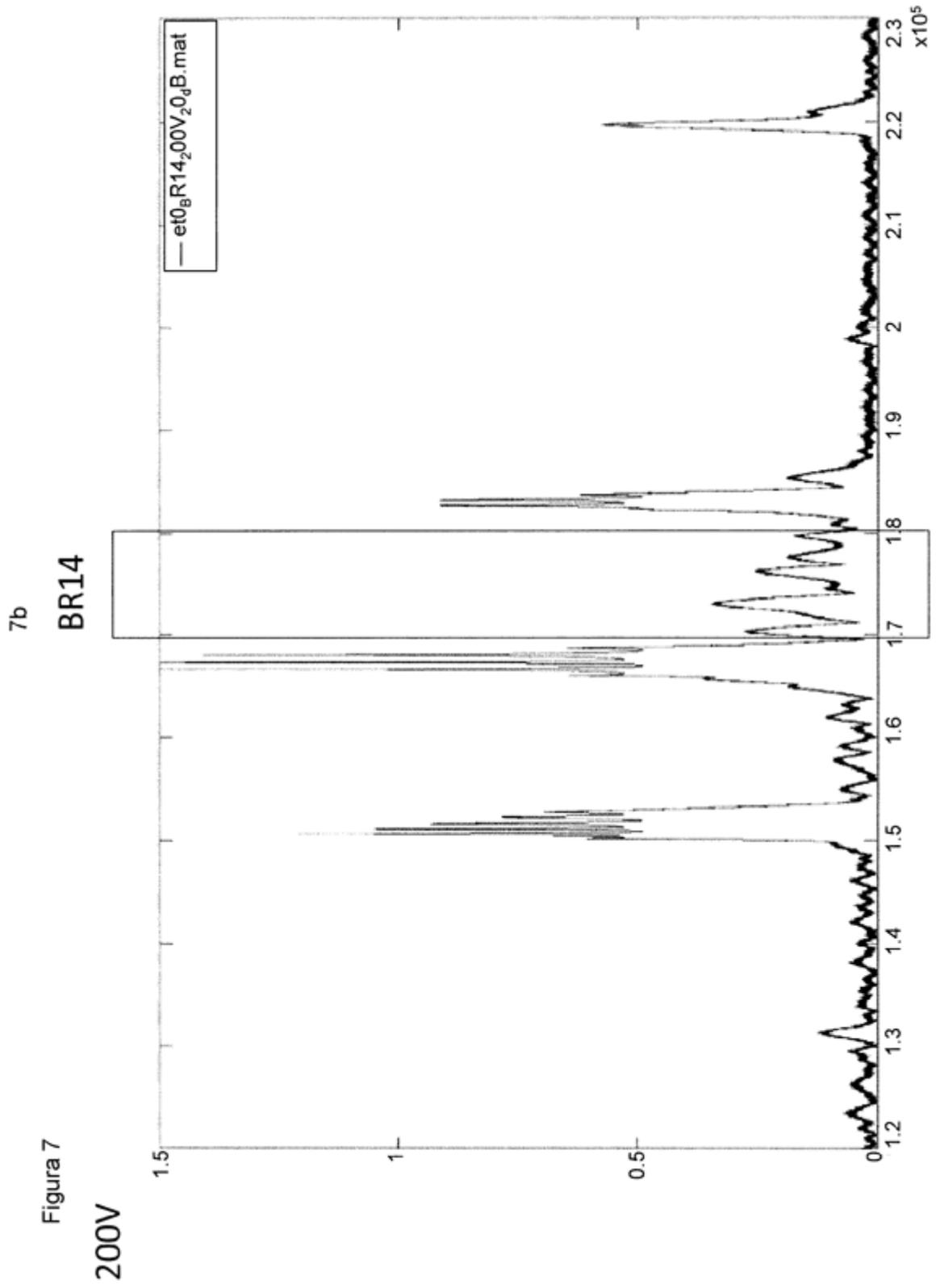
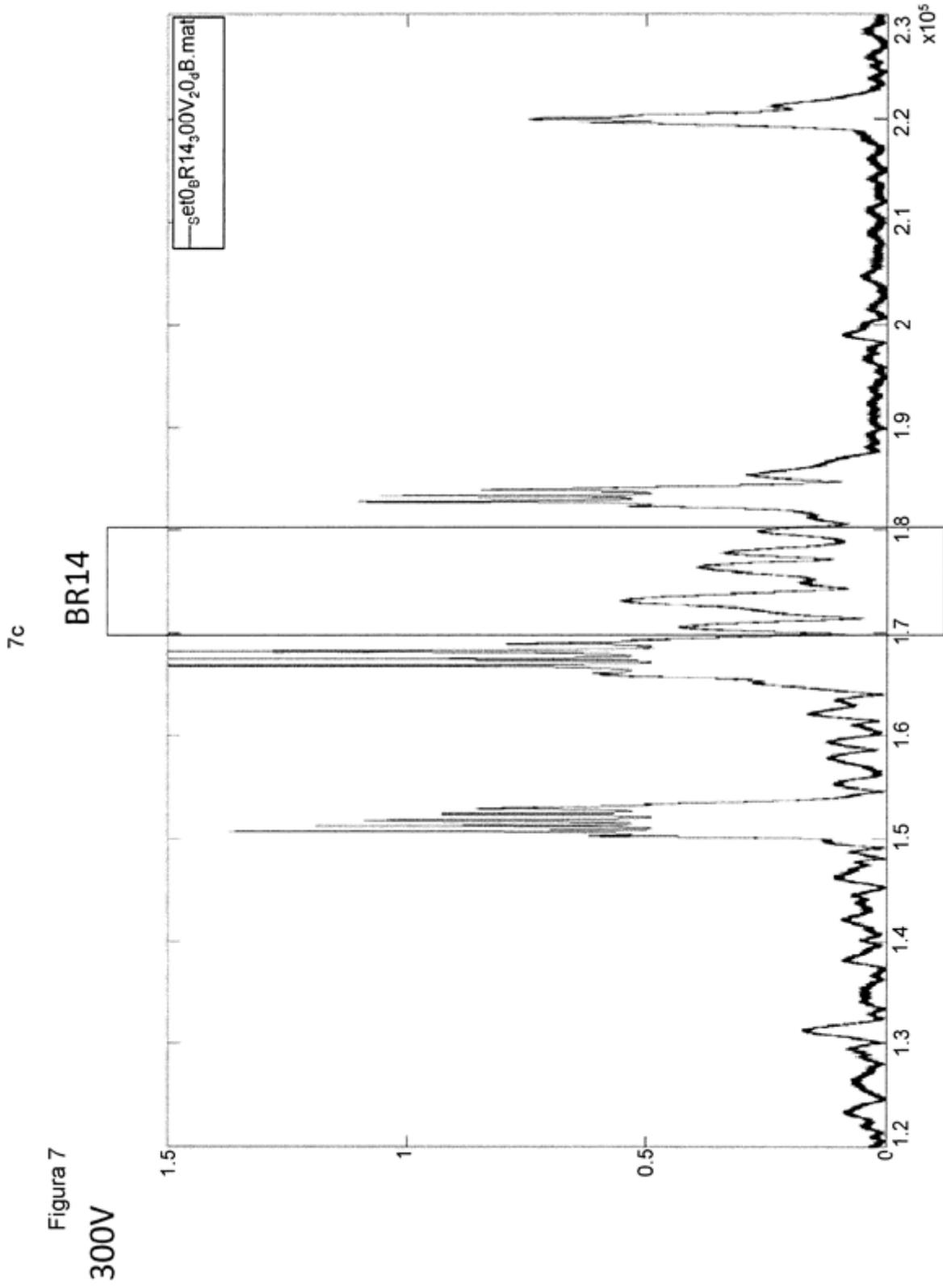


Figura 7





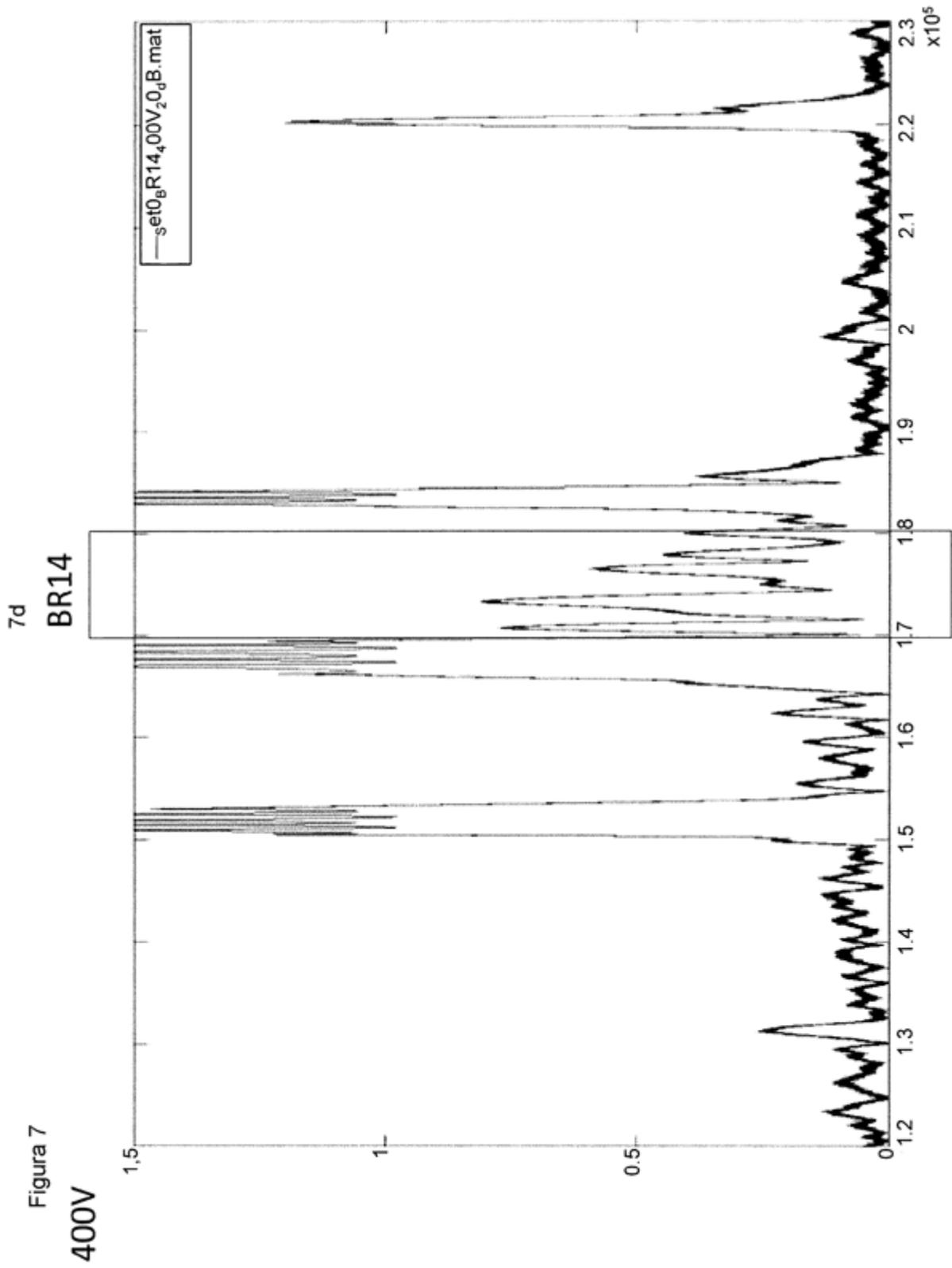


Figura 7
400V

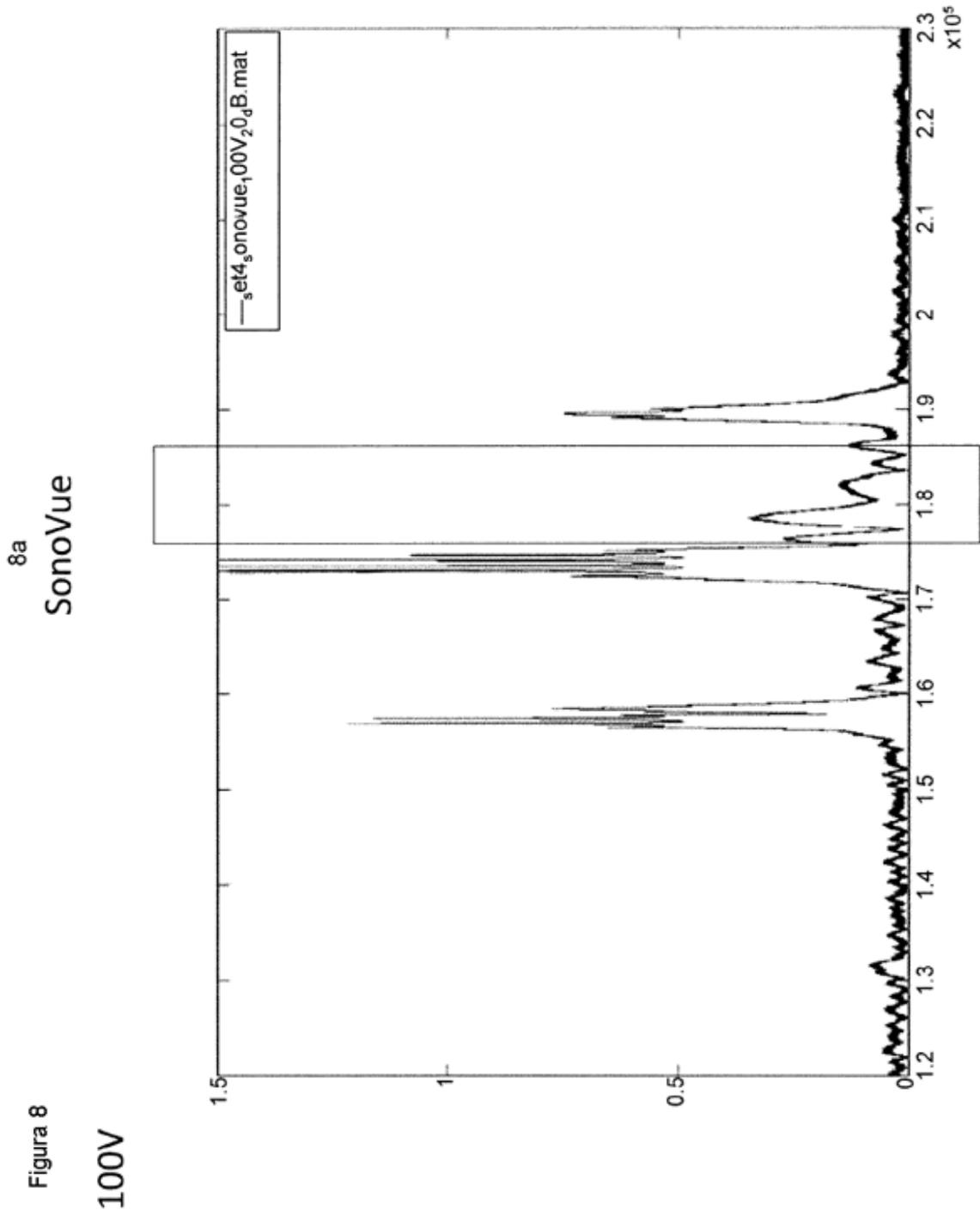


Figura 8

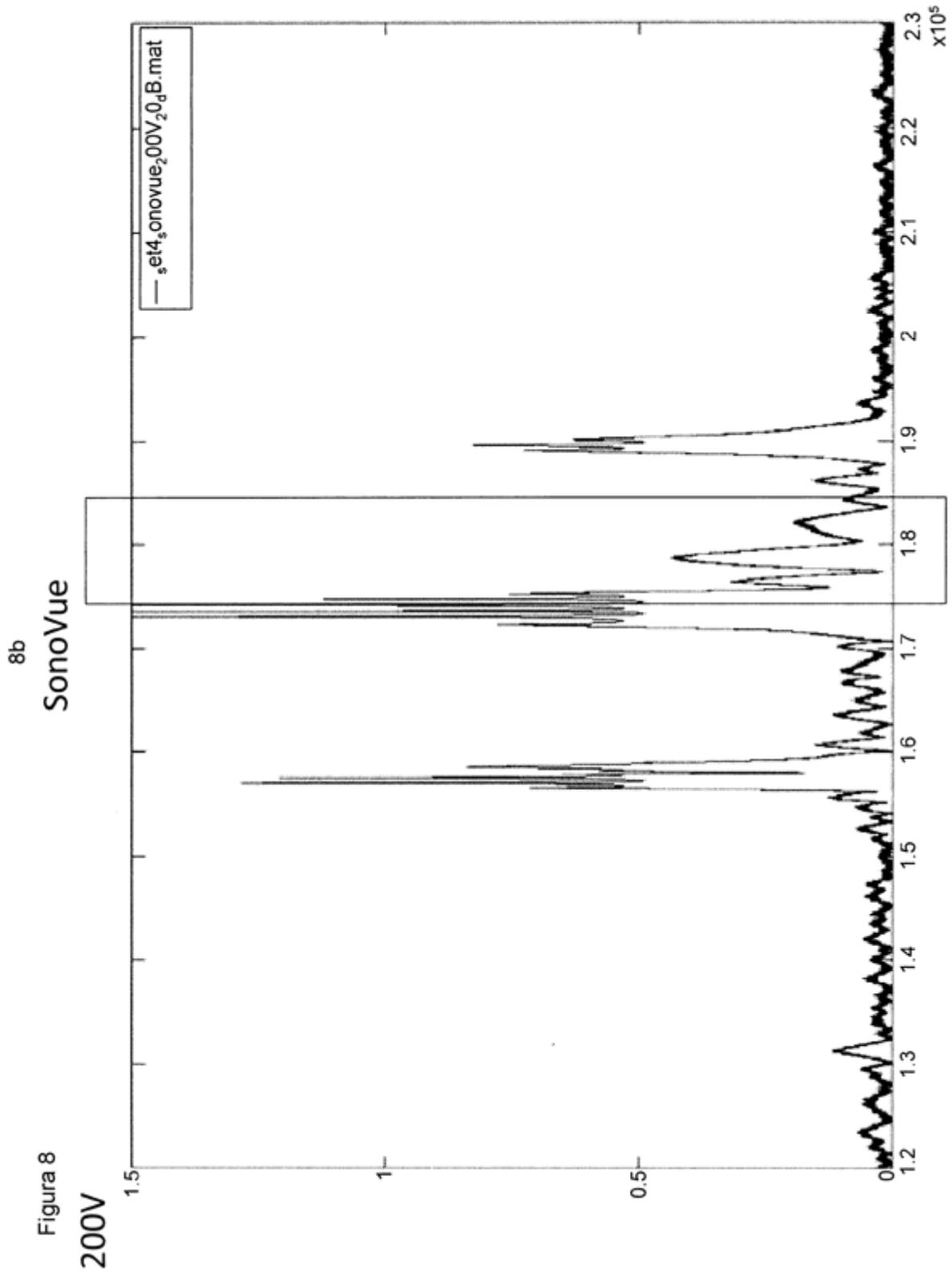
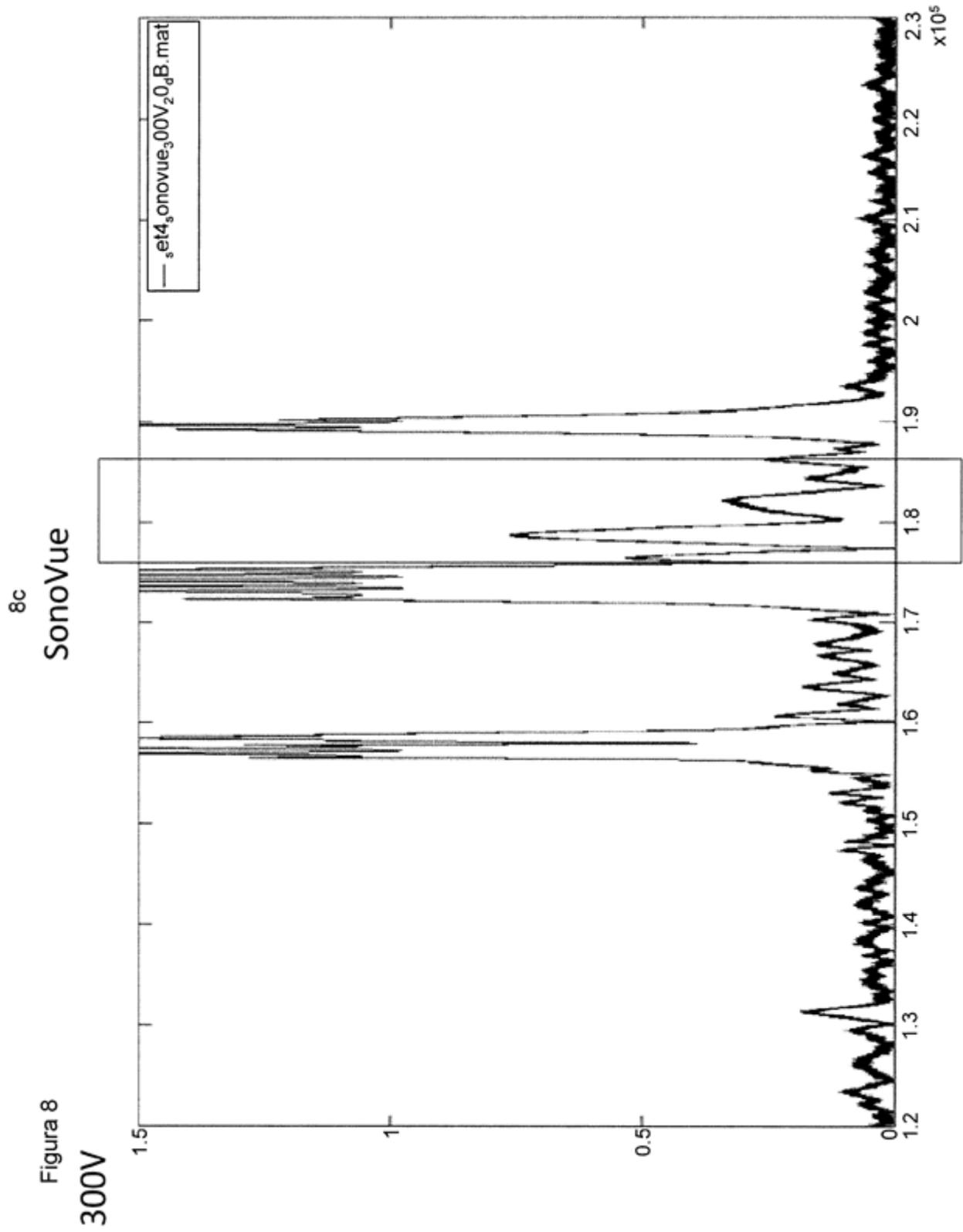
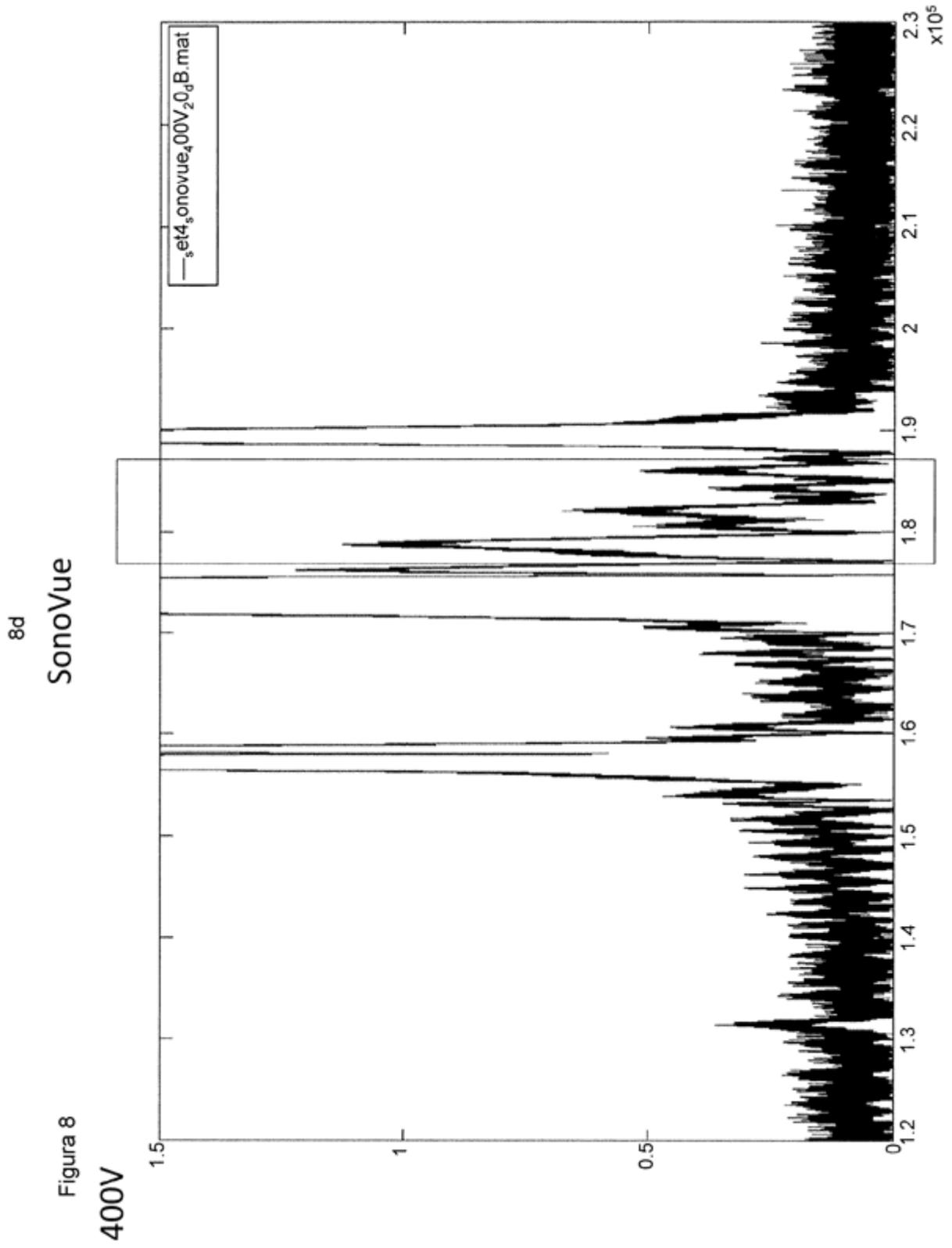


Figura 8





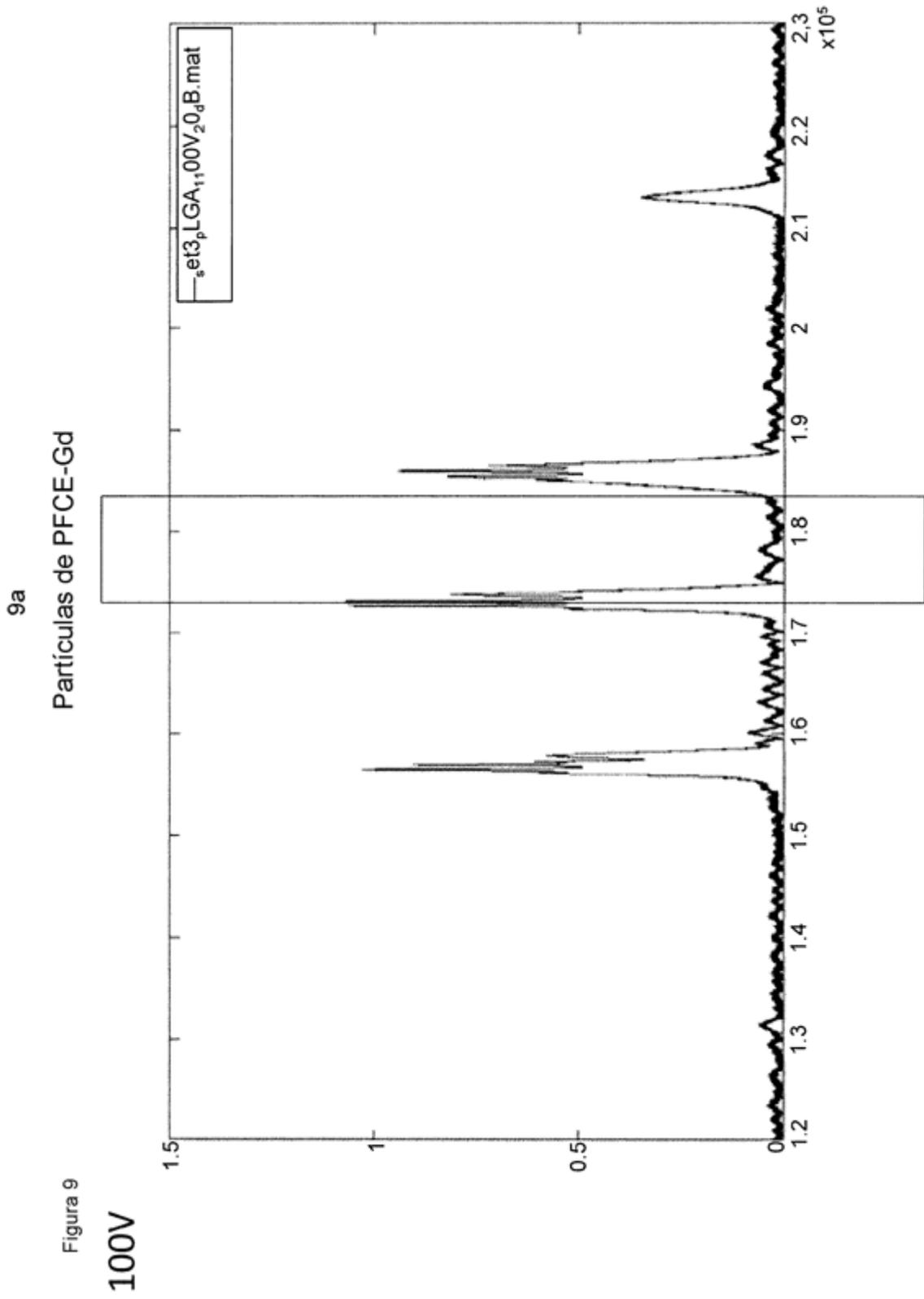
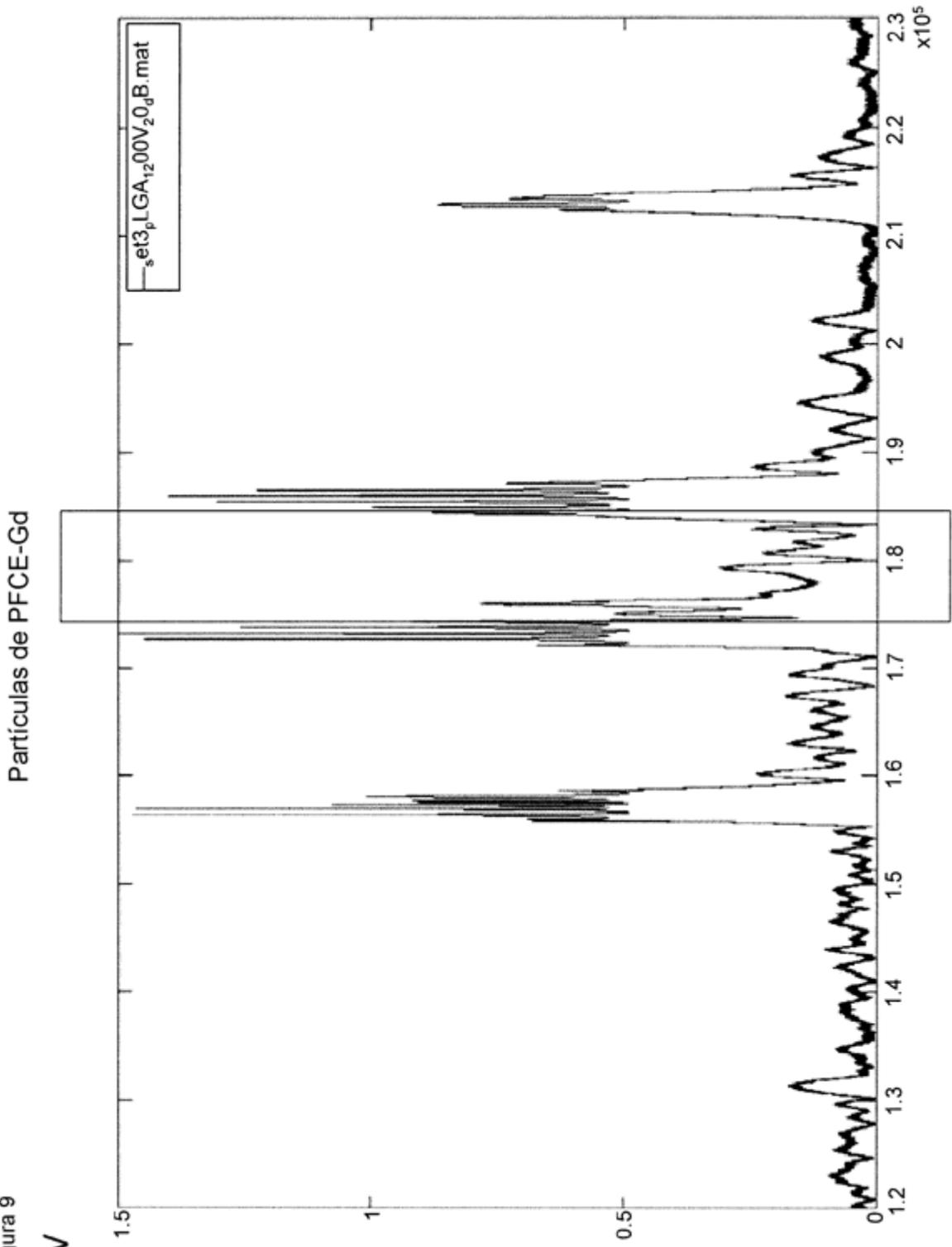


Figura 9

9b

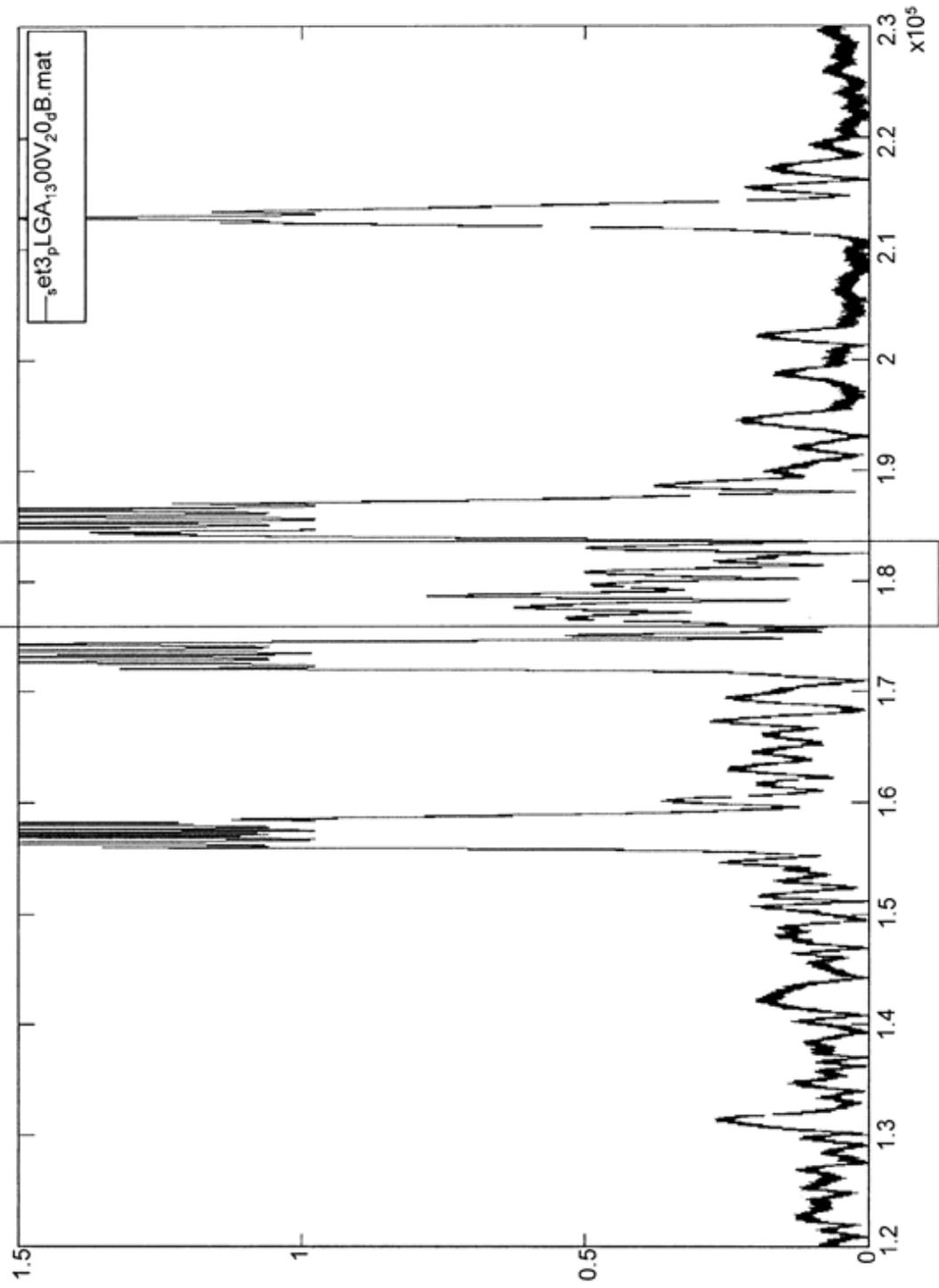
Figura 9
200V



9c

Figura 9
300V

Partículas de PFCE-Gd



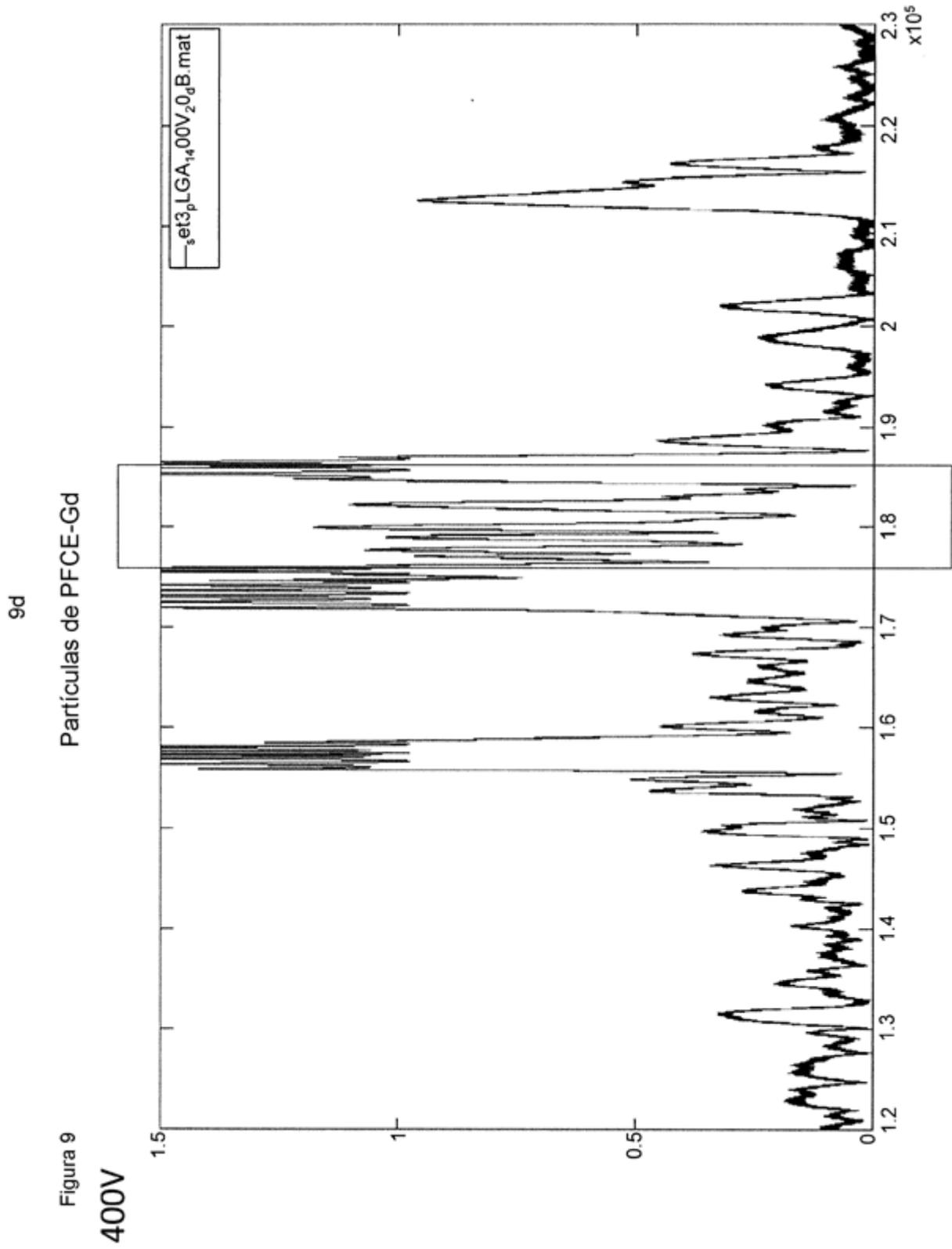


Figura 10

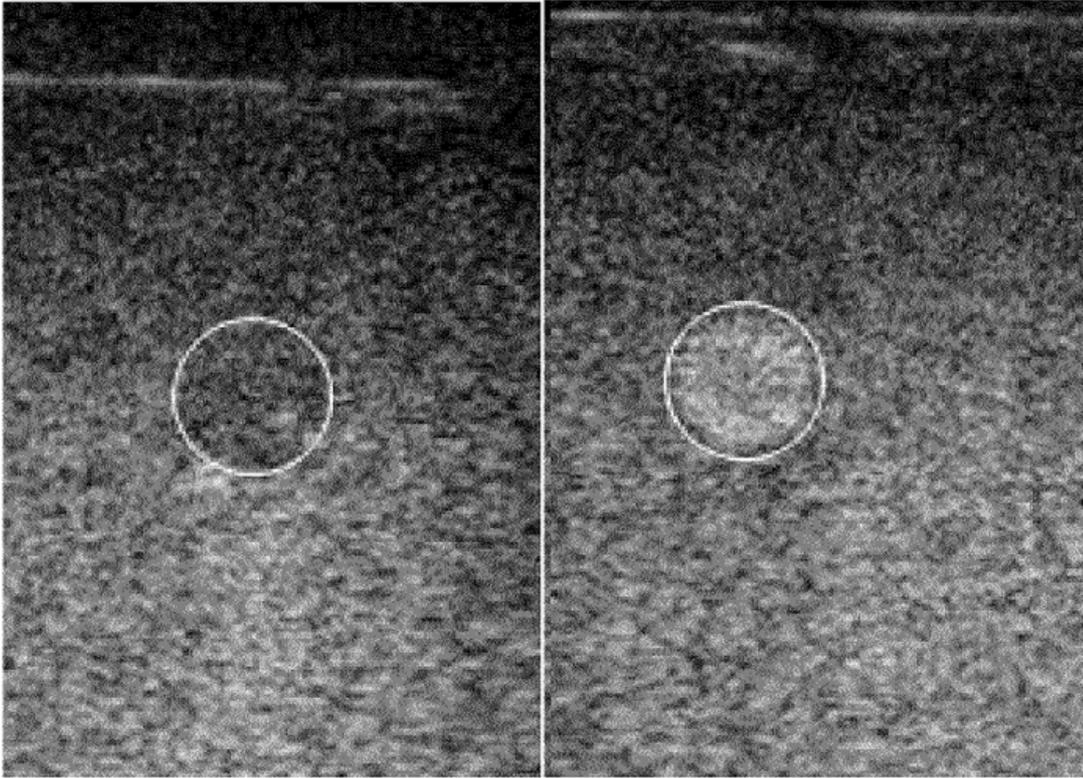


Figura 11

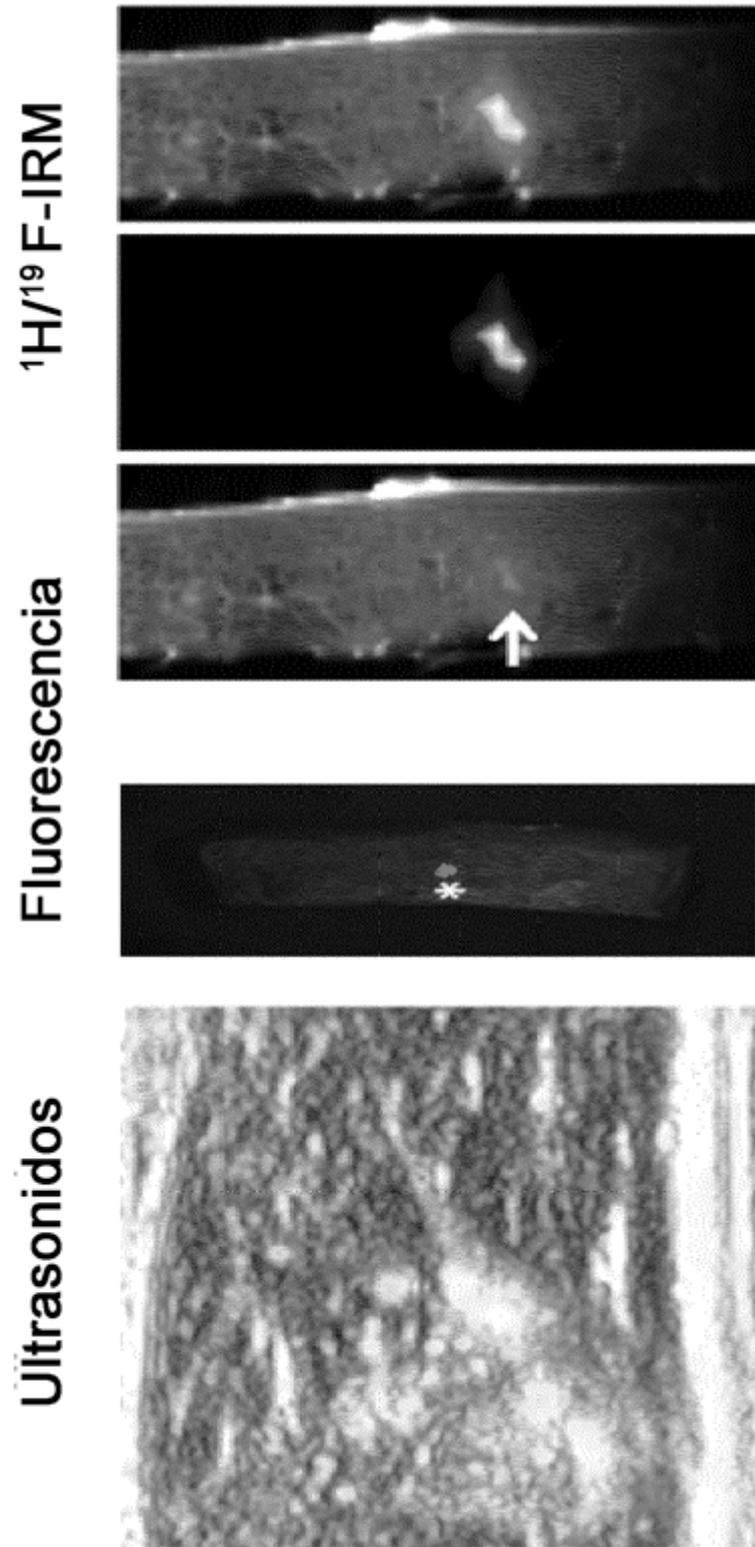


Figura 12



13

Figura 13A

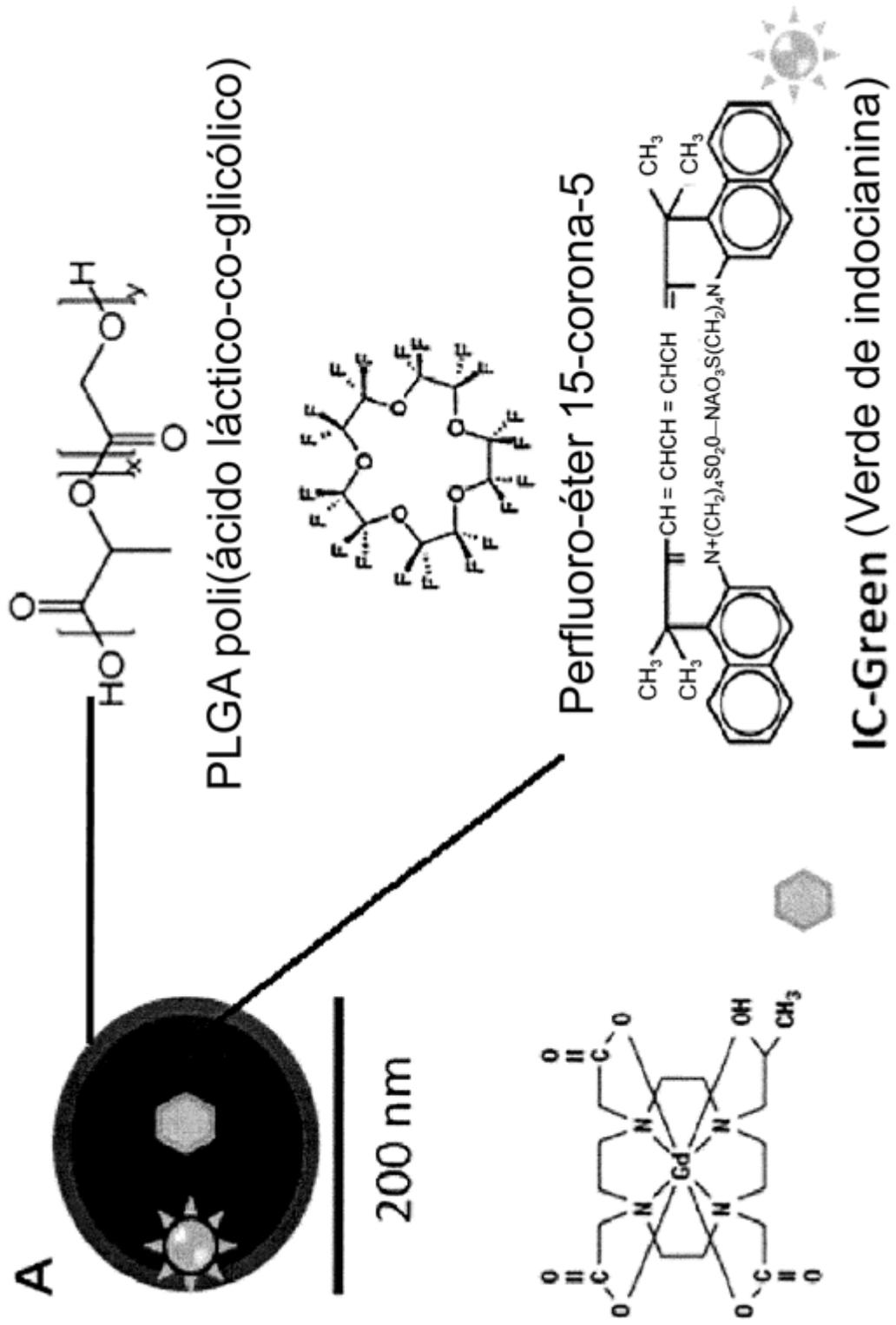


Figura 13B

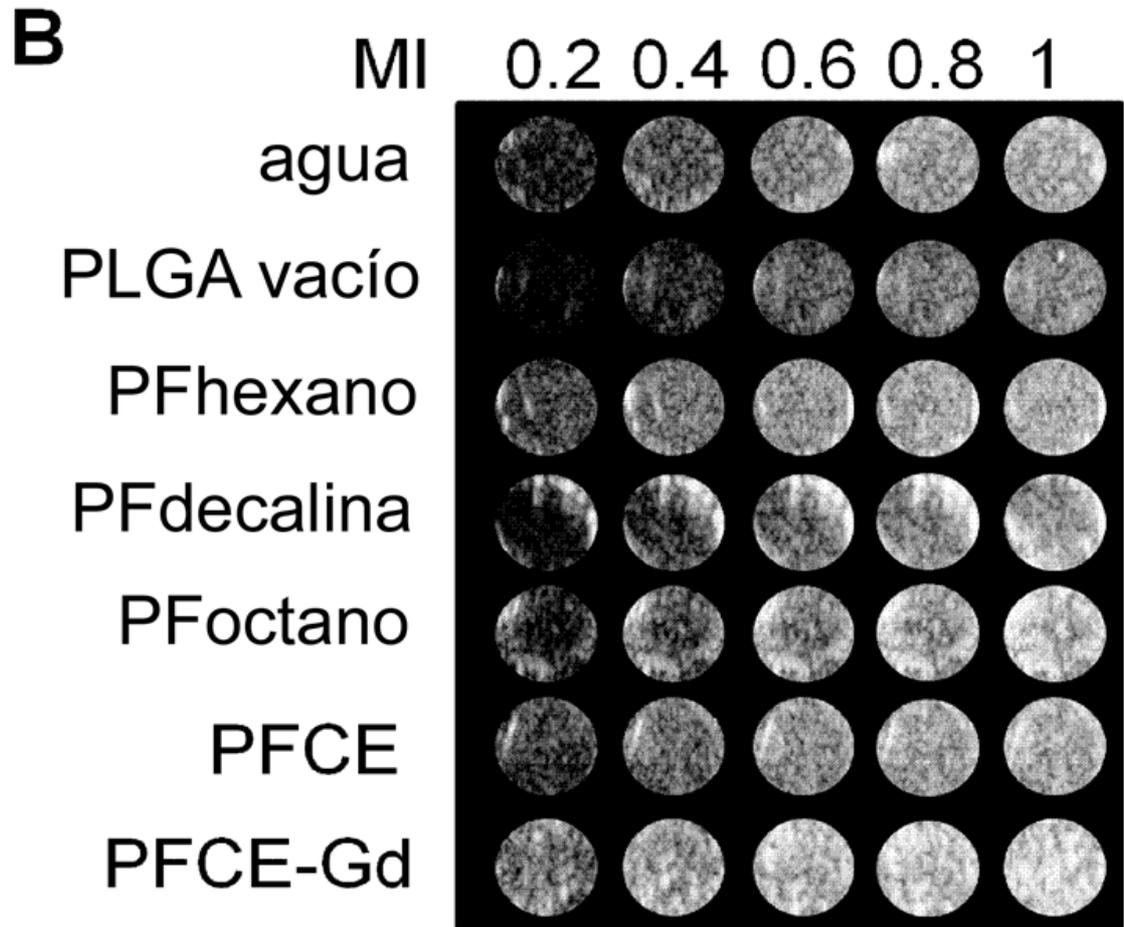


Figura 13C

C

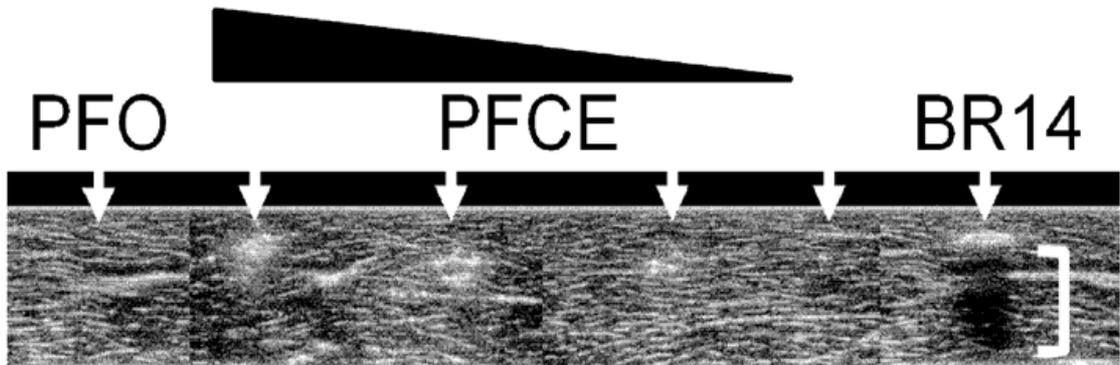


Figura 13D

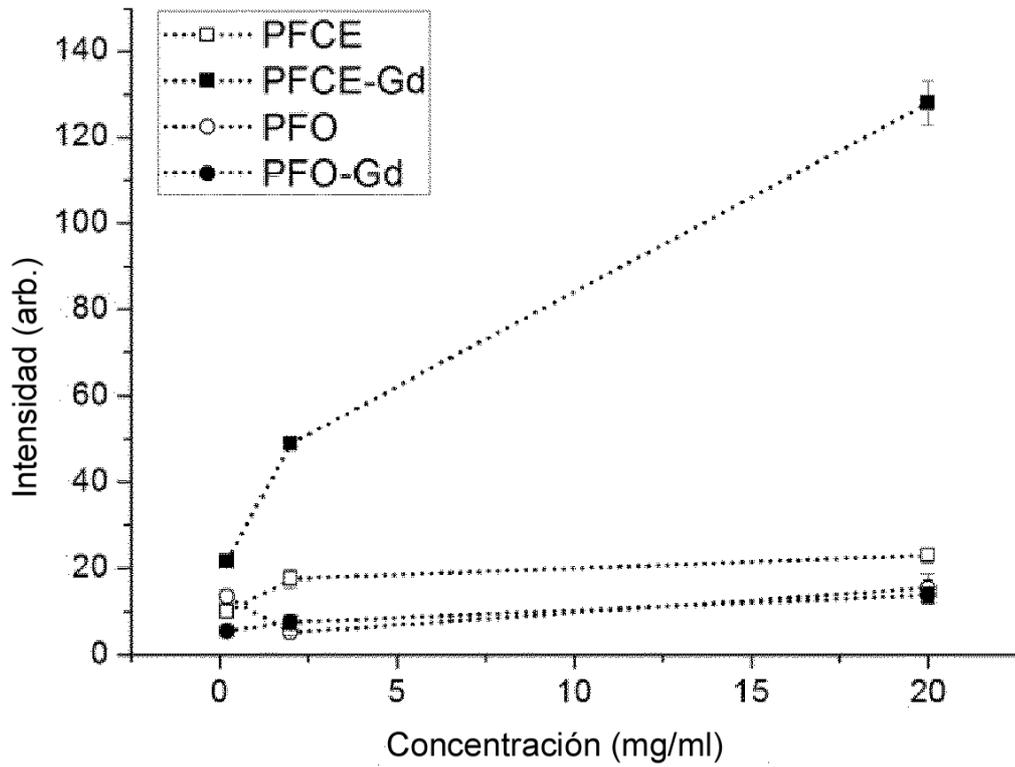
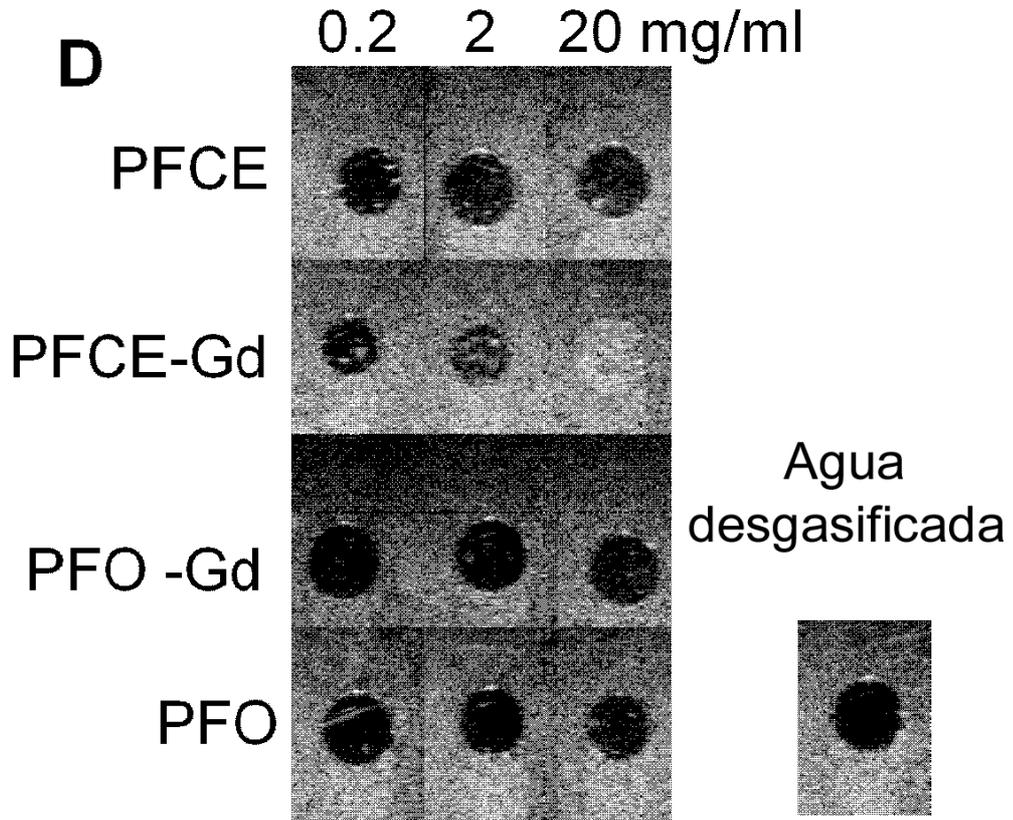


Figura 13E

2.5

5

20 mg

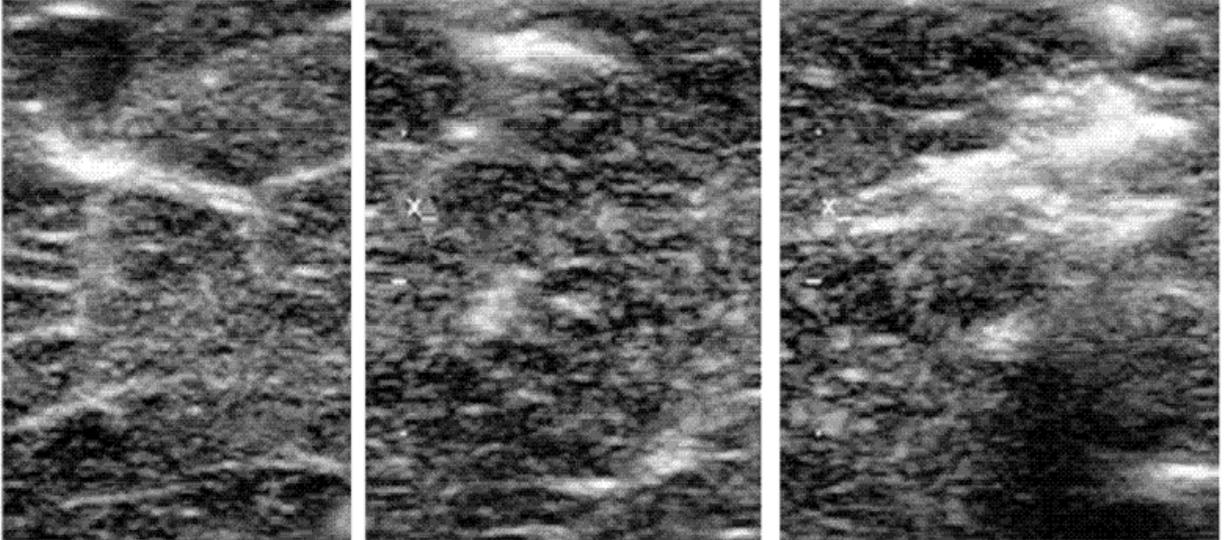


Figura 13F

F

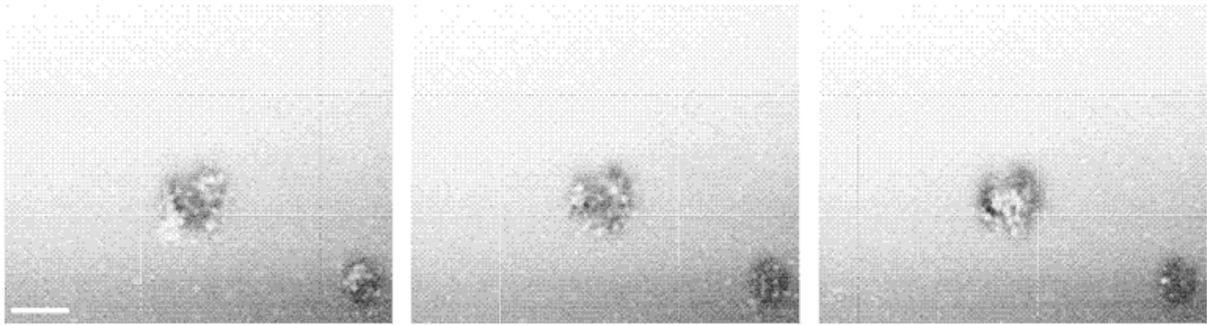
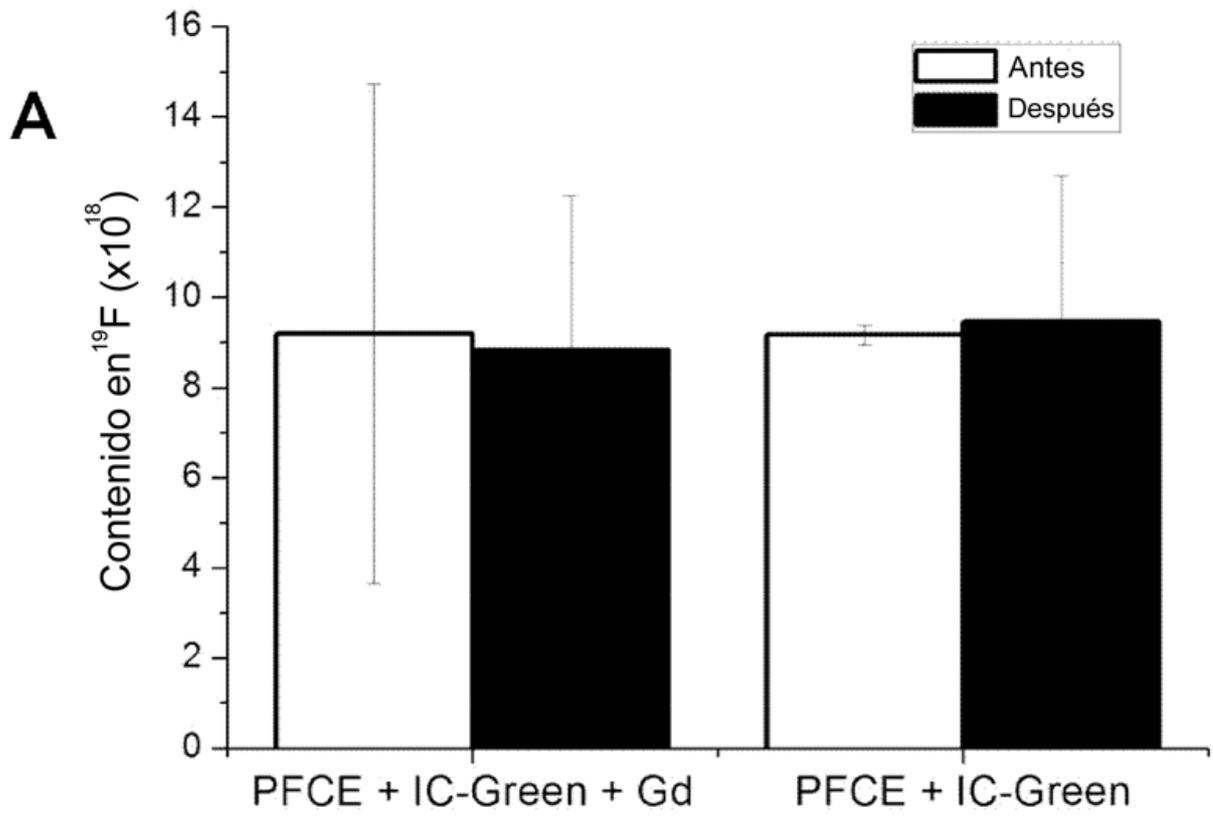


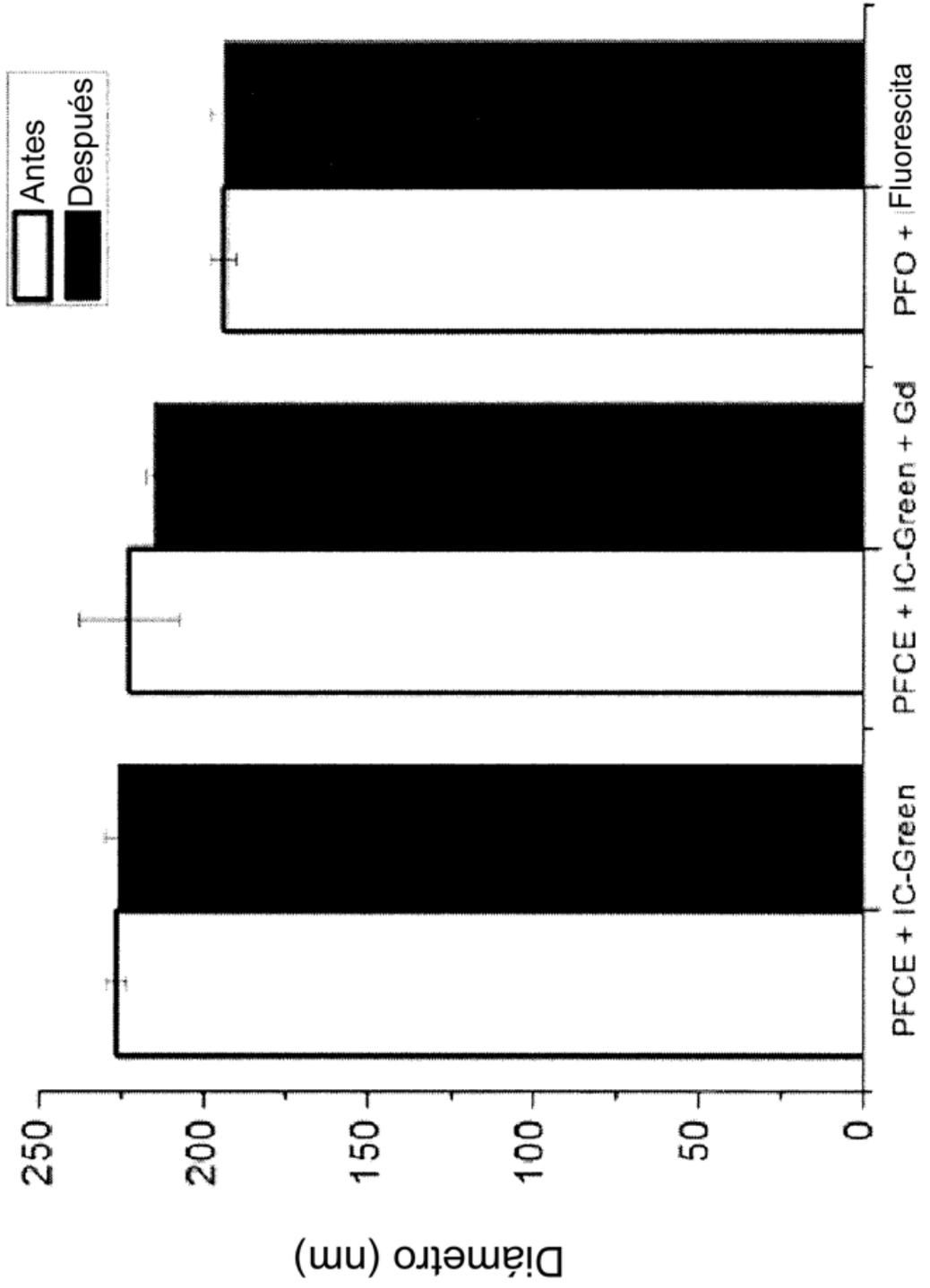
Figura 14A



20a

Figura 14B

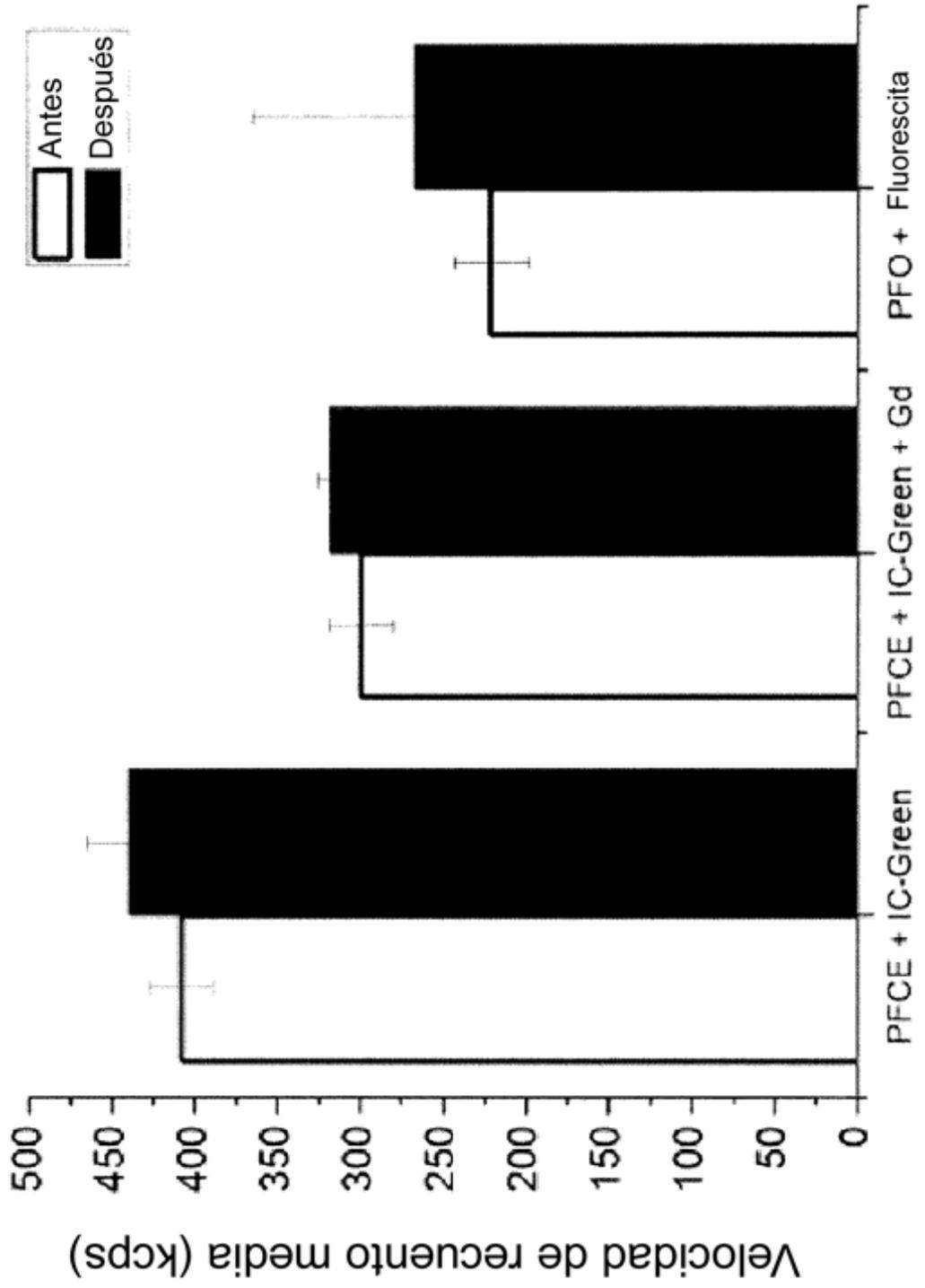
B



20b

Figura 14B

B



20c

Figura 14B

B

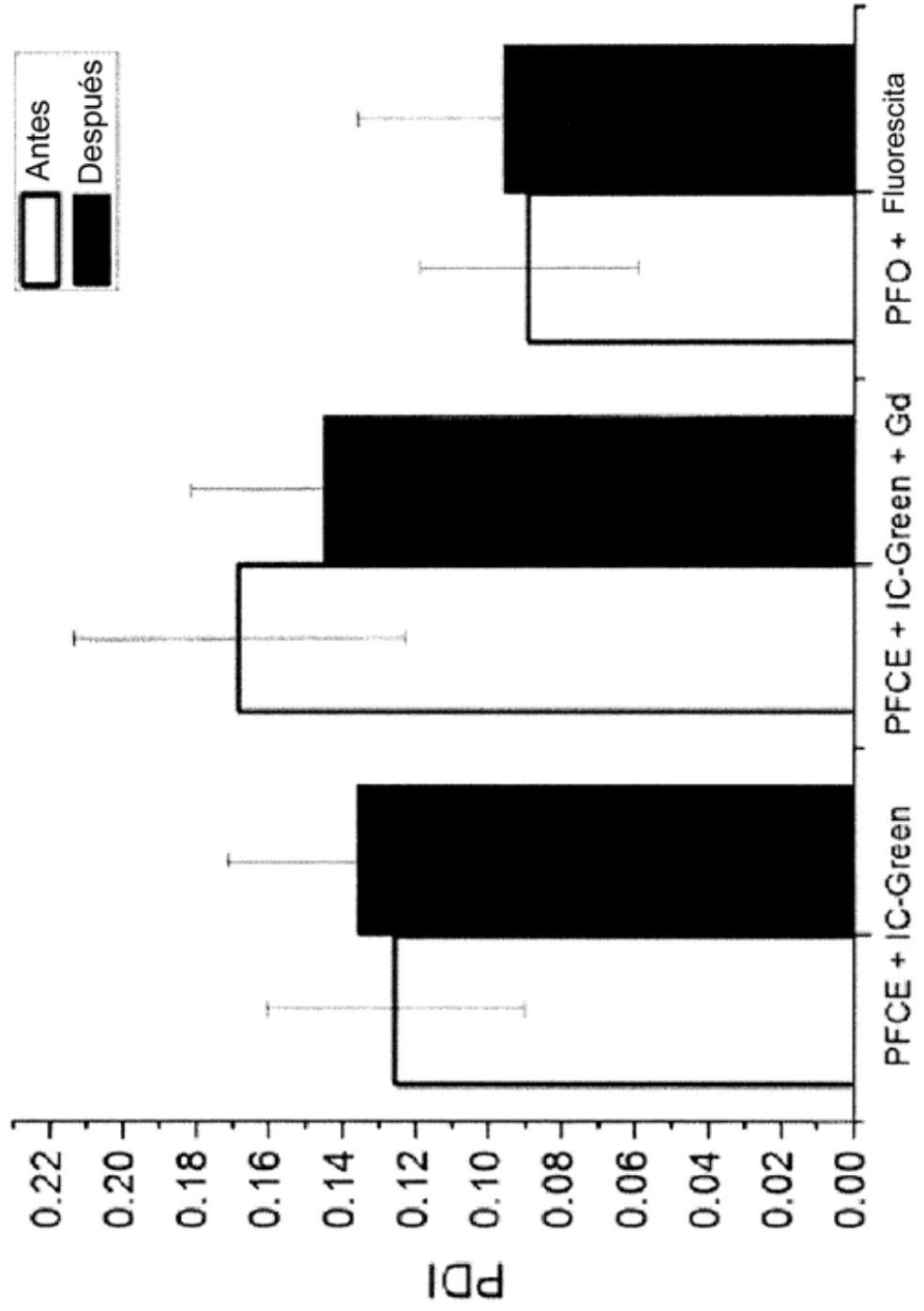


Figura 14C

C

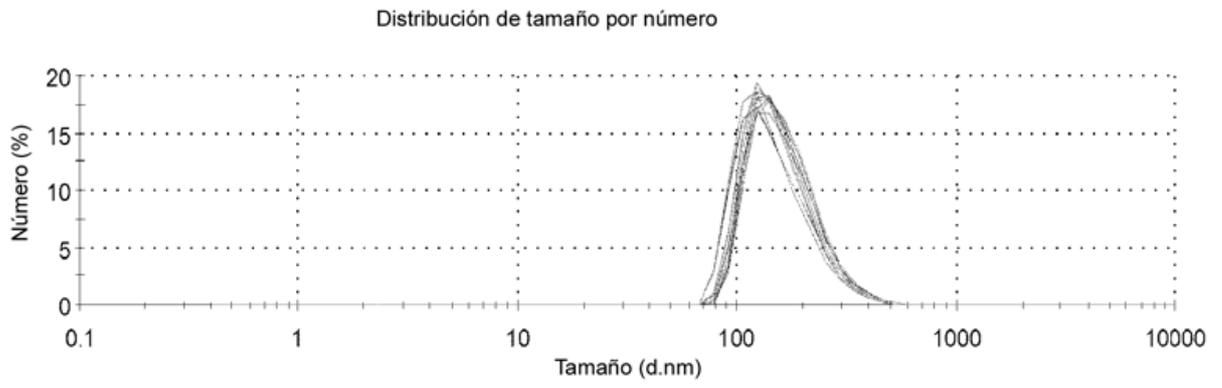
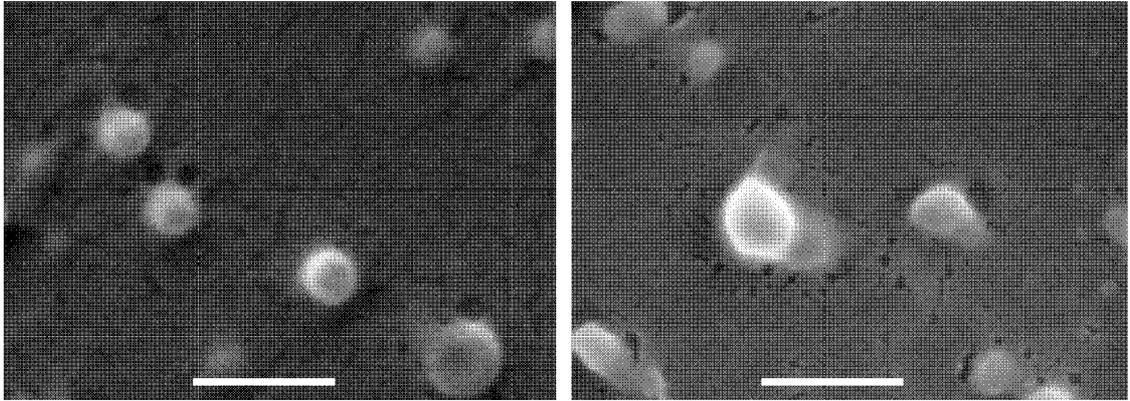


Figura 14D

D



23

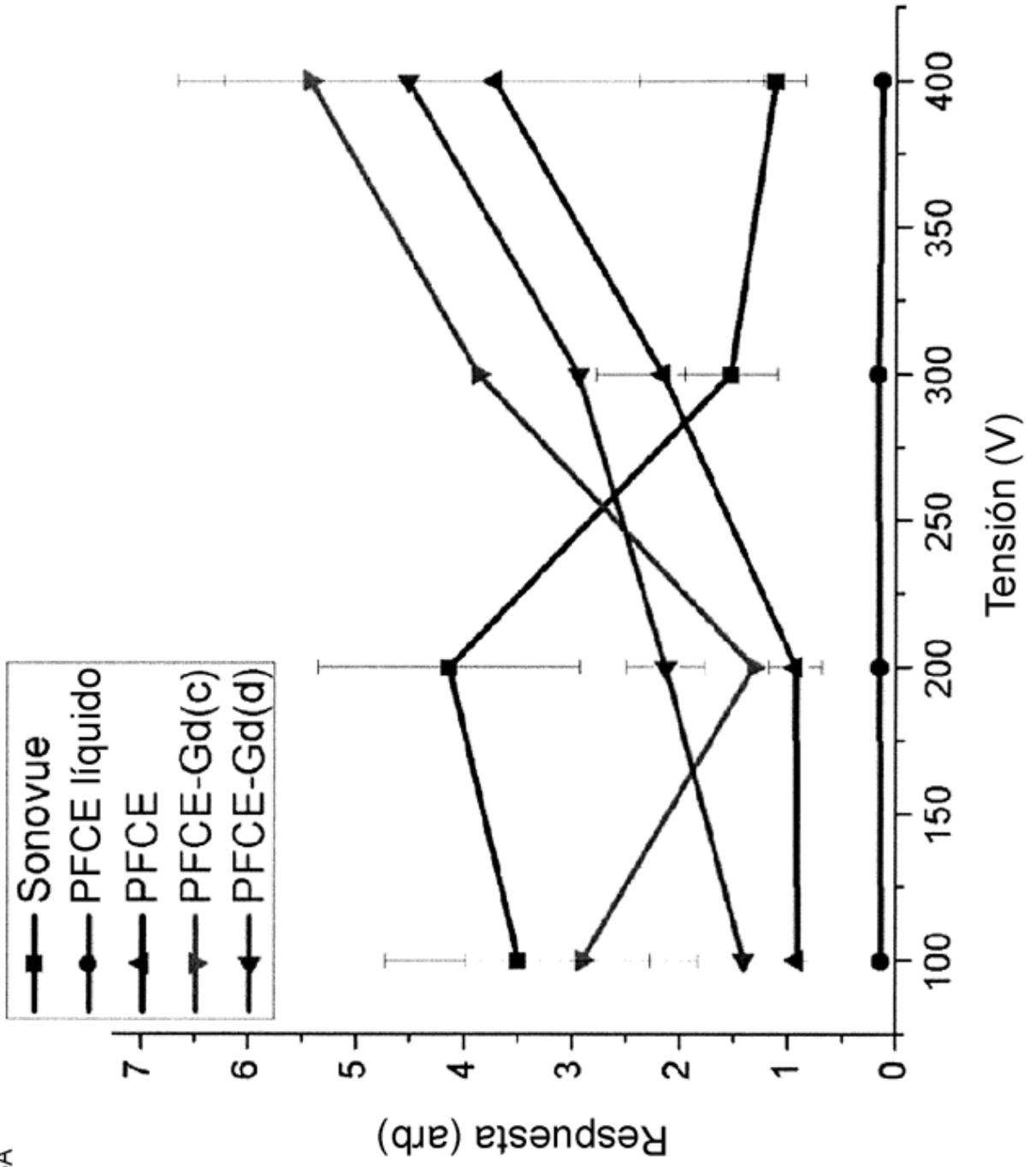


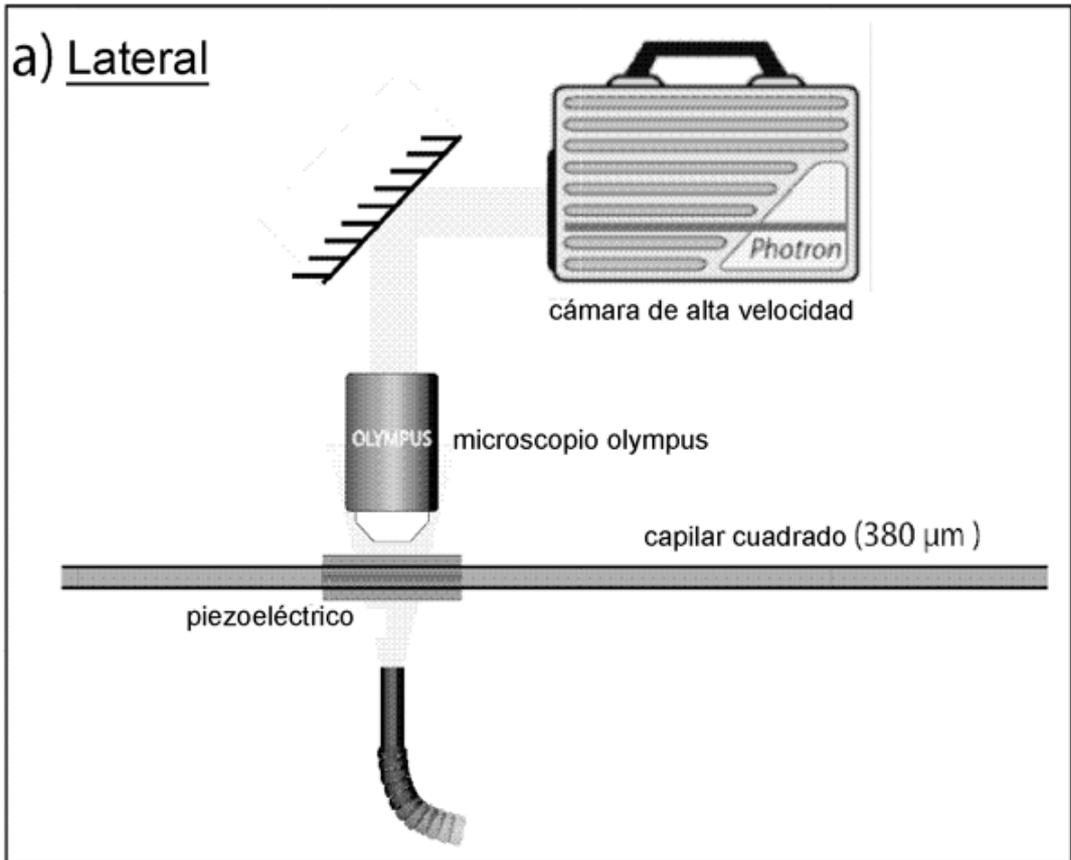
Figura 15A

A

Figura 15B

B

a) Lateral



b) Desde arriba

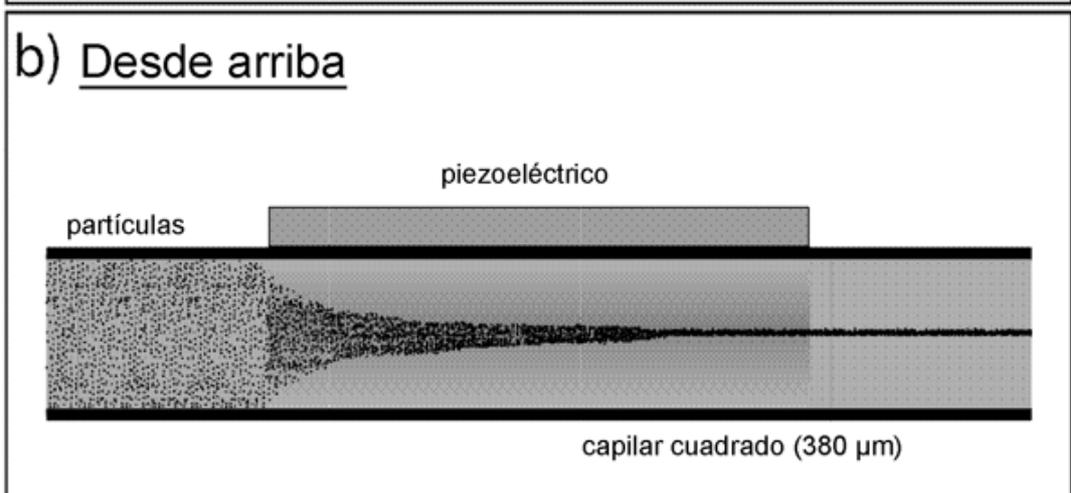


Figura 15C

C

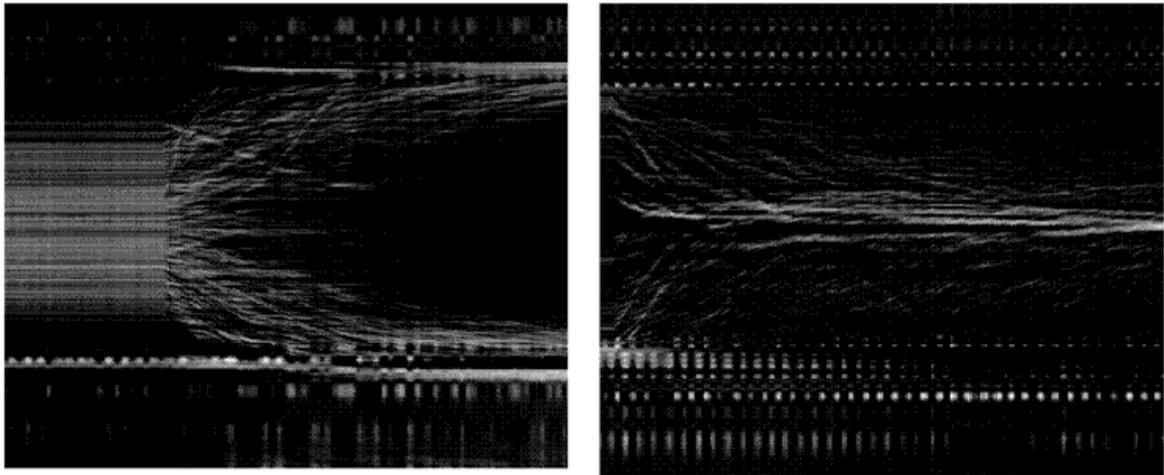


Figura 15D

D

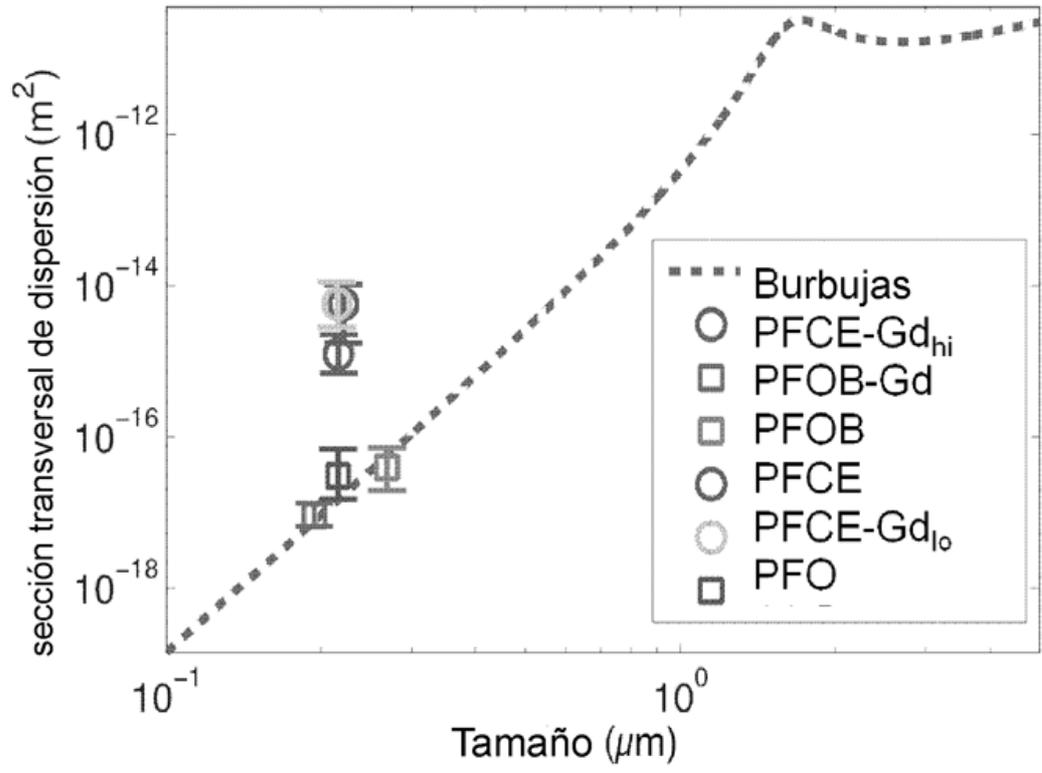


Figura 16A

A

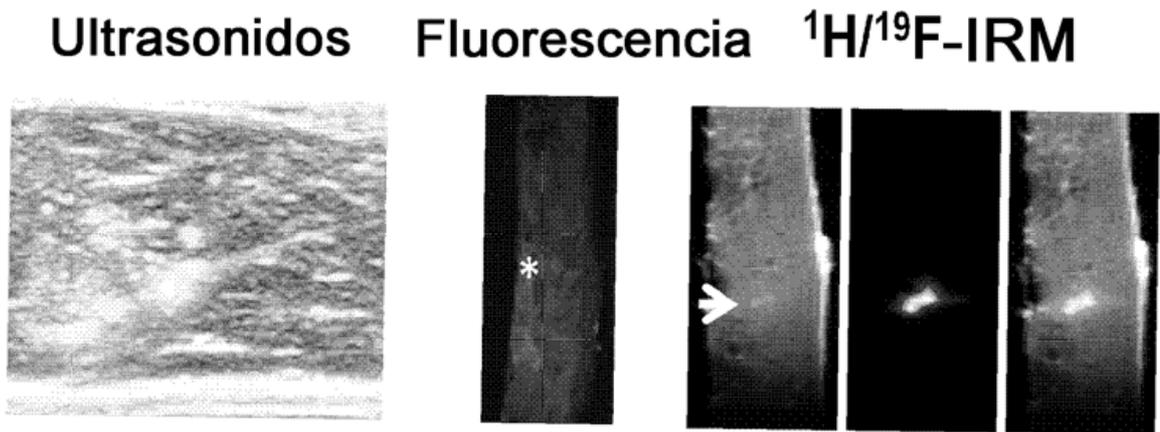


Figura 16B

B

No
marcado

Marcado
con PFO

Marcado con
PFCE - Gd

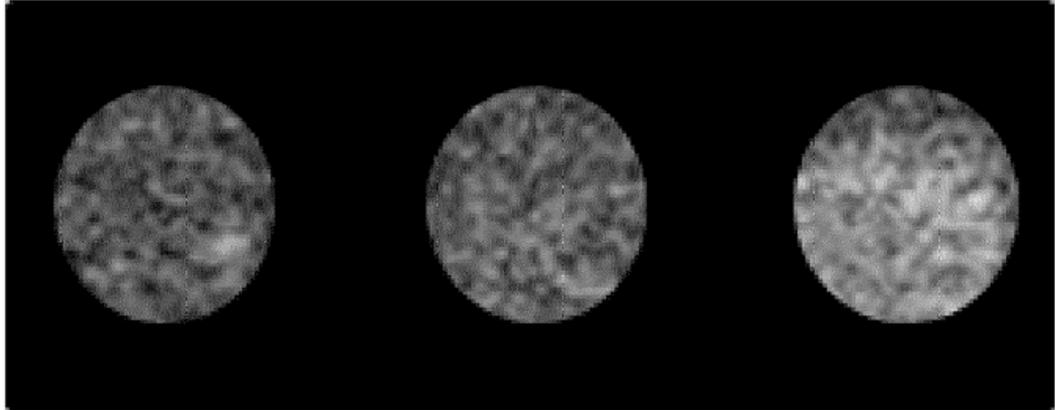


Figura 16C

C

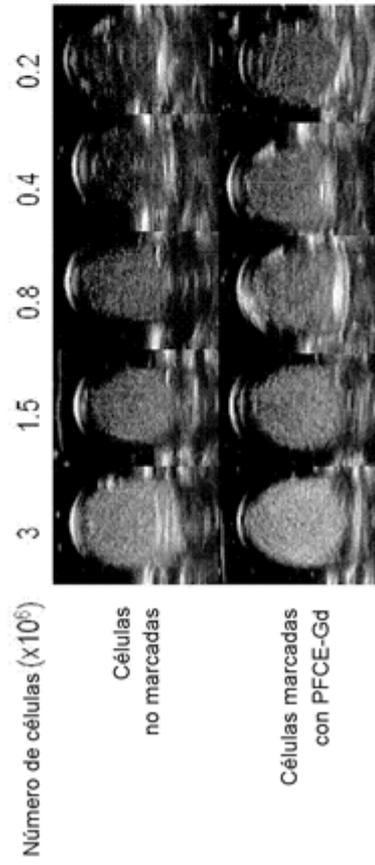
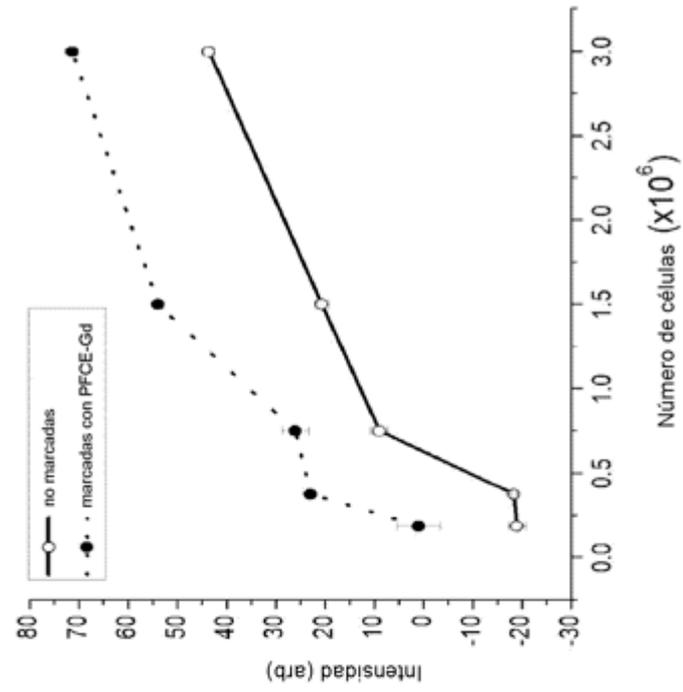


Figura 17B

B

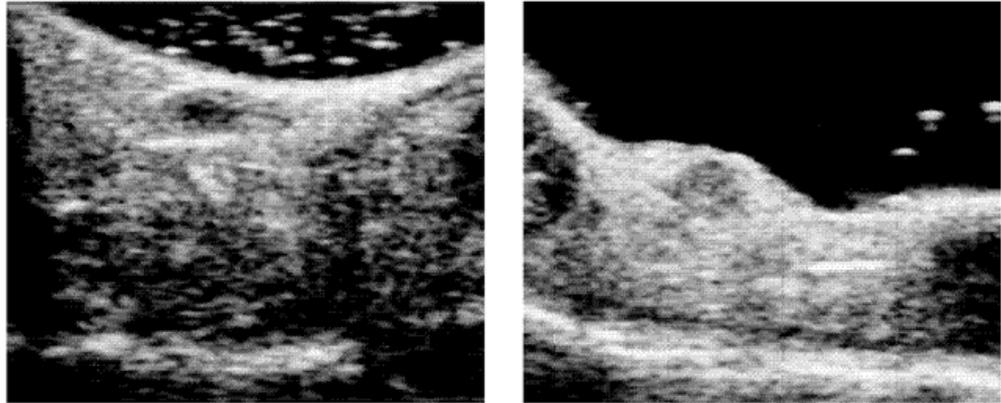


Figura 17C

C

Control

20 mg s.c.

