

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 832**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61B 5/0275 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2010 PCT/EP2010/061138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12013247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10742798 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2598174**

54 Título: **Procedimiento de medición para determinar una función de un órgano**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2019

73 Titular/es:
**SMARTDYELIVERY GMBH (100.0%)
Botzstrasse 5
07743 Jena, DE**

72 Inventor/es:
**BAUER, MICHAEL;
GONNERT, FALK A. y
RECKNAGEL, PETER**

74 Agente/Representante:
CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 732 832 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

Procedimiento de medición para determinar una función de un órgano.

5 La invención se refiere a un procedimiento para la adquisición de datos para determinar una función de un órgano, en particular la función del hígado o del riñón que comprende uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un máximo de emisión de fluorescencia medido en etanol inferior o igual a 820 nm y el uso de los colorantes como marcadores para la adquisición de datos para determinar la función de un órgano. La invención también describe un kit para determinar la función de un órgano con un colorante marcador, así como un dispositivo para la adquisición de datos en el procedimiento.

10 Existe una creciente demanda de procedimientos de medición precisos para la determinación cuantitativa de la capacidad funcional de un órgano, en particular en el caso de disfunciones de órganos o después de trasplantes. El foco se encuentra, a este respecto, sobre todo, en el hígado y en los riñones.

15 Debido a su función en el metabolismo intermediario, pero también como órgano inmunológico, el hígado desempeña un papel central en la progresión y el pronóstico de pacientes críticamente enfermos. La destrucción celular se evalúa tradicionalmente mediante la liberación de enzimas hepatocelulares más o menos específicas (por ejemplo, ASAT, ALAT, GLDH, etc.) en plasma (ensayos "estáticos").

20 Sin embargo, la fuga de enzimas desde el hígado disminuye en pacientes que padecen hepatitis crónica o cirrosis. Además, también se pueden obtener fluctuaciones o niveles altos de una persona si, en el momento del ensayo, la función hepática ya se ha recuperado del trastorno, ya que las enzimas fugadas tardan un tiempo en desaparecer de la sangre. Por lo tanto, las determinaciones cuantitativas de enzimas como un procedimiento de ensayo para evaluar el grado actual del trastorno de la función hepática son habitualmente insuficientes. Tradicionalmente, la bilirrubina es el indicador de disfunción hepática más utilizado. Sin embargo, al igual que los otros ensayos estáticos, este indicador solo puede proporcionar una indicación indirecta de la función hepática.

25 Por el contrario, los ensayos dinámicos del hígado, tales como la PDR (tasa de desaparición plasmática) de verde de indocianina, proporcionan información más directa sobre el verdadero estado funcional del hígado en el momento del examen.

30 Los ensayos dinámicos pueden proporcionar funciones parciales importantes del hepatocito, tales como el metabolismo intermediario de aminoácidos y proteínas, la biosíntesis de urea, la gluconeogénesis, la metabolización de xenobióticos o la capacidad de conjugación y excreción, que pueden cuantificarse mediante la administración de determinados sustratos en el marco de los procedimientos de ensayo.

35 En el documento de patente europea EP 0 911 040 se describen agentes de diagnóstico para la función hepática. A este respecto se utilizan átomos marcados con $^{13}\text{CO}_2$ en una prueba de aliento de $^{13}\text{CO}_2$ para determinar la función hepática. Un procedimiento similar también se presenta en el documento WO 02/075320 A2.

40 Sin embargo, estas pruebas requieren la administración de trazadores o sustratos marcados (por ejemplo, radiactivos) y son difíciles de encontrar o no están disponibles en la rutina clínica debido al alto coste logístico o a los procedimientos de laboratorio especiales requeridos.

45 Otros marcadores que pueden medirse en la orina o en el plasma sanguíneo son 2,4,7-triamino-6-fenilpteridina, tal como se describe en el documento DE 301 6818 A1 o diacetato de pentafluoroacetanilidoimino (véase el documento EP 0 019 790).

50 El colorante ICG se puede utilizar para determinar la distribución de perfusión (véase el documento DE 10 2005 044 531 A1) o el volumen de sangre (véase el documento DE 41 30 931 C2). Durante mucho tiempo, el ICG también se ha utilizado para examinar la función hepática (véase ICG-PDR en el documento DE 689 21 947 T2); recientemente también se utiliza a través de dispositivos de detección de pulso (EP 0 399 482 B1).

55 En los últimos años, se ha establecido la determinación de la tasa de desaparición plasmática de verde de indocianina (ICG-PDR_{ICG}) para la evaluación de la función hepática en enfermedades agudas o crónicas, así como después de un trasplante de hígado como procedimiento de medición complementario debido a su practicabilidad y su reducido gasto de tiempo como estudio de cabecera en la práctica clínica (Pulsion Medical Systems AG; documento DE 101 20 980 A1). También Sakka *et al.*, Chest, Vol. 122, N° 5, 5 de noviembre de 2002, p. 1715-1720 describe el uso de verde de indocianina (ICG) y la medición de la "tasa de desaparición plasmática" (ICG-PDR) de ICG para la determinación de la función hepática en pacientes en cuidados intensivos y como marcadores de pronóstico.

60 Como cualquier técnica de medición basada en el aclaramiento de un trazador, la PDR_{ICG} depende de la eficacia de eliminación [rendimiento hepatocelular] y de la perfusión.

El verde de indocianina (ICG) es un colorante aniónico con un máximo de absorción a una longitud de onda de aproximadamente 805 nm, que posee una toxicidad insignificante a la dosis habitual (véase el documento DE 699 21 151 T2). Según el estado actual del conocimiento, el ICG no se metaboliza ni se elimina de forma extrahepática y no experimenta circulación enterohepática. Después de una inyección intravenosa (0,1-0,5 mg/kg de peso corporal), el ICG se une completamente a las proteínas plasmáticas dentro de un periodo corto de tiempo y aparece sin conjugar en la bilis después de aproximadamente 8 minutos. La captación hepática y la eliminación de ICG son procesos pasivos o activos que dependen del gasto cardíaco, la perfusión sinusoidal, el transporte de membrana y la capacidad secretora del hígado. Mientras tanto, la medición se puede realizar de forma no invasiva mediante la determinación transcutánea de la PDR_{ICG} realizada mediante densitometría de pulso.

Distintos estudios clínicos en diferentes grupos de pacientes han demostrado que este procedimiento puede detectar una disfunción hepatocelular en una etapa temprana, también se correlaciona bien con la tasa de supervivencia y tiene claras ventajas como marcador de pronóstico sobre los parámetros de laboratorio estáticos convencionales.

El transporte de ICG a la bilis incluye al menos 3 etapas: la captación en los hepatocitos a través de la membrana sinusoidal, el paso a través de los hepatocitos y la excreción a través de la membrana canalicular. Sin embargo, estas etapas de transporte solo se han caracterizado mediante estudios cinéticos. Hasta la fecha, hay pocos datos que proporcionen información sobre la relación de PDR_{ICG} y la secreción de ICG biliar en condiciones patofisiológicas tales como sepsis, choque o endotoxemia. Un estudio reciente examinó la relación de PDR_{ICG} y excreción biliar de ICG bajo endotoxemia en cerdos. Mientras que la PDR_{ICG} incluso después de 12 horas de endotoxemia casi no había cambiado, todavía había una disminución significativa en la secreción de ICG biliar y en el flujo acumulado de bilis, sin que se observaran cambios esenciales en la perfusión hepática o el consumo de oxígeno en el hígado en una situación circulatoria hiperdinámica total.

La captación de ICG desde los sinusoides del hígado se realiza a través de la membrana plasmática basolateral (sinusoidal) del hepatocito. Por el contrario, la excreción de ICG se realiza a través de la membrana apical (canalicular), un mecanismo de transporte dependiente en un alto grado de la energía que es extremadamente sensible frente a la endotoxina. Por lo tanto, bajo determinadas condiciones fisiopatológicas tales como la sepsis, aunque el ICG pudo ser recogido en los hepatocitos, no pudo eliminarse nuevamente a través de la bilis y, por lo tanto, la determinación de la RDP_{ICG} se vuelve poco fiable para el control del tratamiento y la evaluación del pronóstico.

La conversión total de ICG consta de dos componentes: su captación en los hepatocitos desde la sangre y el transporte de ICG desde las células hepáticas a la excreción a la bilis. Mediante mediciones convencionales de PDR se mide principalmente la primera etapa. Sin embargo, estas dos etapas se desacoplan en caso de una acumulación de ICG en los hepatocitos y, por lo tanto, son independientes entre sí. Por lo tanto, la función total del órgano ya no se relaciona linealmente con la PDR medida, dado que la disminución en la sangre se atribuye principalmente a la primera etapa y ya no representa una medida de la excreción en el líquido biliar.

En ausencia de determinación de las concentraciones plasmáticas prehepáticas y poshepáticas y realizándose únicamente la medición de la RDP_{ICG} sistémica, por supuesto, ambos factores (aclaramiento fraccional hepatocelular frente a flujo sanguíneo hepático) no pueden discriminarse.

La evaluación clínica de la función renal excretora es la característica más importante de la filtración glomerular. El estándar de oro para medir la tasa de filtración glomerular (GFR) es el aclaramiento de inulina, que, sin embargo, metódicamente, es demasiado costoso para el uso rutinario. En la práctica clínica habitual, el aclaramiento de creatinina se puede determinar con una buena aproximadamente como una medida de la GFR. Sin embargo, esta está sujeta a la interferencia de la determinación de creatinina y además es propenso a fallos debido a errores durante el periodo de recogida de orina. Dado que la creatinina también se secreta mediante secreción tubular a una GFR fuertemente restringida, la GFR "verdadera" se puede sobreestimar hasta en un 100%. Los procedimientos para la monitorización continua de la GFR en el contexto de un proceso de seguimiento, como es posible para parámetros hemodinámicos y respiratorios, existen solo de forma experimental.

En general, por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para determinar la función de un órgano, especialmente el hígado o el riñón, que evite los problemas descritos anteriormente.

En particular, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que permita una evaluación clínica de la masa de hepatocitos intactos que participan en el flujo sanguíneo, es decir, una buena evaluación del rendimiento del hígado y su capacidad de influencia terapéutica.

Sobre todo, este procedimiento pretende proporcionar un diagnóstico preciso para el pronóstico en un estado de disfunción hepática del hígado debido a sepsis u otros trastornos.

Además, un objetivo de la invención es posibilitar una mejor obtención de imágenes y una medición cuantificable

más exacta de las sustancias marcadoras utilizadas.

Se proporcionarán usos que, por analogía, resuelvan los problemas descritos anteriormente y presenten ventajas.

- 5 Sorprendentemente, los problemas descritos anteriormente se pueden resolver con los usos y procedimientos de la invención que se describen a continuación.

10 En particular, la presente invención se refiere al uso de uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes que presentan un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm como marcador para la adquisición de datos para determinar una función de un órgano.

15 La presente invención, por lo tanto, se refiere, en un primer aspecto, a uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes para su utilización como marcadores para la adquisición de datos para determinar la función de un órgano *in vivo*, presentando dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm, y siendo el órgano cuya función se determina el hígado y/o el riñón.

20 Como se ha descrito anteriormente, ya se conoce el uso de colorantes de polimetina fluorescentes que emiten en onda larga para el diagnóstico de órganos, por ejemplo también ICG. Los colorantes de polimetina son polienos conjugados en los que un aceptor de electrones está enlazado al donante de electrones a través de una cadena impar de grupos metino.

25 Se ha descubierto ahora que los colorantes fluorescentes que emiten por debajo de 820 nm producen una mejor imagen en la detección de fluorescencia. Esto permite obtener datos más precisos sobre las concentraciones de colorante en el suero sanguíneo, en otros medios líquidos o en los tejidos de órganos del cuerpo, por ejemplo en la determinación de la perfusión de órganos. Una mejor resolución en los procedimientos de toma de imágenes convencionales es particularmente ventajosa para procedimientos de imagen o en microscopía intravital.

30 Además, los colorantes que emiten con longitudes de onda más cortas se pueden utilizar en combinación con otros colorantes ya conocidos, tales como el ICG, dado que los intervalos de longitud de onda de emisión se pueden separar con diferentes filtros (por ejemplo, divisores de haz) y se pueden detectar de forma simultánea o consecutiva a través de múltiples canales de detección.

35 El colorante ICG presenta entre el donante y el aceptor (en cada caso nitrógeno) 9 átomos de carbono y 7 grupos metino. Se prefiere que los colorantes de la invención presenten menos de nueve átomos de carbono entre el donante y el aceptor de la cadena de cromóforo conjugada del colorante fluorescente, de forma particularmente preferida siete o cinco átomos de carbono. De la forma más preferida, la cadena cromófora presenta 7, 5 o 3 grupos metino.

40 La invención se refiere en un segundo aspecto a uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes que presentan un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm para su utilización en un procedimiento de adquisición de datos para determinar una función de un órgano que comprende las etapas siguientes:

- 45 a) excitación radiactiva *in vivo* de dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm como marcadores en la sangre, en un tejido o un órgano y/o en la bilis o la orina, con una fuente de radiación,
- 50 b) detección de la emisión de fluorescencia de dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un dispositivo de detección,
- c) adquisición de los datos de la intensidad de fluorescencia medida con un dispositivo de adquisición de datos,

55 siendo el órgano cuya función se determina el hígado y/o el riñón.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la adquisición de datos para determinar una función de un órgano *in vitro/ex vivo* que comprende las etapas siguientes:

- 60 a) excitación radiactiva *in vivo* de dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm como marcadores en la sangre, en un tejido o un órgano y/o en la bilis o la orina, con una fuente de radiación,
- 65 b) detección de la emisión de fluorescencia de dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un dispositivo de detección,

c) adquisición de los datos de la intensidad de fluorescencia medida con un dispositivo de adquisición de datos,

siendo el órgano cuya función se determina el hígado y/o el riñón.

Los colorantes utilizados permiten una representación más exacta de la función del órgano medida. Además, tienen menos tendencia a acumularse en el tejido del órgano.

Por lo tanto, no solo representan el movimiento de perfusión en el órgano, sino que también expresan mejor la capacidad de excreción real del órgano. Por lo tanto, el procedimiento anterior es particularmente útil para determinar los valores de medición y los parámetros que se pueden utilizar para el diagnóstico de la función del órgano.

Como fuente de excitación preferida para la excitación radiactiva (irradiación con luz) puede servir un diodo láser. Para evitar la decoloración del colorante, en algunos procedimientos de imagen, la potencia de la fuente es preferentemente inferior o igual a 1 mW/cm².

En la etapa c), los datos se miden preferentemente en función del tiempo. A partir de los mismos, se puede derivar una gráfica de fluorescencia con respecto al tiempo.

La medición de la fluorescencia en el plasma sanguíneo es particularmente ventajosa. Por lo tanto, se puede determinar la tasa de desaparición plasmática (RDP) del colorante. La función de aclaramiento del colorante se puede determinar a partir de la sangre o el tejido del órgano.

Es favorable que la función hepática se registre ahora de forma "integral" y que se pueda evaluar la capacidad de excreción.

Además, se prefiere el almacenamiento posterior de los datos de la función de intensidad de fluorescencia medida con un dispositivo de almacenamiento de datos.

También es favorable procesar los datos y/o enviar los datos a un dispositivo de salida de datos, por ejemplo una pantalla, un dispositivo de impresión o un medio de almacenamiento.

Preferentemente, los datos adquiridos se comparan posteriormente con los valores de referencia. A continuación, se puede determinar una desviación (significativa) de los valores de referencia en otra etapa. Finalmente, opcionalmente, también es posible establecer un diagnóstico y/o la asignación del conjunto de datos a un hallazgo patológico a partir de esta etapa de análisis utilizando un programa de evaluación o con la amplia experiencia de una red neuronal entrenada.

Finalmente, en formas de realización preferidas del procedimiento, el colorante se puede administrar en una primera etapa. De forma más preferida, se administran uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes mediante inyección intravenosa en el torrente sanguíneo. Alternativamente, el colorante se puede administrar a través de un catéter ya presente, eliminando así una intervención adicional en el cuerpo. Preferentemente, la administración se realiza en una ubicación que se encuentra a no más de 50 cm de la región del vaso u del órgano que se va a examinar.

La dosificación del colorante varía con la masa corporal y los requisitos en la detección de valores de medición. Normalmente, se utilizan de 0,05 a 10 mg/kg por medición, de forma particularmente preferida de 0,1 a 0,5 mg/kg o a 1,25 mg/kg por medición, de la forma más preferida de 0,25 mg/kg o de 0,45 mg/kg por medición. No se recomiendan valores significativamente más altos dado que la reducida citotoxicidad puede aumentar. En la figura 10 se puede observar que, en la comparación de la citotoxicidad entre ICG y DY635, este último colorante presenta una citotoxicidad muy baja y no muestra una viabilidad más reducida que el ICG.

En una forma de realización ventajosa, la detección de fluorescencia se realiza en el uso o el procedimiento anterior *in vitro*. A este respecto, los valores de medición se pueden determinar después de la toma de muestras en un laboratorio.

En los usos o los procedimientos según la invención, la detección de fluorescencia se efectúa preferentemente en la sangre, el tejido u el órgano y/o la bilis o la orina de un animal; preferentemente, este animal es un mamífero, un roedor o un Homo Sapiens.

También se divulga un kit para determinar la función de un órgano con un colorante marcador que comprende:

uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm, que están presentes en una forma de administración fisiológicamente aceptable,

un dispositivo de detección de fluorescencia,

y un dispositivo de adquisición de datos de fluorescencia.

5

Este kit tiene la ventaja de proporcionar un medio para el diagnóstico rápido de una función de un órgano de forma compacta.

10

Normalmente, el kit comprende material suficiente para una a dos o varias dosis del colorante. Las unidades de dosificación múltiples pueden contener hasta 100, 200 o 500 dosis. En este caso, los otros componentes del kit son reciclables.

15

El kit se puede utilizar para medir el PDR. A este respecto, el detector es convenientemente un sensor desechable para la medición en el lóbulo de la oreja.

20

En un perfeccionamiento divulgado, el kit comprende además uno o varios de los siguientes: un dispositivo de administración (preferentemente una aguja de inyección o un catéter central o periférico), un dispositivo de almacenamiento de datos y un dispositivo de salida de datos.

25

En una forma de realización particular de la invención, uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes están presentes en una solución fisiológicamente aceptable e inyectable por vía intravenosa. Estos pueden administrarse de forma muy particularmente preferida a través de un catéter ya presente, de forma que no sean necesarias intervenciones adicionales en el cuerpo.

30

Además, el kit comprende una unidad de dosificación, que puede ser un vial, en la que se pueden almacenar las soluciones de colorante. En tal caso, el kit comprende porciones que contienen 25 mg de colorante por ml de disolvente, o preferentemente 50 mg de colorante por 10 ml de disolvente, preferentemente agua.

35

En una forma de realización divulgada, el kit contiene el colorante en forma de polvo en unidades de dosificación individuales, así como opcionalmente la cantidad apropiada de disolvente para producir la solución fisiológica *in situ*. Esta variante tiene la ventaja de una mejor estabilidad de almacenamiento de los componentes del kit.

40

Al utilizar el kit, es importante una manipulación estéril. Preferentemente, el kit viene acompañado de un manual descriptivo.

45

Los usos o los procedimientos de la invención para determinar la función de un órgano descritos anteriormente se pueden utilizar de forma particularmente preferida cuando el órgano cuya función se determina es el hígado y/o el riñón. Los colorantes de la invención utilizados presentan en estos órganos, en particular, la ventaja de representar mejor la función del órgano real, porque con los mismos se reproduce con mayor exactitud la capacidad de excreción real del órgano.

50

Particularmente preferidos son los usos o los procedimientos de la invención en los que el máximo de emisión de fluorescencia de uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes medidos en etanol es inferior o igual a 810 nm.

55

De forma más preferida, el máximo de emisión de fluorescencia es inferior o igual a 780 nm o 740 nm, de la forma más preferida inferior o igual a 680 nm. El uso de colorantes con un máximo de emisión de fluorescencia inferior o igual a 550 nm puede ser adecuado para procedimientos particulares, especialmente en combinación con un colorante con un máximo de emisión de fluorescencia superior o igual a 750 nm.

60

El máximo de absorción del colorante es preferentemente de 580 nm a 690 nm. De forma particularmente preferida es un máximo de absorción de 600 nm a 670 nm.

65

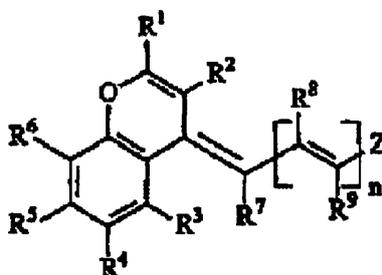
Con el fin de evitar la decoloración del colorante y, por lo tanto, una distorsión de los resultados de medición, el colorante debe tener una alta estabilidad de decoloración. También es útil utilizar colorantes con un rendimiento cuántico de fluorescencia elevado, ya que estos presentan una luminosidad más intensa con la excitación apropiada.

Las formas de realización preferidas de la invención comprenden, por lo tanto, usos o procedimientos en los que el colorante es una hemicianina basada en benzopirilo o un cromóforo de indodicarbocianina.

Preferentemente, el número de átomos de carbono entre el grupo donante y el grupo aceptor en el colorante es inferior o igual a 7. Esto tiene el efecto de que el colorante presenta una mejor fotoestabilidad y una mejor estabilidad de almacenamiento. En comparación con los cromóforos de cadena más larga, tales como el ICG, la cadena de doble enlace conjugada más corta del colorante, con su nube de electrones más corta y menos pronunciada, ofrece menos posiciones de ataque para reactivos electrófilos o nucleófilos. Esto aumenta la

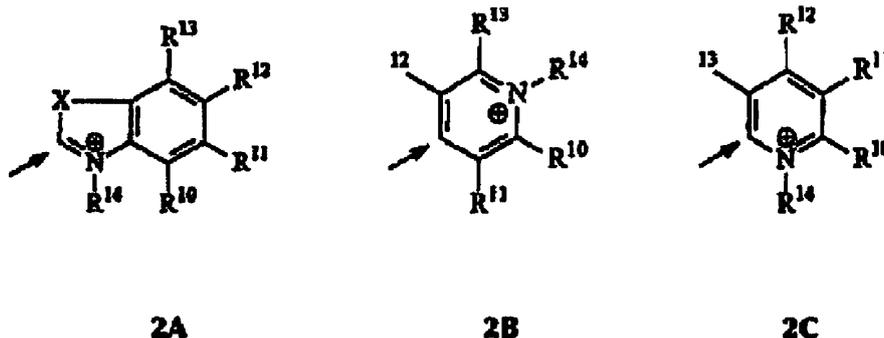
fotoestabilidad de los colorantes según la invención, lo que conduce a una adquisición de datos de medición más exacta en los procedimientos de obtención de imágenes cuantitativas y de detección de fluorescencia.

En particular, dichos uno o varios colorantes de la invención pueden ser una polimetina asimétrica que presenta un resto omega(benzo[b]piran-4-ilideno)alqu-1-enilo sustituido de estructura general 1:



1

con Z como derivados de benzoxazol, de benzotiazol, de 2,3,3-trimetilindolenina, de 2,3,3-trimetil-4,5-benzo-3H-indolenina, de 2- y 4-picolina, de lepidina, de quinaldina y de 9-metilacridina sustituidos de las fórmulas estructurales generales 2A o 2B o 2C



2A

2B

2C

en las que

- X representa un elemento del grupo O, S, Se o el elemento estructural N-alquilo o C-(alquilo)₂,
- n representa los valores numéricos 1, 2 o 3,
- R¹-R¹⁴ son iguales o diferentes y pueden ser hidrógeno, uno o varios restos alquilo, restos arilo, heteroarilo o heterocicloalifáticos, un grupo hidroxilo o alcoxi, una función amina sustituida con alquilo o cíclica, y/o dos restos en posición orto, por ejemplo R¹⁰ y R¹¹, R⁴ y R⁵ y/o R⁶ y R⁵ pueden formar juntos un anillo aromático adicional,
- por lo menos uno de entre los sustituyentes R¹-R¹⁴ puede representar un sustituyente solubilizante o ionizable o ionizado, tal como ciclodextrina, azúcar, SO₃⁻, PO₃⁻, COO⁻ o NR₃⁺, que determina las propiedades hidrófilas de estos colorantes, pudiendo este sustituyente también estar unido al colorante a través de un grupo espaciador, y
- R¹ representa un sustituyente que presenta un átomo de C cuaternario en la posición alfa con respecto al anillo de pirano, siendo preferidos t-butilo o adamantilo.

En formas de realización ventajosas de los usos o los procedimientos según la invención, los colorantes están provistos de sustituyentes de tal forma que cada uno se adapte a diferentes órganos. Se ha demostrado que los colorantes adecuados para los riñones no deben presentar una solubilidad en agua demasiado reducida.

Por lo tanto, los colorantes de polimetina fluorescentes para la determinación de la función renal se caracterizan por que dichos uno o varios colorantes son solubles en agua pero insolubles en DMF o DMSO. Estos colorantes tienden a ser hidrófilos.

Por el contrario, los colorantes de polimetina fluorescentes según los usos o los procedimientos de la invención para la determinación de la función hepática se caracterizan por que dichos uno o varios colorantes son solubles en DMF o DMSO e insolubles en agua. Estos colorantes tienden a ser liposolubles e hidrófobos.

5 En particular, dichos uno o varios colorantes presentan preferentemente una carga neutra en solución fisiológica o están presentes cargados como máximo con una carga única y/o preferentemente presentan como máximo dos sustituyentes solubilizantes o ionizables o ionizados. Estos perfeccionamientos son particularmente adecuados para la determinación de la función hepática.

10 En otros perfeccionamientos de la invención, dichos uno o varios colorantes en solución fisiológica están cargados al menos con una carga doble y/o preferentemente presentan al menos tres o cuatro sustituyentes solubilizantes o ionizables o ionizados.

15 Dichos sustituyentes solubilizantes o ionizables o ionizados son a este respecto, de forma muy preferida, grupos de ácido sulfónico, grupos de ácido carboxílico o grupos amonio.

Se prefiere particularmente que dichos uno o varios colorantes según la invención se seleccionen de entre el grupo que comprende:

20 DY630, DY631, DY632, DY633, DY634, DY635, DY636, DY647, DY648, DY649, DY650, DY651 y DY652, así como DY590, DY548, DY495, DY405.

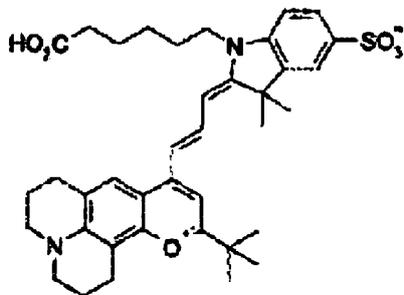
Estos colorantes presentan preferentemente, a este respecto, una absorción en el intervalo espectral rojo. No obstante, también se pueden utilizar colorantes absorbentes de rojo, verde o azul.

25 Es muy particularmente preferido el colorante DY635, es decir:

5-sulfonato de 1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-2-[3-(11-(2,2-dimetiletil)-1H,2H,3H,5H,6H,7H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-il]quinolin-9-iliden)-1-propenil]-3H-indolio

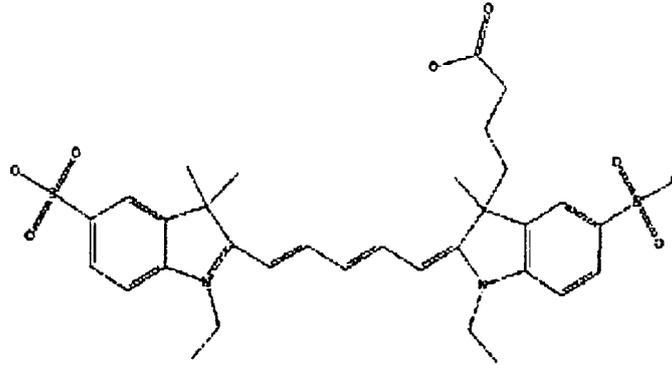
o

35 10-terc-butil-8-{(E)-3-[1-(5-carboxi-pentil)-3,3-dimetil-5-sulfo-1,3-dihidro-indol(2E)-ilideno]propenil)-2,3,5,6-tetrahidro-1H,4H-11-oxonia-3a-aza-benzo[de]antraceno tal como se muestra a continuación:



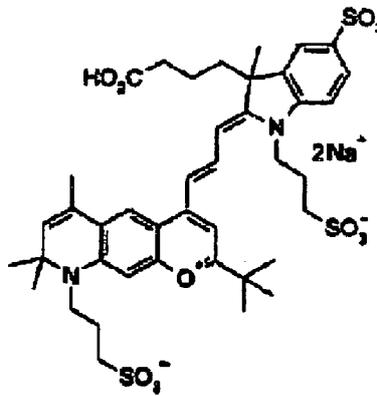
También es preferido el DY647, es decir:

40 2-((1E,3E)-5-[3-(3-carboxi-propil)-1-etil-3-metil-5-sulfo-1,3-dihidro-indol-(2E)-ilideno]penta-1,3-dienilo)-1-etil-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indolio



o también el DY652, es decir:

- 5 2-terc-butil-4-[(E)-3-[3-(3-carboxi-propil)-3-metil-5-sulfo-1-(3-sulfo-propil)-1,3-dihidro-indol-(2Z)-ilideno]-propenil]-5,7,7-trimetil-8-(3-sulfo-propil)-7,8-dihidro-1-oxo- α -8-aza-antraceno tal como se muestra a continuación:



- 10 Estos colorantes se pueden utilizar para realizar una evaluación de la función de los órganos renal o hepático.

Como marcadores validados de la función hepática, estos son particularmente adecuados como parámetros para la medición de sustancias eliminadas hepáticamente, en particular en caso de disfunción hepática asociada a sepsis. Estos colorantes presentan un tiempo de residencia esencialmente más corto en los hepatocitos. Como resultado, existe a este respecto una correlación más estrecha entre los resultados de la medición del PDR y la excreción real en la bilis, lo que permite comprender mejor la función hepática que con el ICG-PDR.

- 15

En cambio, los colorantes renales se pueden utilizar para la detección temprana de la disfunción renal debido a una reducción del aclaramiento del colorante.

- 20

A este respecto, es particularmente preferido el colorante DY647, que se puede utilizar por sus propiedades hidrófilas y la excreción exclusiva a través del riñón para el diagnóstico de la función renal. La medición del PDR de este colorante revela una alternativa simple, rápida y no propensa a errores a la determinación del aclaramiento de creatinina. También es preferido el DY652.

- 25

Además, el ICG puede modificarse mediante sustituyentes hidrófilos, por ejemplo mediante la incorporación de grupos ionizables, lo que es adecuado para los diagnósticos de la función renal descritos.

- 30 Es particularmente ventajoso el uso simultáneo de varios colorantes. Por lo tanto, la invención también abarca las combinaciones de un marcador de la función renal con un marcador de la función hepática.

Preferentemente, estas combinaciones comprenden DY635, DY652 y/o DY647, de forma más preferida una mezcla de dos colorantes de entre DY635, DY652 y/o DY647, por ejemplo DY635 con DY652 o DY635 con DY647.

- 35 Aún más ventajosa es la combinación de colorantes excitables con longitud de onda más corta con colorantes excitables con longitud de onda más larga, ya que estos emiten cada uno en diferentes intervalos espectrales y la fluorescencia del marcador se puede medir por separado en diferentes canales de detección. Se prefieren las combinaciones de DY652 con ICG, o DY635 con ICG o DY548 con DY635.

Así, se pueden determinar simultáneamente la función renal y la función hepática con una única medición de fluorescencia, por ejemplo, por medio del PDR.

5 Además, se divulga un dispositivo para la adquisición de datos con un marcador para la determinación de la función hepática o la función renal mediante la medición de fluorescencia de uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes que presentan un máximo de emisión de fluorescencia medido en etanol inferior o igual a 800 nm.

El dispositivo también incluye preferentemente uno o varios de los aparatos siguientes:

10 un dispositivo de administración, una fuente de radiación (preferentemente un diodo láser), un dispositivo de detección (preferentemente una cámara CCD), un dispositivo de adquisición de datos (preferentemente un ordenador), un dispositivo de almacenamiento de datos (preferentemente un ordenador), un dispositivo de salida de datos (preferentemente un medio de visualización, de impresión o de almacenamiento).

15 La invención también se refiere a los usos, o a un procedimiento tal como se han descrito anteriormente, para realizar un seguimiento de una función de un órgano después de un trasplante de hígado o riñón, para el diagnóstico de pacientes críticamente enfermos en caso de sepsis, de insuficiencia orgánica múltiple o para examen médico.

20 Finalmente, según la invención, en el presente documento se describe una muestra de plasma sanguíneo, bilis u orina para la adquisición de datos para determinar una función de un órgano que comprende uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes que presentan un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm como marcadores.

25 Preferentemente, la muestra anterior de suero sanguíneo, bilis u orina comprende cualquiera de los colorantes de la invención tal como se han descrito anteriormente.

30 Ejemplos y experimentos

En este estudio se utilizaron ratas WISTAR macho (12-16 semanas de edad, masa corporal 400 ± 50 g, Harlan Laboratories, Horst, Países Bajos). Todas las investigaciones se llevaron a cabo según las leyes alemanas para la protección de animales y con la aprobación de la Comisión Regional de Protección de Animales de Bad Langensalza, Turingia, Alemania. Durante la preparación quirúrgica y los exámenes experimentales, la temperatura corporal se mantuvo constante a 37°C con una placa de calor y una platina de microscopio calentable. Todas las preparaciones se efectuaron en condiciones asépticas.

35 Se utilizó un modelo específico de sepsis polimicrobiana con algunas modificaciones, que fue descrito originariamente por Bauhofer (Bauhofer *et al.*, 2004, 2006, Lorenz *et al.*, 2004). En este modelo, la sepsis es inducida por contaminación e infección peritoneal (PCI).

40 Para la PCI, se utilizó un inóculo de heces humano estandarizado. Inmediatamente después de la recolección, la muestra de heces se diluyó 1:1 con caldo de tioglicolato prerreducido que contenía el 10% de sulfato de bario estéril y el 10% de glicerina y a continuación se homogeneizó en condiciones anaeróbicas. Finalmente, las muestras de heces se almacenaron a -80°C hasta su uso. Antes de la inoculación, las muestras de heces se diluyeron 1:4 en NaCl al 0,9%. El inóculo se analizó microbiológicamente para determinar el número de cepas después del almacenamiento. Las ratas se instrumentaron 24 horas antes de la PCI y se anestesiaron con desflurano (Baxter, Múnich, Alemania) por medio de una mascarilla. Para el reemplazo de líquidos, se utilizó un catéter de vena yugular (polietileno, autoclave esterilizado, DO: 1,0 mm, Portex, Reino Unido) y se canalizó subcutáneamente hasta la nuca. El catéter se montó sobre un sistema de soporte de junta giratoria que posibilitó un movimiento sin restricciones en la jaula tras la recuperación de la anestesia.

45 En estudios preliminares, la dosis del inóculo se adaptó para alcanzar una tasa de mortalidad del 100% dentro de un periodo de 40 horas. Los animales se asignaron al azar al grupo de control (intervención simulada) o al grupo de PCI. El inóculo se inyectó por vía intraperitoneal en la región pélvica con una cánula 21G bajo anestesia corta con éter. Los animales de control (intervención simulada) recibieron NaCl al 0,9% en la misma cantidad. Después del procedimiento, ambos grupos se sometieron a reemplazo de líquidos (10 ml/kg/PC/h, Jonosteril®, Fresenius Kabi GmbH, Alemania), y también recibieron alimentos y agua a voluntad.

50 Con el fin de determinar el estado clínico en un punto temporal predeterminado para futuros experimentos, la actividad se cuantificó de forma correspondiente a descripciones anteriores utilizando un sistema de puntuación (Van Griensven *et al.*, 2002). La puntuación lograda refleja la actividad espontánea, así como la reacción a una estimulación exógena. La puntuación osciló entre 1 y 5, representando 1 una actividad alta y la actividad disminuye constantemente hasta 5, que finalmente representa un estado letárgico. Además, la ingesta de alimentos (g/rata) se midió a las 15 h. Después de la laparotomía se midió el volumen de líquido peritoneal (ml/rata) y se cuantificó la generación de una película de fibrina mediante una valoración de entre 0 (ninguna) y 3 (masiva) (véase también

la figura 1). La calificación se realizó de forma independiente en una evaluación ciega por parte de dos de los autores. Ambos observadores evaluaron respectivamente cada rata. La asignación de puntos a cada rata individual se estableció finalmente a partir del promedio de ambos valores.

5 Evaluación *in vivo* de la función de aclaramiento hepático

La tasa de disminución plasmática, denominada tasa de desaparición plasmática (PDR), así como la excreción en la bilis de los colorantes DY635 (Dyomics, Jena, Alemania) y verde de indocianina se determinaron *in vivo* como un experimento comparativo (ICG; Pulsion, Munich, Alemania).

10 Los animales se anestesiaron 15 h después de la sepsis o la inducción del grupo de control. Dado que se demostró que la quetamina representaba el estado más próximo al estado consciente, medido por medio del gasto cardíaco y el flujo sanguíneo regional (Seyde *et al.*, 1984), las ratas se anestesiaron con una mezcla de quetamina (Ketamine® 50 mg/ml; Deltaselect, Pfullingen, Alemania) y midazolam (Midazolam-ratiopharm® 5mg/m; Ratiopharm, Ulm, Alemania) que se administró a través de un catéter de vena yugular (polietileno, autoclave, DO: 1.0 mm, Portex, Reino Unido) a una dosis de 40 mg/kg o de 4 mg/kg de peso corporal.

20 Se utilizó un catéter arterial para la supervisión hemodinámica. Se realizó una laparotomía de línea media y subcostal derecha y el conducto colédoco se canuló con un catéter de polietileno (polietileno, autoclave esterilizado, DO: 1.0 mm, Portex, Reino Unido) para la recogida de bilis. Finalmente, la herida se cerró con mersilene 2-0 (Ethicon, Hamburgo, Alemania) y se mantuvo la anestesia.

25 El colorante se administró a través de un catéter de vena yugular. Las muestras de sangre y bilis se tomaron en el punto cero y después cada 15 minutos durante un período de 60 minutos. Las pérdidas de sangre debidas a estas muestras de sangre se compensaron adecuadamente mediante infusiones. La supervisión hemodinámica se realizó de forma continua.

Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4.

30 Determinación *in vivo* de transporte hepatocelular y canalicular

35 Los cambios en la captación hepatocelular y la eliminación canalicular se detectaron 15 h después de la sepsis o la inducción del grupo de control mediante la obtención de imágenes *in vivo* del colorante verde de indocianina eliminado exclusivamente por hepatocitos (Pulsion, Múnich, Alemania) y del DY 635 con un microscopio de epifluorescencia invertida (AxioObserver® Z1; Zeiss, Jena, Alemania), equipado con una plataforma de barrido de alta precisión controlada por ordenador (Märzhäuser, Wetzlar, Alemania).

40 Utilizando un objetivo x40/0.6, la superficie del hígado se irradió en epi-disposición con una lámpara de mercurio de 100 W y la arquitectura hepática se visualizó mediante autofluorescencia natural de nucleótidos de piridina reducida hepatocelular (NADH) utilizando dos conjuntos de filtros con un filtro de paso de banda una excitación de 365 nm a 395 nm y un filtro de paso de banda de emisión de 445 nm a 450 nm. Para obtener imágenes del colorante indocianina verde, se utilizaron filtros de paso de banda de emisión de 775 nm a 805 nm y filtros de paso de banda de excitación de 845 nm a 855 nm.

45 Todas las imágenes de microscopio se tomaron con una videocámara digital CCD de alta resolución (C9100-13, Hammamatsu Photonics, Japón) que estaba equipada con un programa informático basado en Microsoft Windows® para operaciones de microscopio, navegación de la plataforma de barrido y análisis de imágenes (AxioVision® Rel. 4.6, Zeiss, Jena, Alemania).

50 Los animales se anestesiaron con quetamina y midazolam como anteriormente 15 h después de la sepsis o la inducción del grupo de control. Se realizó una laparotomía de línea media y subcostal izquierda para definir el lóbulo izquierdo del hígado. Para minimizar los movimientos respiratorios, se separaron los ligamentos hepáticos. El intestino se cubrió con una gasa empapada en solución salina para evitar la deshidratación del tejido. Después de transferir los animales a la plataforma del microscopio, las ratas se giraron sobre su lado izquierdo. Se expuso al descubierto el lóbulo hepático izquierdo movilizado y la superficie pragmática se dispuso sobre un cubreobjetos de microscopio (# 1; Menzel, Braunschweig, Alemania) y se fijó ligeramente con Histoacryl (Braun, Melsungen, Alemania). Normalmente pudo examinarse, por lo tanto, un área de 1-1.5 cm² del lóbulo hepático con microscopía intravital. Para prevenir la deshidratación durante la microscopía intravital, el hígado se enjuagó regularmente con una solución de Ringer caliente (37 °C).

60 En una primera etapa, se analizó la autofluorescencia hepatocelular de NADH para determinar el estado de oxidación mitocondrial (Vollmar *et al.*, 1997). Utilizando un objetivo x5 y un filtro de paso de banda de excitación de 365 nm a 395 nm y un filtro de paso de banda de emisión de 445 nm a 450 nm, se registraron 5 campos de visión seleccionados al azar por animal. Para todos los campos de visión se utilizaron configuraciones predeterminadas para la amplificación, el tiempo de exposición a la luz y la potenciación del contraste de la imagen. La autofluorescencia de NADH se determinó densitométricamente y se expresó como intensidad promedio por

65

campo de visión (unidades arbitrarias [Ua]).

Para la determinación de la microcirculación hepática, se tomaron cinco secuencias de video de 15 s con un objetivo x20 pero utilizando el mismo bloque de filtros.

5 El colapso de la perfusión sinusoidal se determinó por el número de sinusoides hepáticos no perfundidos (medido como porcentaje de sinusoides que cortan un círculo de 100 μm). Para recopilar información sobre el tipo de flujo en los sinusoides perfundidos, se determinó el índice de flujo microcirculatorio (DeBacker *et al.*, 2007) con algunas modificaciones (véase la figura 2). A este respecto, una secuencia de video se dividió en cuatro cuadrantes y el tipo de flujo predominante (1 = lento, 2 = normal, 3 = rápido) en cada cuadrante se determinó por parte de dos observadores independientes.

15 Con el fin de encontrar 16 regiones de interés (ROI) para la obtención de imágenes *in vivo* del colorante, se barrió la superficie del hígado; se identificaron 8 regiones pericentrales y 8 regiones periportales, y su posición exacta sobre la plataforma de barrido controlada por ordenador se determinó y se almacenó con el programa informático AxioVision®, de forma que las ROI predefinidas fueran accesibles durante futuros experimentos. La fototoxicidad se vio limitada por el hecho de que durante la identificación del ROI, la transmisión de luz con un filtro de densidad neutra se redujo al 20%.

20 Antes de la adición del verde de indocianina, o DY 635, se tomaron imágenes de referencia de las ROI definidas con el módulo multicanal AxioVision® (objetivo x40/0.6, filtro de paso de banda de excitación de 365 nm a 395 nm y filtro de paso de banda de emisión de 445 nm a 450 nm y filtro de paso de banda de excitación de 775 nm a 805 nm y filtro de paso de banda de emisión de 845 nm a 855 nm). Los ajustes óptimos para la amplificación, el tiempo de exposición a la luz y la potenciación del contraste de la imagen se determinaron en ensayos preliminares. Posteriormente, el colorante se administró a través de un catéter de vena yugular y se recogieron imágenes de todas las ROI cada 5 minutos durante un período de 35 minutos (véase la figura 5).

25 La intensidad de fluorescencia de verde de indocianina, o DY 635, que estaba presente de forma distribuida en los tejidos microcirculatorios y hepáticos, se cuantificó densitométricamente y se expresó como la intensidad promedio por ROI (unidades arbitrarias [Ua]).

Determinación *in vivo* de la función renal

35 Se realizaron experimentos adicionales para evaluar la función renal con DY652 (los datos no se muestran en el presente documento) y DY647.

40 Los resultados para DY 647 se muestran en la figura 7. Las imágenes muestran el tejido renal y la vasculatura renal ampliamente ramificada. Como se puede observar en las imágenes, el colorante ha abandonado el sistema vascular y se puede observar en el tejido renal, a este respecto en los túbulos renales. Después de la administración, el colorante se detectó en la orina.

Cuantificación *in vivo* de la disfunción del órgano durante la sepsis

45 Antes de la preparación quirúrgica para microscopía intravital, se tomaron muestras de sangre bajo anestesia del plexo retrobulbar de los animales para determinar la disfunción del órgano.

Posteriormente, se determinaron los valores siguientes mediante hematología veterinaria automatizada y analizadores de química clínica:

50 Hemoglobina (Hb), hematocrito (Hk), recuento de glóbulos blancos (WBC), recuento de plaquetas (PLT), aspartato aminotransferasa (AST), γ -glutamilttransferasa (γ GT), bilirrubina, albúmina, amoniaco (NH_3) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Fuji Dri-Chem 3500i y Poch-100iv-Diff, Sysmex, Leipzig, Alemania).

Estos datos se resumen en la figura 1.

55 A continuación se explicará la invención con más detalle con referencia a las figuras y los resultados siguientes.

60 Figura 1: Caracterización del modelo de sepsis utilizado. Se muestra el análisis de supervivencia después de la inducción de sepsis. La intervención se realizó 15 horas después de la inducción de sepsis (en ese punto temporal la mortalidad fue de aproximadamente el 20%). Antes del examen, los animales se evaluaron clínicamente y se determinaron diferentes parámetros de laboratorio para la evaluación de las disfunciones de los órganos.

65 Figura 2: Evaluación de la microcirculación y el estado energético 15 horas después de la inducción de la sepsis. El estado energético no se vio comprometido, la microcirculación fue moderadamente limitada.

Figura 3: Cinética del ICG en plasma y bilis. (A) muestra la concentración plasmática de ICG inmediatamente después de la administración. (B) muestra el transcurso temporal de la concentración de ICG en la bilis. (C) indica la cantidad acumulada de ICG recolectada en la bilis en un período de 60 minutos después de la administración.

Figura 4: Cinética de DY635 en plasma y bilis. (A) muestra la concentración plasmática de DY635 inmediatamente después de la administración. (B) muestra el transcurso temporal de la concentración de DY635 en la bilis. (C) indica la cantidad acumulada de DY635 recolectada en la bilis durante un período de 60 minutos después de la administración.

Figura 5: Imágenes *in vivo* de DY635 e ICG en el hígado. (A) muestra la disminución relativa en la intensidad de fluorescencia de ambos colorantes después de la administración. En los animales con sepsis se produce una acumulación del colorante (A, B).

Figura 6: Comparación de la citotoxicidad entre ICG y DY635. En cada caso, la supervivencia de los hepatocitos cultivados se muestra 24 h después de la adición de diferentes concentraciones de los colorantes (ensayo MTT).

Figura 7: Imágenes *in vivo* de la excreción de DY647 a través del riñón. 5 minutos después de la administración, el colorante puede observarse en el sistema vascular del riñón. Después de 90 minutos, el colorante ha abandonado el sistema vascular y se puede observar en los túbulos renales.

Se realizaron estudios comparativos utilizando el marcador de función hepática conocido ICG.

La figura 1 caracteriza el modelo de sepsis subyacente. En general, los animales sufrieron una sepsis grave en el punto temporal del examen. Una quinta parte de los animales ya había muerto y los animales aún vivos presentaban signos claros de enfermedad. La química de laboratorio también indica una disfunción hepática grave.

La microcirculación y el estado energético también se estudiaron, ya que determinan el transporte hepatocelular además de los sistemas de transporte celular. La figura 2 muestra que el estado energético no se vio afectado en animales con sepsis. Con respecto a la microcirculación, solo se estableció un compromiso insignificante en los animales sépticos. En total, se perfundieron menos sinusoides en los animales con sepsis. Sin embargo, funcionalmente, esto no tenía ninguna importancia, dado que 15 minutos después de la administración de ambos colorantes, casi no se detectó colorante en el plasma (no se muestran los datos).

Las figuras 3 y 4 muestran respectivamente aspectos de la cinética de los dos colorantes en suero y bilis. Inmediatamente después de la administración, se puede detectar menos ICG en el plasma de los animales con sepsis. La captación, por lo tanto, no está retardada. La medición de ICG en la bilis, también mostrada, muestra un aumento inicial en la concentración, que disminuye lentamente a partir de 30 min. A este respecto, se muestra que el grupo de control presenta un aumento mayor, así como también una disminución más rápida de la concentración de ICG. Esto se puede explicar por una mayor excreción activa a través de la membrana canalicular a la bilis en el grupo de control. Después de 60 minutos, los altos valores de ICG todavía eran medibles. Esto se puede observar en la figura 3B en la línea continua, que representa la concentración en la bilis. El deterioro de la función excretora del órgano en el grupo de sepsis es limitado en comparación con el grupo de control (referencia) y esta diferencia se puede determinar mediante las mediciones del colorante ICG en la bilis. Por lo tanto, estos resultados confirman la idoneidad de ICG como marcador de la función hepática, pero no en el sentido clásico de una medición de la tasa de desaparición plasmática (PDR-ICG). El ICG se utilizó como marcador para la función excretora del hígado en el contexto presentado en el presente documento. Numerosos trabajos científicos indican que, especialmente, los sistemas de transporte canalicular del hepatocito son muy sensibles frente a un estado proinflamatorio y, por lo tanto, se comprometen de forma temprana. Por lo tanto, las mediciones convencionales de PDR-ICG pueden indicar PDR "falsos-elevados" dado que no existe necesariamente una correlación directa entre la disminución de fluorescencia en suero medida y la función excretora del hígado. El PDR-ICG mide solo la captación e incorporación del colorante en los hepatocitos y no puede hacer ninguna declaración con respecto al rendimiento real de excreción del hígado.

Los estudios sobre la cinética del ICG en plasma y bilis se llevaron a cabo de forma análoga para DY635 (figura 4). Inmediatamente después de la administración de DY635, se detectó menos DY635 en el plasma en los animales sanos que en los animales enfermos. La captación hepatocelular se realizó, por lo tanto, de una forma prolongada. No obstante, tanto en el grupo de control como en el grupo de sepsis, el colorante se incorporó completamente en los hepatocitos dentro de un período de 15 minutos (datos no mostrados). Además, después de 60 minutos, el colorante no se pudo detectar ni en el riñón ni en la orina. La medición de DY635 en la bilis muestra que el grupo de control presenta tanto un aumento mayor como una disminución más rápida en la concentración de DY635 que el grupo de sepsis. Por lo tanto, estos resultados confirman la idoneidad de DY635 como un marcador de la función hepática.

Además, no obstante, el aumento y la disminución subsiguiente también son más pronunciados que en los ensayos

comparativos para ICG. El colorante DY635, por lo tanto, se excreta más rápidamente de forma canalicular a la bilis.

5 Además, la diferencia en la excreción a la bilis entre el grupo de control y el grupo de sepsis en DY635 es mucho más pronunciada que para ICG. Después de 60 minutos, el 60% del DY635 administrado ya se había excretado de forma canalicular en los animales de control. Por el contrario, solo se excretó el 34% en los animales con sepsis durante el mismo período. El colorante DY635 se acumula ya en animales sanos significativamente menos que el ICG, con un rendimiento excretor limitado que también da como resultado una acumulación como en el caso de ICG.

10 La figura 6 muestra que no hay evidencias de una mayor toxicidad en el ensayo citotóxico en comparación con ICG.

15 La figura 5 muestra los resultados de la toma de imágenes *in vivo* para ICG y DY635. Se utilizó microscopía intravital para registrar la fluorescencia de DY635 o ICG en áreas hepáticas periportales y perivenosas a intervalos de tiempo después de la administración. La fluorescencia proporciona información, sobre todo, sobre la acumulación hepatocelular de los colorantes. Según las determinaciones de concentración de ambos colorantes en la bilis, la intensidad de fluorescencia específica y, por lo tanto, la concentración de colorante en el tejido del órgano disminuye significativamente más en DY635 que en ICG. Además, la diferencia entre el grupo de sepsis y el grupo de control es más pronunciada en los primeros minutos después de la administración que en el ICG. Las imágenes correspondientes muestran una resolución más clara de DY635. En particular, este hecho, así como el hecho de que DY635 no es propenso a acumulación en animales sanos, hacen que DY635 sea particularmente adecuado para aplicaciones de imágenes *in vivo*.

20 Como parte de las mediciones *in vivo* en el riñón, se demostró que el colorante soluble en agua DY647 se excreta selectivamente a través del riñón (figura 7). La excreción en caso de una disfunción subyacente conduce a una excreción retardada y, por lo tanto, a una detectabilidad más prolongada en la sangre. Lo mismo se aplica a DY652. Por lo tanto, los colorantes habituales para el riñón DY652 y DY647 son adecuados como marcadores de la función renal en el diagnóstico de órganos.

30

REIVINDICACIONES

1. Uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes para su utilización como marcadores para adquirir datos para determinar una función de un órgano *in vivo*, en los que dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes presentan un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm, y siendo el órgano, cuya función se determina, el hígado y/o el riñón.

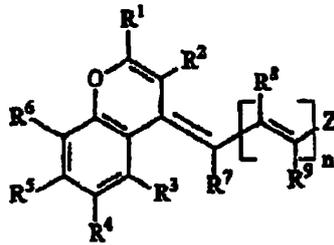
2. Uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior a igual a 820 nm, para su utilización en un procedimiento para adquirir datos para determinar una función de un órgano, que comprende las etapas siguientes:

- a) excitación radiactiva *in vivo* de dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm, como marcadores en la sangre, en un tejido o un órgano y/o en la bilis o la orina, con una fuente de radiación,
- b) detección de la emisión de fluorescencia de dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un dispositivo de detección,
- c) adquisición de los datos de la intensidad de fluorescencia medida con un dispositivo de adquisición de datos,

siendo el órgano, cuya función se determina, el hígado y/o el riñón.

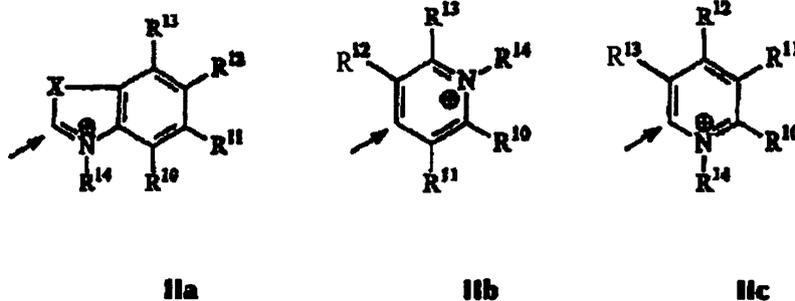
3. Uno o varios colorantes de polimetina para su utilización según la reivindicación 1 a 2, en los que el colorante es una hemicianina basada en benzopirilio o un cromóforo de indodicarbocianina.

4. Uno o varios colorantes de polimetina para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, en los que dichos uno o varios colorantes son una polimetina asimétrica, que presenta una unidad de omega-(benzo[b]piran-4-iliden)alqu-1-enilo sustituida de la estructura general I



1

con Z como derivados de benzoxazol, de benzotiazol, de 2,3,3-trimetilindolenina, de 2,3,3-trimetil-4,5-benzo-3H-indolenina, de 2- y 4-picolina, de lepidina, de quinaldina y de 9-metilacridina sustituidos de las fórmulas generales IIa o IIb o IIc



en las que

- a. X representa un elemento del grupo O, S, Se o el elemento estructural N-alquilo o C-(alquilo)₂,
- b. n representa los valores numéricos 1, 2 o 3,
- c. R¹-R¹⁴ son iguales o diferentes y pueden ser hidrógeno, uno o varios alquilo, o restos arilo, heteroarilo o

heterocicloalifáticos, un grupo hidroxilo o alcoxi, una función amina sustituida con alquilo o cíclica, y/o dos restos en posición orto, por ejemplo R¹⁰ y R¹¹, R⁴ y R⁵ y/o R⁶ y R⁵ pueden formar juntos un anillo aromático adicional,

- 5 d. por lo menos uno de entre los sustituyentes R¹-R¹⁴ puede representar un sustituyente solubilizante o ionizable o ionizado, tal como ciclodextrina, azúcar, SO₃⁻, PO₃⁻, COO⁻ o NR₃⁺, que determina las propiedades hidrófilas de estos colorantes, pudiendo este sustituyente estar unido asimismo al colorante a través de un grupo espaciador,

10 y

R¹ representa un sustituyente, que presenta un átomo de C cuaternario en la posición alfa con respecto al anillo de pirano, siendo preferidos t-butilo o adamantilo.

- 15 5. Uno o varios colorantes de polimetina para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4 para determinar la función renal, en los que dichos uno o varios colorantes son solubles en agua, pero insolubles en DMF o DMSO

20 o

para determinar la función hepática, siendo dichos uno o varios colorantes solubles en DMF o DMSO e insolubles en agua.

- 25 6. Uno o varios colorantes de polimetina para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, en los que dichos uno o varios colorantes presentan una carga neutra en solución fisiológica o están presentes cargados como máximo con una carga única y/o preferentemente presentan como máximo dos sustituyentes solubilizantes o ionizables o ionizados,

30 o

en los que dichos uno o varios colorantes están presentes en solución fisiológica cargados con por lo menos una carga doble y/o preferentemente presentan por lo menos tres o cuatro sustituyentes solubilizantes o ionizables o ionizados.

- 35 7. Uno o varios colorantes de polimetina para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, en los que dichos uno o varios colorantes se seleccionan de entre el grupo que comprende: DY630, DY631, DY632, DY633, DY634, DY635, DY636, DY647, DY648, DY649, DY650, DY651 y DY652, así como DY590, DY548, DY495, DY405.

- 40 8. Uno o varios colorantes de polimetina para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7 para monitorizar una función de un órgano después de un trasplante de hígado o riñón, para el diagnóstico de pacientes críticamente enfermos con sepsis o con insuficiencia de órganos múltiple o para un examen de prevención.

- 45 9. Procedimiento para adquirir datos para determinar una función de un órgano *in vivo/ex vivo*, que comprende las etapas siguientes:

50 a) excitación radiactiva *in vivo* de dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm, como marcadores en la sangre, en un tejido o un órgano y/o en la bilis o la orina, con una fuente de radiación,

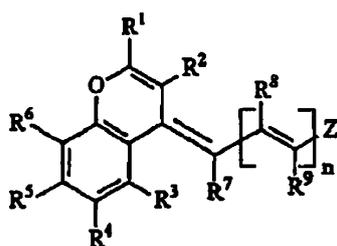
b) detección de la emisión de fluorescencia de dichos uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes con un dispositivo de detección,

55 c) adquisición de los datos de la intensidad de fluorescencia medida con un dispositivo de adquisición de datos,

siendo el órgano, cuya función se determina, el hígado y/o el riñón.

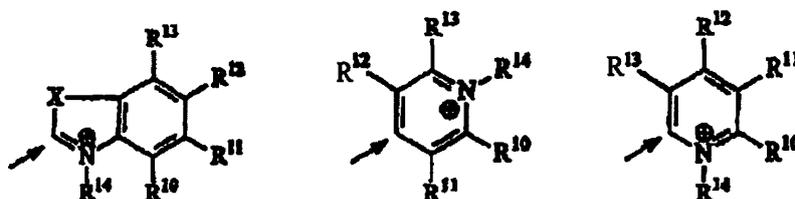
- 60 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el colorante es una hemicianina basada en benzopirilo o un cromóforo de indodicarbocianina.

- 65 11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, en el que dichos uno o varios colorantes son una polimetina asimétrica, presentando una unidad omega-(benzo[b]piran-4-iliden)alqu-1-enilo sustituida de la estructura general I:



1

5 con Z como derivados de benzoxazol, de benzotiazol, de 2,3,3-trimetilindolenina, de 2,3,3-trimetil-4,5-benzo-3H-indolenina, de 2- y 4-picolina, de lepidina, de quinaldina y de 9-metilacridina sustituidos de las fórmulas generales IIa o IIb o IIc



IIa

IIb

IIc

en las que

- 10 a. X representa un elemento del grupo O, S, Se o el elemento estructural N-alquilo o C-(alquilo)₂,
- b. n representa los valores numéricos 1, 2 o 3,
- 15 c. R¹-R¹⁴ son iguales o diferentes y pueden ser hidrógeno, uno o varios alquilo, restos arilo, heteroarilo o heterocicloalifáticos, un grupo hidroxilo o alcoxi, una función amina sustituida con alquilo o cíclica, y/o dos restos en posición orto, por ejemplo R¹⁰ y R¹¹, R⁴ y R⁵ y/o R⁶ y R⁵ pueden formar juntos un anillo aromático adicional,
- 20 d. por lo menos uno de entre los sustituyentes R¹-R¹⁴ puede representar un sustituyente solubilizante o ionizable o ionizado, tal como ciclodextrina, azúcar, SO₃⁻, PO₃⁻, COO⁻ o NR₃⁺, que determina las propiedades hidrófilas de estos colorantes, pudiendo este sustituyente también estar unido al colorante a través de un grupo espaciador,

y

25 R¹ representa un sustituyente, que presenta un átomo de C cuaternario en la posición alfa con respecto al anillo de pirano, siendo preferidos t-butilo o adamantilo.

30 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 11 para determinar la función renal, en el que dichos uno o varios colorantes son solubles en agua, pero son insolubles en DMF o DMSO o para determinar la función hepática, en el que dichos uno o varios colorantes son solubles en DMF o DMSO y son insolubles en agua.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 12,

35 en el que dichos uno o varios colorantes presentan una carga neutra en solución fisiológica o están presentes cargados como máximo con una carga única y/o preferentemente presentan como máximo dos sustituyentes solubilizantes o ionizables o ionizados,

o

40 en el que dichos uno o varios colorantes están presentes en solución fisiológica cargados con por lo menos una carga doble y/o preferentemente presentan por lo menos tres o cuatro sustituyentes solubilizantes o ionizables o ionizados.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 13, en el que dichos uno o varios colorantes se

seleccionan de entre el grupo que comprende:

DY630, DY631, DY632, DY633, DY634, DY635, DY636, DY647, DY648, DY649, DY650, DY651 y DY652, así como DY590, DY548, DY495, DY405.

- 5
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 14 para monitorizar una función de un órgano después de un trasplante de hígado o riñón, para el diagnóstico de pacientes críticamente enfermos con sepsis o con insuficiencia de órganos múltiple, o para un examen de prevención.
- 10
16. Muestra de suero sanguíneo, bilis u orina para su utilización para la adquisición de datos para determinar una función de un órgano, que comprende uno o varios colorantes de polimetina fluorescentes, según una de las reivindicaciones 1 a 8, con un máximo de emisión de fluorescencia, medido en etanol, inferior o igual a 820 nm como marcadores, siendo el órgano, cuya función se determina, el hígado y/o el riñón.

Puntuación		simulada VM ± SEM	sepsis VM ± SEM	p<0.05
Puntuación de la actividad (1 - muy activo a 5 - letárgico)				
Consumo de alimento (g/24 h/rata)		11 ± 0.7	1.0 ± 0.0	*
Gasto de anestesia [Es.-Insp. (% en volumen)]		9 ± 0.2	3.9 ± 0.2	*
Ascitis (ml)		0	1.0 ± 0.5	*
Depósitos de fibrina (0 - ninguno a 3 - masivos)		0	4.6 ± 0.2	*
Flujo de bilis acumulativo [μ l·kg ⁻¹ min ⁻¹]		62.4 ± 4.0	5.3 ± 0.5	*
			2.6 ± 0.2	*
			24.7 ± 2.4	*
Análisis de supervivencia		simulada VM ± SEM	sepsis VM ± SEM	p<0.05
Laboratorio		simulada VM ± SEM	sepsis VM ± SEM	p<0.05
WBC [$\times 10^3/\mu$ l]		5 ± 0.4	0.9 ± 0.1	*
Hb [mmol/l]		9.6 ± 0.2	11.9 ± 0.3	*
Hk [%]		40.2 ± 0.6	49.4 ± 1.2	*
PLT [$\times 10^3/\mu$ l]		504.4 ± 32.1	294.7 ± 53.1	*
GGT [U/l]		3.4 ± 0.6	3.2 ± 2.1	*
AST [U/l]		76.3 ± 11.7	202.3 ± 43.5	*
ALT [U/l]		32 ± 5.2	90.6 ± 16.8	*
NH3 [μ mol/l]		200.2 ± 21.4	278.4 ± 35.9	n.s.
TBIL [μ mol/l]		7.1 ± 0.6	15.2 ± 1.3	*
LDH [U/l]		233.3 ± 25.7	695.4 ± 65.8	*
ALB [g/dL]		2.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	*
ALP [U/l]		155.2 ± 15.7	158.4 ± 25.1	*

Fig. 1

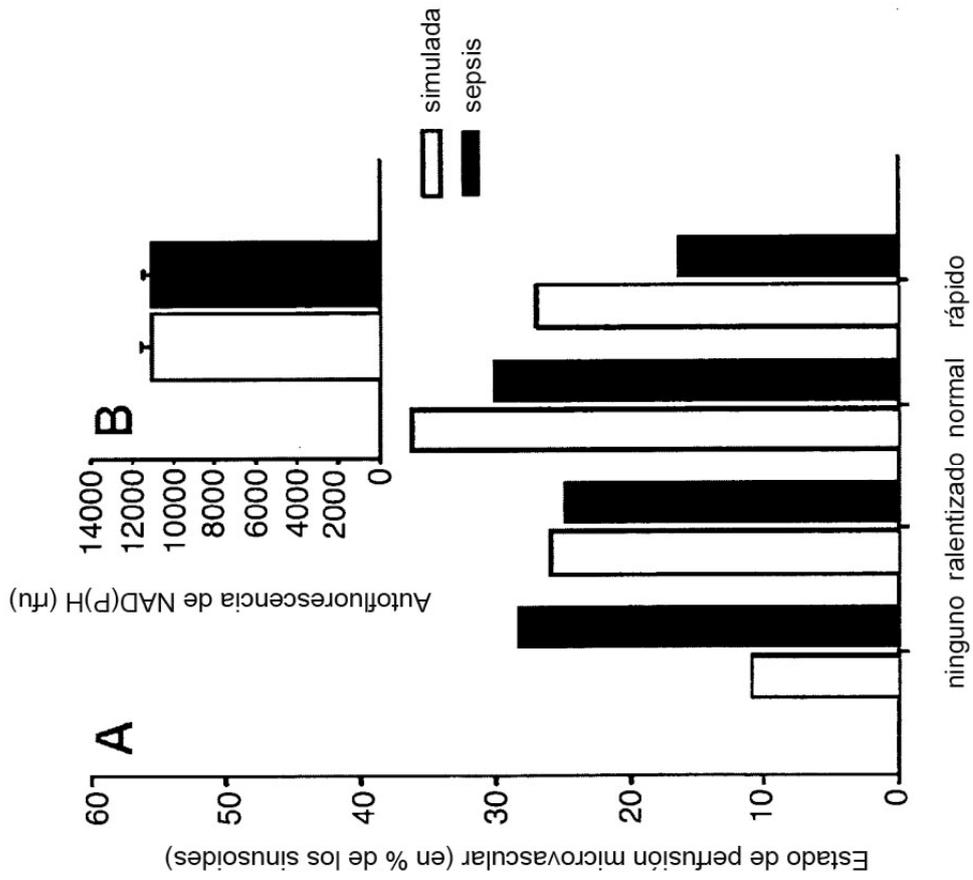
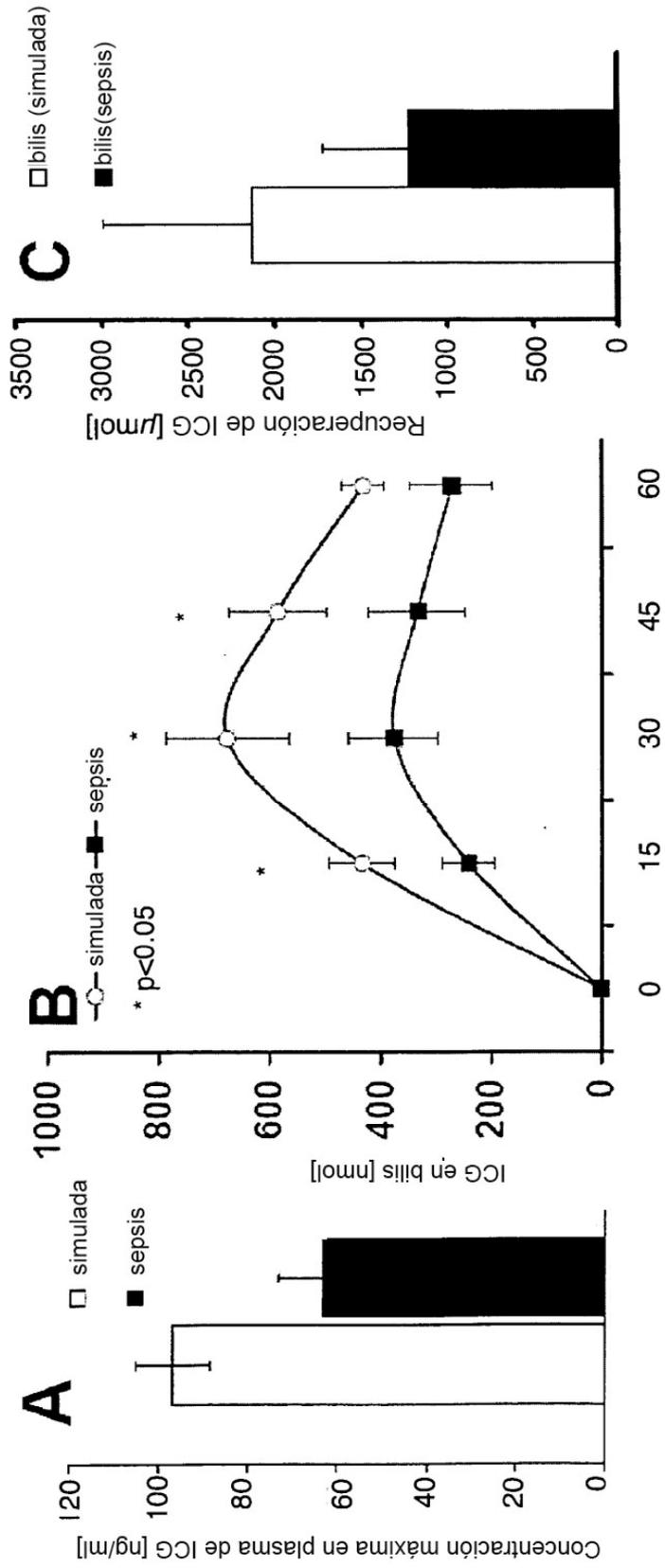


Fig. 2



Tiempo (en min) después de la administración de ICG

Fig. 3

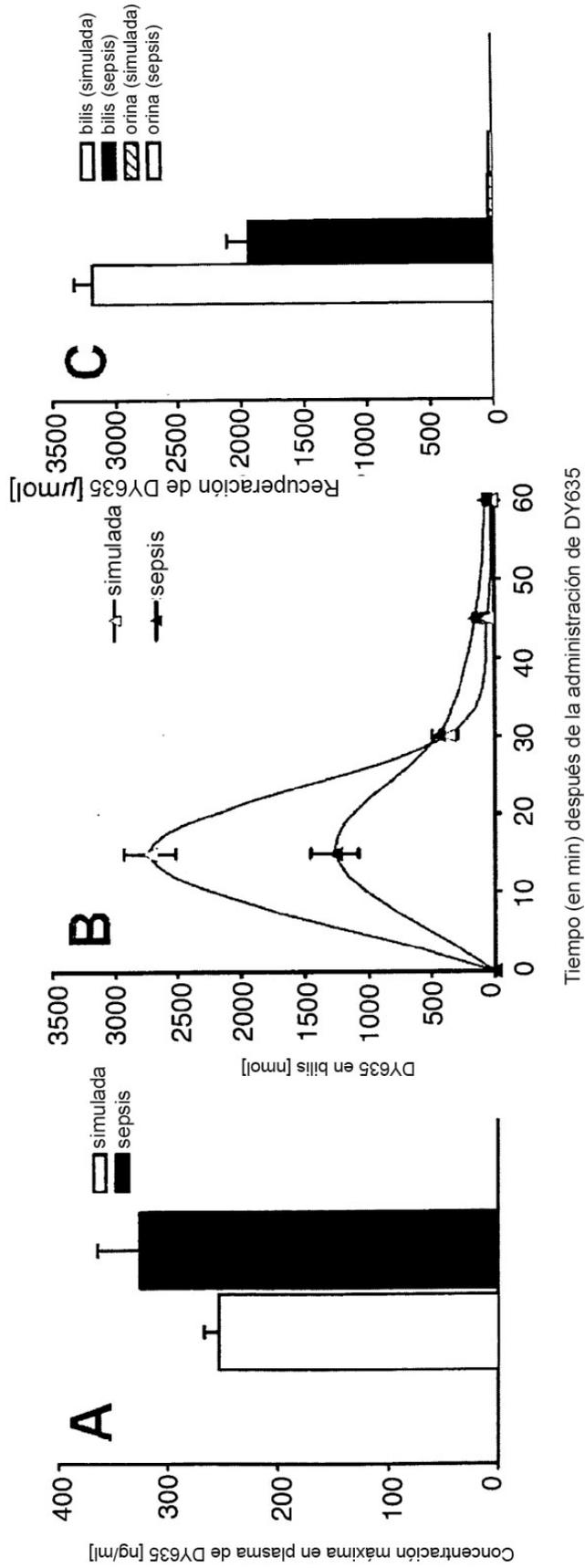


Fig. 4

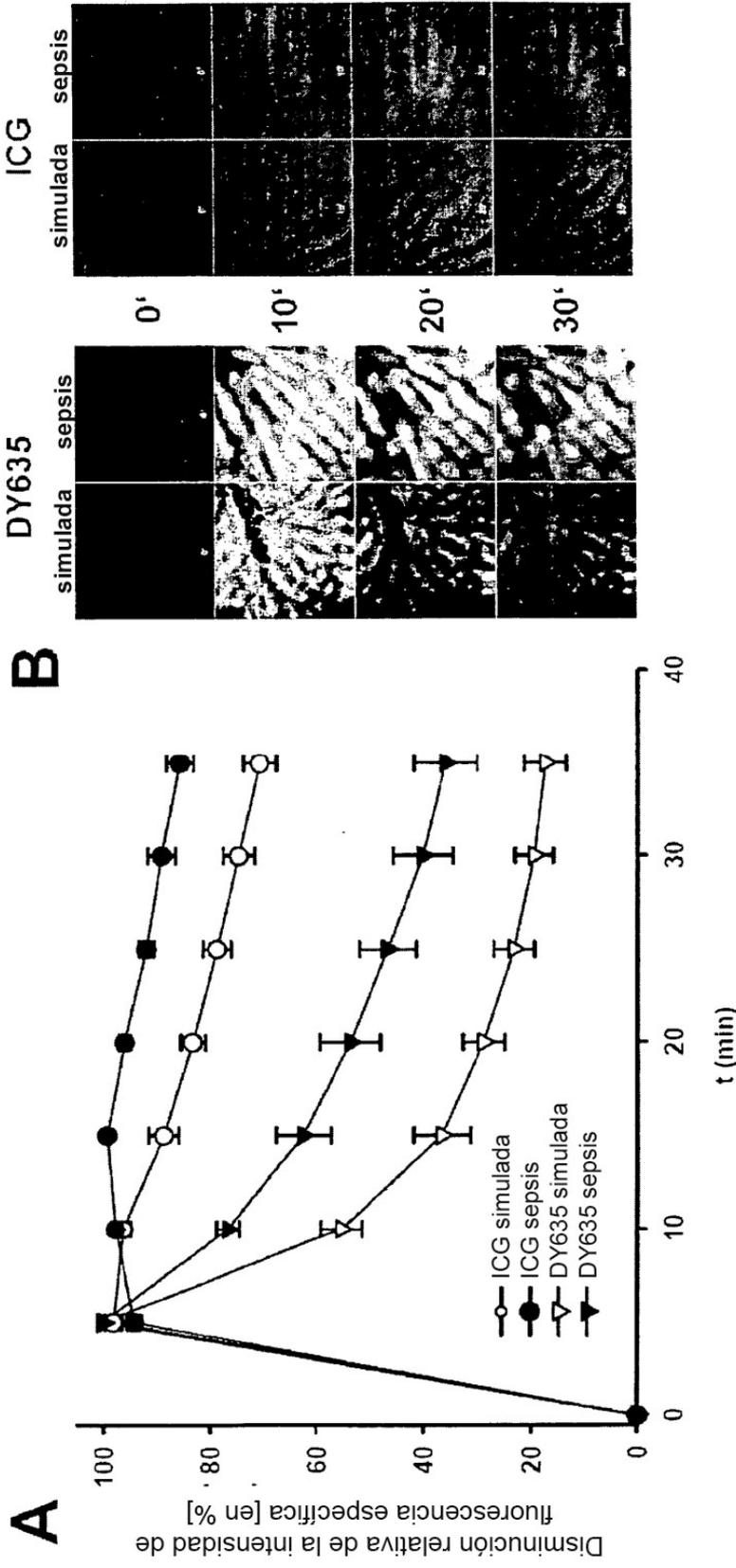


Fig. 5

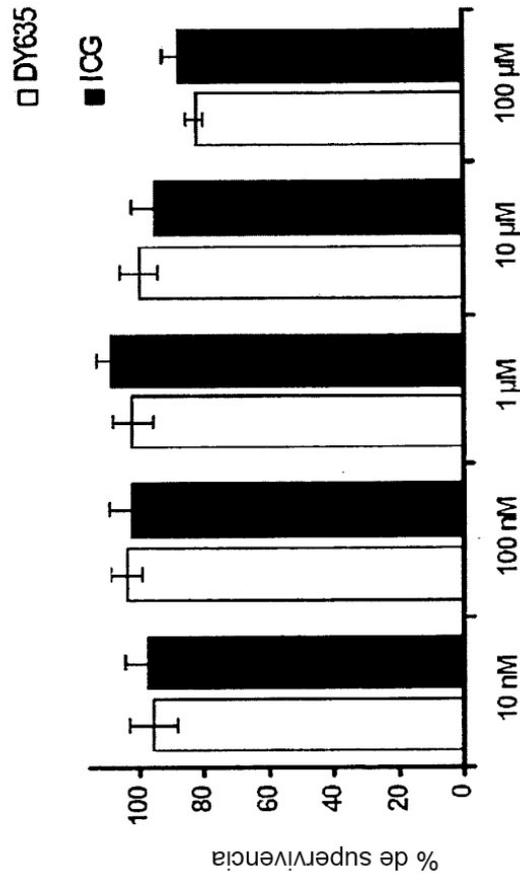


Fig. 6

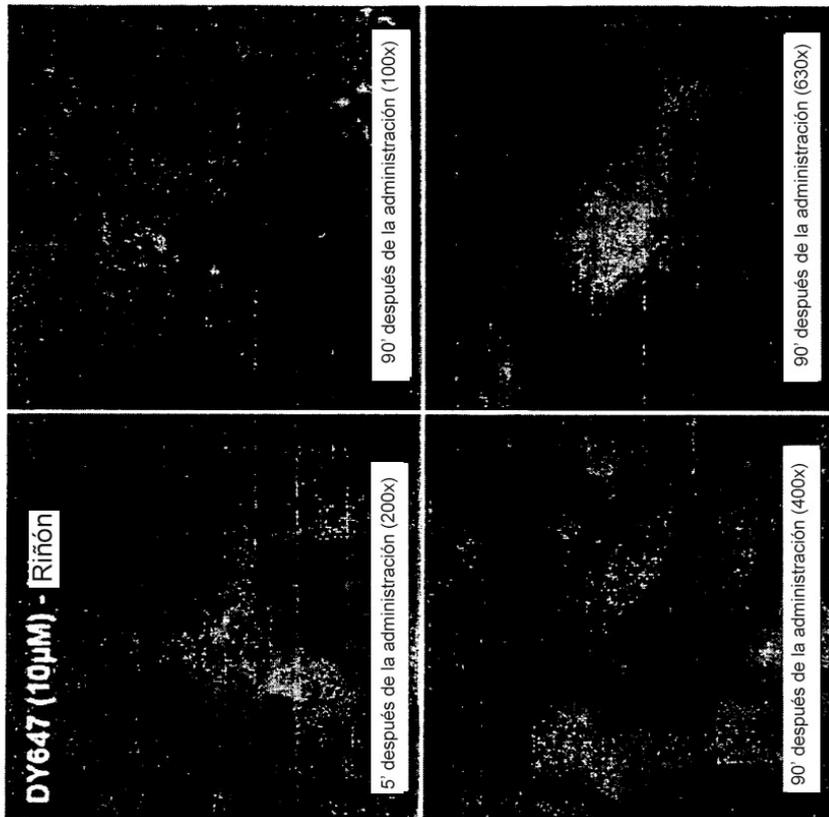


Fig. 7