



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 189**

51 Int. Cl.:  
**A61K 49/22** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61B 8/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03754316 .2**  
86 Fecha de presentación : **01.10.2003**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1549355**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de ganglios linfáticos centinela.**

30 Prioridad: **03.10.2002 NO 20024755**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.08.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2007**

73 Titular/es: **GE Healthcare AS.**  
**P.O. Box 4220, Nydalen Nycoveien 1-2**  
**0401 Oslo, NO**

72 Inventor/es: **Tornes, Audun;**  
**Ostensen, Jonny;**  
**Rasmussen, Henrik y**  
**Hoff, Lars**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 278 189 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 para la identificación de ganglios linfáticos centinela.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la identificación de un ganglio linfático centinela.

El sistema linfático está compuesto por vasos y conductos que comienzan en los tejidos y están diseñados para transportar fluido linfático a los ganglios linfáticos locales donde se filtra el fluido y se procesa y se envía al siguiente ganglio linfático debajo de la línea hasta que el fluido alcanza el conducto torácico donde entra en el torrente sanguíneo. El fluido linfático que entra en los vasos linfáticos transporta con el mismo, sustancias y materiales del tejido, por ejemplo, antígenos, partículas y células. Los ganglios linfáticos procesan el fluido linfático filtrándolo y los macrófagos de su interior retiran el material particulado y celular transportado por el fluido linfático mediante fagocitosis.

15 Cuando existe cáncer en tejidos u órganos, su matriz libre puede permitir el desalojo de células que consiguen acceder al sistema linfático, llegando a quedar atrapadas en el ganglio linfático y crecer. En las fases tempranas del desarrollo de un cáncer en el ganglio, el cáncer permanece limitado al ganglio. Sin embargo, con el tiempo, el depósito nodal puede crecer hasta reemplazar totalmente el ganglio y/o puede propagarse aguas abajo al siguiente ganglio. Los ganglios linfáticos que drenan el tejido u órgano de interés (es decir, el tejido canceroso) se llaman ganglios linfáticos regionales y el primer ganglio que atrapa el cáncer se llama ganglio linfático centinela.

20 Los patrones en la propagación de tumores son complicados, ya que la metástasis no provoca simplemente la propagación de las células neoplásicas al siguiente ganglio físicamente más cercano. Estos ganglios probablemente contienen el ganglio linfático centinela; sin embargo, el ganglio linfático centinela puede estar en un grupo nodal más distal. Esto puede suceder debido a que tumores, infecciones, lesiones o tratamientos previos pueden bloquear los vasos linfáticos que drenan directamente el tejido u órgano de interés, promoviendo el desarrollo de vías aberrantes.

30 En el pasado, en algunas situaciones la práctica normal ha sido retirar todos los ganglios linfáticos que potencialmente alberguen células neoplásicas metastatizadas desde un tumor. Con esta práctica está asociado un elevado índice de morbilidad. Por tanto, se desarrollaron varios procedimientos para identificar y biopsiar el ganglio linfático centinela. Si el ganglio linfático centinela está libre de células neoplásicas, entonces pueden evitarse biopsias adicionales de ganglios linfáticos y disecciones (adicionales) de ganglios linfáticos. Se han identificado los ganglios linfáticos centinela inyectando un agente marcador en el tejido que tiene el tumor y rastreando el paso del sistema marcador a través del sistema linfático.

35 Se han empleado agentes marcadores visibles para detectar visualmente el ganglio linfático a simple vista (A.E. Giuliano y col., Ann. Surg. 220, 1994, 391-401). Dicho procedimiento requiere una disección quirúrgica significativa. Los ganglios no se pueden distinguir del tejido adyacente salvo que se tiñan y los colorantes desafortunadamente tienen una eliminación impredecible y rápida.

40 El documento US-A-5.732.704 describe un procedimiento para detectar ganglios linfáticos centinela usando compuestos radiofarmacéuticos y la localización de dichos compuestos con la ayuda de una sonda de detección de radiación. Aunque dichos compuestos tienen un tránsito más retardado, los pacientes y el personal médico están expuestos a dosis potencialmente dañinas de radiación ionizante. Los isótopos radiactivos también tienen problemas de contaminación medioambiental y eliminación.

45 El documento US-A-5.496.536 describe un procedimiento de linfografía usando partículas que son de menos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y detectando esas partículas con diferentes modalidades de formación de imágenes. Como se observó en C. Oussoren y col., Biochim Biophys. Acta 1328, 1997, 261-272, se captan pequeñas partículas en los capilares linfáticos a un elevado grado; sin embargo, sólo se retienen pobremente en los ganglios linfáticos. Dichas pequeñas partículas generalmente son dispersores de ultrasonidos menos eficaces y por tanto no son muy adecuados para linfografía basada en ultrasonidos. A causa de su mala retención en los ganglios linfáticos, no son suficientemente selectivas para detectar solamente el ganglio linfático centinela, sino que avanzarán hasta otros ganglios linfáticos.

55 La observación hecha por Oussoren y col. se afirmó por las descripciones de los documentos WO-A-00/45855 y WO-A-00/38579.

60 El documento WO-A-00/38579 describe un procedimiento para detectar ganglios linfáticos centinela usando un agente de contraste que es capaz de migrar al ganglio linfático en una cierta franja de tiempo - preferiblemente en menos de 3 horas - y detectando dicho agente de contraste con una modalidad de detección adecuada. Para migrar en esta franja de tiempo, el agente de contraste debe comprender partículas entre 0,05 y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

65 El documento WO-A-00/45855 describe un procedimiento para identificar el ganglio linfático centinela usando agentes de contraste particulados que tienen un tamaño medio de partícula de 1 - 10  $\mu\text{m}$  y una modalidad de formación de imágenes para detectar dichos agentes de contraste en el ganglio linfático.

Como se muestra en el documento WO-A-00/38579 y WO-A-00/45855, el tamaño de las partículas del agente de contraste parece tener un impacto significativo sobre la funcionalidad de los procedimientos descritos en dichos documentos. Desafortunadamente, los procedimientos descritos no funcionan igualmente bien con respecto a los agentes

## ES 2 278 189 T3

de contraste y las modalidades de formación de imágenes empleadas. Aunque tengan aproximadamente el mismo tamaño, los diferentes agentes de contraste usados para la misma modalidad de formación de imágenes se comportan significativamente diferentes, por tanto, el uso de ciertos agentes de contraste en los procedimientos descritos puede provocar una sensibilidad insuficiente.

5

Por consiguiente, existe la necesidad de un procedimiento fiable para identificar el ganglio linfático centinela. Además, dicho procedimiento debe ser sensible, seguro y fácil de realizar.

Se ha descubierto sorprendentemente que un procedimiento para la identificación de un ganglio linfático centinela en un sujeto que comprende

a) administrar a dicho sujeto una preparación que comprende microburbujas que comprenden una cubierta que comprende del 50-100% de fosfolípidos cargados negativamente y un gas o precursor gaseoso, teniendo dichas microburbujas un tamaño medio de partículas de aproximadamente 0,25 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y una estabilidad a la presión de al menos el 50% a una presión de 120 mm Hg,

15

b) permitir que dichas microburbujas se acumulen en dicho ganglio linfático centinela y

c) detectar dichas microburbujas en dicho ganglio linfático centinela usando formación de imágenes por ultrasonidos

20

cumple los criterios indicados anteriormente.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para el uso de microburbujas para la fabricación de una preparación de ultrasonidos para la identificación de un ganglio linfático centinela en un sujeto, donde las microburbujas comprenden una cubierta que comprende del 50 al 100% de fosfolípidos cargados negativamente y un gas o precursor gaseoso, teniendo dichas microburbujas un tamaño medio de partículas de 0,25 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y una estabilidad a la presión de la menos el 50% a una presión de 120 mm Hg.

25

Las microburbujas de acuerdo con la invención permanecen intactas después de su inyección. No solamente se captan fácilmente por el sistema linfático y el ganglio linfático centinela sino que también se retienen en el ganglio linfático centinela y permanecen estables, permitiendo de este modo una detección de ultrasonidos sensible y eficaz.

30

En el contexto de la presente invención, "sujeto" significa un sujeto vertebrado como un pájaro o un mamífero y preferiblemente un ser humano.

35

Las microburbujas y/o las preparaciones de acuerdo con la invención deben ser biocompatibles o no fisiológicamente nocivas o dañinas para las funciones biológicas, y que no provocarán ningún grado de toxicidad inaceptable, incluyendo respuestas alérgicas y patológicas.

40

Las microburbujas en el contexto de la invención comprenden una cubierta y un gas o precursor gaseoso.

El término "cubierta" en el contexto de la presente invención puede usarse de forma intercambiable con el término "pared" o "membrana" y significa material que rodea o define una microburbuja. La cubierta puede ser en forma de una o más capas, preferiblemente en forma de una única monocapa o una bicapa (unilamelar), y puede usarse la mono o bicapa para formar una o más mono o bicapas (oligo o multilamelares). En el caso de más de una mono o bicapa, las mono o bicapas son preferiblemente concéntricas. La cubierta está compuesta de o comprende fosfolípidos, por ejemplo, fosfatidilcolinas, preferiblemente dilauril fosfatidilcolina, dimiristoil fosfatidilcolina, diheptadecanoil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, diestearoil fosfatidilcolina, diaraquidilcolina, dibehenoil fosfatidilcolina, fosfatidilserinas, preferiblemente dipalmitoil o diestearoil fosfatidilserina, fosfatidilgliceroles, preferiblemente dipalmitoil o diestearoil fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolaminas, preferiblemente dipalmitoil o diestearoil fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositales, preferiblemente dipalmitoil o diestearoil fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, preferiblemente ácido dipalmitoil o diestearoil fosfatídico, cardiolipinas o cualquier mezcla de los compuestos enumerados anteriormente, opcionalmente en una mezcla con colesterol, sulfato de colesterol, hemisuccinato de colesterilo, *N*-palmitoil homocisteína, ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico o ácido araquídico. Como alternativa, la cubierta también puede estar compuesta de o comprender análogos fluorados de los lípidos mencionados anteriormente. En otra realización preferida, la cubierta está compuesta de o comprende los lípidos mencionados anteriormente que están covalentemente unidos a polímeros hidrófilos tales como polietilenglicol (PEG), preferiblemente PEG 2000 - 8000, por ejemplo, dipalmitoil o diestearoil fosfatidiletanolamina-polietilenglicol 5000. La cubierta está compuesta de o comprende en una cantidad del 50 al 100%, más preferiblemente en una cantidad del 70 al 90% de fosfolípidos cargados negativamente, más preferiblemente fosfolípidos cargados negativamente basados en ácidos grasos que tienen al menos 14 átomos de carbono, por ejemplo, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido oleico o ácido araquídico, por ejemplo, dipalmitoil fosfatidilglicerol o dipalmitoil fosfatidiletanolamina-PEG.

50

55

60

El término "precursor gaseoso" en el contexto de la presente invención indica un material que es un líquido o un sólido a temperatura y presión ambiente y cambia su fase de líquido a gas a la temperatura relevante, por ejemplo, la temperatura corporal del paciente. Cuando se hacer referencia a "gas" y "precursor gaseoso", se entenderá que las mezclas de gases y precursores gaseosos están es la definición.

65

## ES 2 278 189 T3

Adecuadamente, las microburbujas de acuerdo con la invención comprende aire, nitrógeno y compuestos fluorados, parcialmente fluorados o completamente fluorados (compuestos perfluorados), así como compuestos puros y mezclas de los mismos. En una realización preferida, las microburbujas comprenden compuestos perfluorados, por ejemplo, perfluoropropano, perfluorobutano, perfluoropentano, perfluorohexano, hexafluoruro de azufre y similares, 5 opcionalmente en mezcla con nitrógeno.

Las microburbujas de acuerdo con la invención tienen un tamaño medio de partícula de 0,25 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, preferiblemente 0,5 - 7  $\mu\text{m}$ , en particular preferiblemente 1 - 5  $\mu\text{m}$ .

10 Las microburbujas de acuerdo con la invención tienen una estabilidad a la presión de al menos el 50% a una presión de 120 mm Hg. En el contexto de la invención, la expresión "estabilidad a la presión de la menos en 50%" significa que la eficacia de atenuación acústica de las microburbujas después de exponerse a una presión de 120 mm Hg es al menos el 50% de la eficacia de atenuación acústica de dichas microburbujas antes de exponerse a dicha presión. Por tanto, comparando la eficacia de atenuación acústica de las microburbujas antes y después de la exposición a la 15 presión, puede obtenerse una medición de la eficacia de formación de imágenes por ultrasonidos de la microburbuja. La eficacia de atenuación acústica puede determinarse midiendo la amortiguación (dB/cm) de una onda de sonido que va a través de una suspensión diluida de la muestra de microburbujas usando uno o dos transductores de banda ancha con frecuencias centrales de 3,5 y/o 5,0 MHz. La transmisión se mide por técnica de pulso-eco; se emiten cortos pulsos de sonido desde el transductor y atraviesan a través de un compartimiento de células antes de reflejarse desde la pared posterior del compartimiento y se reciben de nuevo por el transductor emisor. Los pulsos se digitalizan por un osciloscopio y se calculan los espectros de frecuencia por la transformada de Fourier. Para compensar el paso de transmisión y las características del transductor, los espectros se normalizan a los espectros del diluyente puro. Se describe una descripción detallada de la medición de los espectros de atenuación y una preparación de sistema adecuada para ello en L. Hoff, Acoustic Characterization of Contrast Agents for Medical Ultrasound Imaging, 20 Kluwer Academic Publishers, 2001, capítulo 4, página 99-109, cuya descripción se incorpora en este documento como referencia. El análisis se realiza normalmente en el intervalo de 0°C a 50°C, preferiblemente a temperatura ambiente. En una primera etapa del análisis, se toma un espectro de referencia del diluyente. Los diluyentes adecuados están libres de burbujas de aire y podría usarse cualquier líquido en el que sean estables las microburbujas, preferiblemente los diluyentes son solución salina isotónica tipo Isoton II (Coulter Electronics Ltd. Luton, UK), una solución salina al 25 0,9% que comprende un tampón fosfato y un detergente para reducir la tensión superficial. En una siguiente etapa, la muestra de microburbuja se mezcla con un diluyente y se mide uno o más espectros de atenuación a presión ambiental. La concentración de muestra de microburbujas se adapta al tamaño de las microburbujas. Preferiblemente, el factor de dilución es tal que la atenuación de la muestra de microburbujas está entre 15 y 20 dB, es decir, aproximadamente 3 dB/cm. Esto típicamente significa que las microburbujas están diluidas en un factor de  $10^3$  a  $10^4$ . En una siguiente 30 etapa, la presión se eleva a 120 mm Hg y se mide uno o más espectros de atenuación. Para determinar la estabilidad a la presión de acuerdo con la invención, se ajusta la eficacia de atenuación acústica de la muestra de microburbujas antes de la presión al 100% permitiendo de este modo el cálculo de la eficacia de atenuación acústica relativa de la muestra de microburbujas después de la presión.

40 En una realización preferida, las microburbujas de acuerdo con la invención tienen una estabilidad a la presión de al menos el 70%, más preferiblemente de al menos el 85%, mucho más preferiblemente de al menos el 95%.

En una realización preferida, las microburbujas de acuerdo con la invención son estables a variaciones de presión asociadas con la formación de imágenes por ultrasonidos de un índice mecánico de al menos 0,2. Se describe un procedimiento para determinar la estabilidad de las microburbujas asociada con las presiones de formación de imágenes por ultrasonidos en W.T. Shi y col., Ultrasound in Med. & Biol., Vol. 26, 2000, 1-11.

Adecuadamente, las microburbujas de acuerdo con la invención son ecogénicas, es decir, son capaces de dispersar o reflejar ondas de ultrasonidos. Preferiblemente, las microburbujas están adaptadas para devolver una señal a una frecuencia diferente de la frecuencia de transmisión del pulso de ultrasonidos. Es decir, las microburbujas están adaptadas para la formación de imágenes por ultrasonidos armónicos como se describe en el documento US 5.540.909.

Las microburbujas de acuerdo con la invención pueden prepararse en una diversidad de modos que son fácilmente evidentes para los especialistas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, agitación, agitación con vórtice, sonicación, extrusión, ciclos de congelación y descongelación repetidos, extrusión a presión a través de poros de tamaño definido o secado por pulverización. Por ejemplo, para microburbujas que comprenden lípidos, el medio que contiene lípidos puede someterse a cualquier técnica apropiada que genere emulsión, por ejemplo, sonicación, homogeneización a alta presión, mezcla con alta cizalla, en presencia del gas o precursor gaseoso seleccionado. El gas empleado en la etapa de emulsionado no tiene que ser igual que en la microburbuja final. Por tanto, la mayoría de este gas puede retirarse durante una posterior etapa de liofilización y el gas residual puede retirarse por evacuación del producto secado, al que puede aplicarse después una atmósfera o sobrepresión del producto final gaseoso deseado (véase por ejemplo el documento WO-A-97/29783).

Otros procedimientos para formar microburbujas de acuerdo con la invención incluyen la formación de microburbujas que comprenden proteínas (documentos EP-A-359 246 y US 4.718.433), la formación de microburbujas que contienen lípidos (documento US 4.684.479) y la formación de microburbujas liposomales (documentos US 5.088.499; US 5.123.414 y WO-A-94/28874).

## ES 2 278 189 T3

De acuerdo con el procedimiento de la invención, las microburbujas se administran en forma de una preparación, preferiblemente en forma de una preparación líquida. A continuación, se usa el término “preparación” de forma intercambiable con la expresión “preparación de microburbujas”.

5 Las preparaciones de acuerdo con la invención comprenden las microburbujas descritas anteriormente y uno o más componentes seleccionados entre el grupo constituido por agentes osmóticos, estabilizantes, tensioactivos, tampones, moduladores de la viscosidad, emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes de suspensión, agentes humectantes, antioxidantes, agentes que aumentan la viscosidad, agentes que elevan la isotonicidad, sales, azúcares y similares. Dichos componentes se añaden para asegurar una vida y eficacia máximas de las microburbujas. Además, las consideraciones de esterilidad, isotonicidad y biocompatibilidad pueden gobernar el uso de dichos componentes.

15 Los moduladores de la viscosidad adecuados incluyen, por ejemplo, carbohidratos y sus derivados fosforilados y sulfonatados; poliéteres, preferiblemente con intervalos de pesos moleculares entre 400 y 100.000 y di y trihidroxi alcanos y sus polímeros, preferiblemente con los intervalos de peso molecular entre 200 y 50.000.

20 Los agentes emulsionantes y/o solubilizantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma arábica, colesterol, monoestearato de glicerilo, alcoholes de lanolina, lecitina, mono y diglicéridos, etanolamina, ácido dietanolamina oleico, alcohol olefílico, poloxámero, por ejemplo, poloxámero 188, poloxámero 184, y poloxámero 181, estearato de polioxietileno 50, aceite de ricino polioxilo 35, polioxil 10 oleil éter, polioxil 20 cetostearyl éter, estearato de polioxilo 40, polisorbato 50, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, diacetato de propilenglicol, monoestearato de propilenglicol, lauril sulfato sódico, estearato sódico, mono-laurato de sorbitán, mono-oleato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, ácido esteárico, trolamina, cera emulsionante.

30 Los agentes de suspensión y/o que aumentan la viscosidad adecuados incluyen, por ejemplo, goma arábica, agar, ácido algínico, mono-estearato de aluminio, bentonita, magma, carbómero 934 P, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, carragenina, dextrano, gelatina, goma guar, coma de algarrobilla, veegum, silicato de magnesio y aluminio, dióxido de silicio, zeolitas, pectina, óxido de polietileno, povidona, alginato de propilenglicol, alginato sódico, tragacanto, goma xantana, alfa-d-gluconato, glicerol y manitol.

Los agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), poli (alcohol vinílico) (PVA), polipropilenglicol (PPG), polisorbato y similares.

35 Los agentes que aumentan la isotonicidad adecuados que estabilizan y añaden tonicidad son, por ejemplo, sorbitol, manitol, trehalosa, sacarosa, propilenglicol y glicerol.

40 Las preparaciones de acuerdo con la invención pueden comprender adicionalmente colorante o agentes biológicamente activos, preferiblemente seleccionados entre el grupo constituido por analgésicos, antibióticos, inhibidores o antagonistas de leucotrienos, antihistaminas, anti-inflamatorios, antineoplásicos, anticolinérgicos, anestésicos, enzimas, esteroides, material genético, vectores virales, agentes anti-sentido, proteínas y péptidos.

45 En una realización preferida, las preparaciones comprenden adicionalmente compuestos que promueven la captación de los macrófagos, por ejemplo, mananos, por ejemplo zimosan, oligo y polisacáridos que contienen manosa, partes Fc (fragmento cristalizante) de moléculas de inmunoglobulina, componentes del complemento, por ejemplo C3b o C3bi, ligandos de receptores scavenger, ligandos de receptores tipo toll, ligandos de LRP (proteínas de tipo receptor de LDL), glicopéptidos o lipopolisacáridos bacterianos por ejemplo bleomicina o endotoxina.

50 Las preparaciones son preferiblemente formulaciones inyectables estériles como suspensiones o emulsiones que comprenden vehículos adecuados incluyendo soluciones acuosas o no acuosas no tóxicas parenteralmente aceptables y los componentes y/o compuestos descritos anteriormente. Los vehículos preferidos son agua o solución salina.

55 Las preparaciones pueden formularse de acuerdo con procedimientos conocidos. En una realización preferida, las preparaciones se fabrican inmediatamente antes de su uso. Por tanto, puede mezclarse un producto de microburbujas seco con un vehículo adecuado y uno o más de los compuestos y componentes mencionados anteriormente. En otra realización preferida, las preparaciones se fabrican inmediatamente antes de su uso y las microburbujas se generan *in situ* durante la fabricación de la preparación, por ejemplo, añadiendo un vehículo adecuado a un vial que contiene el gas deseado y los componentes que comprenden la cubierta de las microburbujas y agitando esta mezcla. Las preparaciones de acuerdo con la invención preferiblemente se esterilizan antes de la administración y/o se fabrican a partir de materiales de partida estériles. La esterilización de las preparaciones puede conseguirse por filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, incorporando agentes esterilizantes, por irrigación.

65 La administración de acuerdo con la etapa a) del procedimiento de la invención puede realizarse de diversos modos que no son intravasculares. Se prefieren procedimientos de administración parenteral e incluyen las siguientes vías. Intramuscular, percutánea, directamente en un vaso linfático, intersticial, intraperitoneal, intratecal, subcutánea, intrasinovial, transepitelial (incluyendo transdérmica), dérmica, intradérmica, subdérmica, en un tumor o proceso patológico en sí mismo, y similares. Preferiblemente, la preparación se administra por vía intersticial, preferiblemente por inyección intersticial incluyendo inyección subcutánea e intradérmica. En el caso de pacientes con cáncer, la preparación preferiblemente se inyecta en la proximidad al cáncer (peritumoral). La preparación también puede inyectarse por

una combinación de dos o más modos parentales, por ejemplo intramuscular, subcutáneo, y en el proceso patológico, asegurando su aumento en el ganglio linfático centinela.

La preparación normalmente se administrará en un sitio y por un medio que se mueva y capte en la circulación linfática. Esto variará con el sistema del que se quieren formar imágenes. Pueden ser preferibles múltiples sitios de inyección para permitir un drenaje apropiado a los ganglios linfáticos regionales en investigación. En algunos casos, se desea la inyección alrededor de la circunferencia de un tumor o sitio de biopsia. En otros casos, se prefiere la inyección en una vaina o fosa. La inyección a las redes de los dedos de las manos o de los pies es un modo común usado para estudiar los vasos linfáticos periféricos. La preparación puede administrarse al sujeto de forma pre-operatoria y/o intra-operatoria para localizar el ganglio linfático centinela. El procedimiento de acuerdo con la invención permite la identificación inmediata y a tiempo real del ganglio linfático centinela después de la administración de la preparación en una región de interés ya que la administración no requiere un tiempo significativo para alcanzar el ganglio linfático centinela. Además, puede emplearse metodología adicional para modificar o alterar el transporte de la preparación al ganglio linfático centinela, incluyendo el masajeado del sitio de inyección o estimulación del flujo. Preferiblemente, se masajeará el sitio de inyección de la preparación.

El procedimiento de la invención tiene aplicabilidad para localizar el ganglio centinela asociado con tumor de mama. Pueden obtenerse imágenes de ganglios axilares, infraclaviculares y supraclaviculares inyectando la preparación en y alrededor del tumor y por debajo de la piel adyacente al tumor. Puede hacerse una inyección unilateral en el sitio subcostal ipsilateral al tumor, seguido por la formación de imágenes del ganglio linfático bilateral. Inyectando la preparación en la cercanía del tumor, el médico ahora sabrá que el conducto linfático implicado y que conduce al ganglio centinela se dirigirá hacia la cadena axilar, mamaria interna, o supraclavicular donde se realiza la detección de ultrasonidos en momentos apropiados después de cada inyección.

Otro enfoque es inyectar la preparación alrededor del tejido de la aureola de las mamas de forma bilateral, y después detectar las cadenas axilares, mamarias internas, o supraclaviculares. Además de la inyección periareolar puede usarse la administración interdigital de la preparación para la visualización de los vasos linfáticos axilares (véase, DeLand y col., (1980), Cancer Res. 40:2997-3001). La administración interdigital y periareolar combinada de la preparación puede proporcionar una exactitud mejorada para demostrar la captación aumentada en los ganglios axilares afectados. La inyección intratumoral del agente de contraste puede realizarse también en pacientes con cáncer de mama o melanoma.

Las preparaciones se administrarán en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad que permitan una detección suficiente. Se prevé que se administran de 0,1 a 30 ml de las preparaciones en forma líquida, preferiblemente de 0,1 a 3 ml, en particular preferiblemente de 0,5 a 1,5 ml. El volumen particularmente preferido para administración corresponde a un volumen de gas de microburbuja administrado de 5 a 15  $\mu$ l. En una realización preferida, se realizan múltiples inyecciones (típicamente 4), cada una con una cantidad de la preparación, por ejemplo se administran de 0,1 a 3 ml a un sujeto por sitio de inyección. Las variaciones pueden deberse a la cantidad de inyecciones y el sitio de inyección. También se contemplan otras cantidades de las preparaciones, tales como de 0,005 ml/kg a aproximadamente 1,0 ml/kg, de acuerdo con el procedimiento de la invención. Los volúmenes de las preparaciones en forma líquida normalmente variarán dependiendo de, por ejemplo, el sitio de administración, la concentración de la preparación, la cantidad de inyecciones, la composición de la preparación y/o el tipo de microburbujas presentes en la misma y las propiedades peculiares para cada sujeto individual.

En la etapa b) de acuerdo con el procedimiento de la invención, se permite que las burbujas se acumulen en el ganglio linfático centinela.

Después de la administración, las microburbujas no requieren un tiempo significativo para alcanzar el ganglio linfático centinela y acumularse en el mismo. Por tanto, es posible la identificación inmediata y a tiempo real del ganglio linfático centinela después de la administración de la preparación de acuerdo con la invención. Generalmente, las microburbujas de acuerdo con la invención son capaces de acumularse en el ganglio linfático centinela en menos de 60 minutos. En una realización preferida, las microburbujas de acuerdo con la invención se acumulan en el ganglio linfático centinela en menos de 15 minutos y en particular preferiblemente en menos de 5 minutos.

Después de la administración, las microburbujas de acuerdo con la invención tienen una semivida de al menos 5 minutos, preferiblemente de al menos 15 minutos y en particular preferiblemente de al menos 60 minutos.

Como el tiempo de acumulación de las microburbujas en los ganglios linfáticos centinela es relativamente corto, las microburbujas de acuerdo con la invención permiten una formación de imágenes poco después de la administración, mejorando la logística y prolongando el tiempo de detección.

En la etapa c) de acuerdo con el procedimiento de la invención, las microburbujas se detectan en el ganglio linfático centinela usando formación de imágenes por ultrasonidos e identificando de este modo el ganglio linfático centinela.

Con respecto a los ultrasonidos, las técnicas de formación de imágenes por ultrasonidos contempladas para su uso en la presente invención son bien conocidas en la técnica, y se describen, por ejemplo, en McGahan y Goldberg, Diagnostic Ultrasound: A Logical Approach (Lippincott-Raven Publishers 1998), y en Frederick y Kremkau, Diagnostic Ultrasound: Principles and Instruments (W B Saunders Co. 1998). Los modos específicos de formación de imágenes

por ultrasonidos útiles con la invención descrita incluyen formación de imágenes por armónicos o no lineal, formación de imágenes en escala de grises (Modo B), Doppler (incluyendo onda pulsada, de potencia, flujo, color, amplitud, espectral y armónico), tridimensional, abierta, y similares. Con respecto a la formación de imágenes no lineal, se apreciará que la presente invención es compatible con la formación de imágenes por armónicos de banda ancha y la formación de imágenes por armónicos por inversión de pulso.

Si se desea usar formación de imágenes por armónicos y la máquina de formación de imágenes por ultrasonidos se ajusta para formar imágenes a una frecuencia particular, el tipo de onda saliente suministrada al transductor sónico puede ser una fracción numérica de la frecuencia de formación de imágenes (por ejemplo,  $1/2$ ,  $2/3$ ,  $1/3$ , y similares) o un número completo o fraccionario múltiplo de la frecuencia de formación de imágenes (por ejemplo, 2 {fracción  $(3/2)$ }, 3, 4, y similares). Con cualquier combinación particular de la preparación de microburbujas y frecuencia de excitación, serán dominantes ciertos armónicos. El segundo armónico es un ejemplo común. Se prefieren los armónicos más fuertes por razones obvias, aunque pueden seleccionarse otros armónicos o frecuencias por razones tales como preparación de múltiples imágenes o eliminación del fondo. Además, pueden detectarse simultáneamente varias frecuencias, incluyendo frecuencias armónicas y no armónicas o algunas combinaciones de las mismas, para proporcionar la imagen deseada. Es decir, en realizaciones preferidas, puede usarse cualquier frecuencia diferente a la frecuencia cuestión para proporcionar los datos deseados. Por supuesto, los especialistas en la técnica apreciarán que pueden determinarse armónicos dominantes por simple ensayo empírico de la preparación del agente de contraste.

Para detectar la energía de ultrasonidos re-radiada generada por las preparaciones de microburbujas, puede usarse un sistema de exploración por ultrasonidos convencional modificado o sistemas de formación de imágenes no lineal disponibles en el mercado. Estos sistemas son capaces de detectar o seleccionar una o más o todas las nuevas frecuencias, o armónicos, radiados por la preparación de microburbujas para la producción de la imagen de ultrasonidos, en otras palabras, detecta una frecuencia diferente de la frecuencia emitida. El equipo adecuado para la formación de imágenes por ultrasonidos armónicos se describe en el documento WO-A-91/15999. Sin embargo, muchos dispositivos de formación de imágenes por ultrasonidos convencionales utilizan transductores capaces de funcionar en una anchura de banda aplica, y el tipo de onda de salida enviada al transductor es controlado por un software. Por esta razón, la reprogramación para emitir un tipo de onda diferente del seleccionado pertenece al nivel del especialista en al técnica.

Aunque se prefiere particularmente la formación de imágenes por ultrasonidos no lineal tal como la formación de imágenes por ultrasonidos armónicos, formación de imágenes por ultrasonidos armónicos secundarios o preferiblemente inversión de pulso para su uso en los procedimientos descritos, también son compatibles otros tipos de formación de imágenes convencionales por ultrasonidos tales como modo B (formación de imágenes en escala de grises), modo F (formación de flujo de color o Doppler) y modo D (Doppler espectral) y están en el ámbito de la presente invención.

En la formación de imágenes de modo B, el sistema de ultrasonidos típicamente transmite una serie de ondas, a lo largo de las líneas de exploración, conducidas para explorar un campo de visión deseado. El sistema de ultrasonidos típicamente conduce "ondas de recepción" de un modo que corresponde con las ondas de transmisión. Los datos que regresan de cada onda de recepción se comunica a un subsistema de presentación de imágenes que reconstruye una imagen bidimensional en escala de grises a partir de los datos en modo B y los presenta en una consola. Dicha serie de pulsos que desciende una única línea puede ser idéntica o puede ser de frecuencia igual o desigual o tener un desplazamiento de fase de casi 180 grados (pulso invertido) para promover la distinción del agente de contraste de los tejidos adyacentes.

La formación de imágenes en modo F se consigue de una forma similar a la formación de imágenes en modo B, porque el sistema de ultrasonidos lanza y recibe una serie de ondas para explorar un campo de visión. Sin embargo, como la formación de imágenes en modo F requiere el cálculo de la velocidad de las dianas, cada línea se lanza y recibe varias veces. Como con la formación de imágenes en modo B, los datos que regresan de cada lanzamiento de cada línea se usan para reconstruir una imagen en una consola.

La formación de imágenes en modo F a menudo se usa simultáneamente con la formación de imágenes en modo B. Por ejemplo, la imagen en escala de grises reconstruida a partir de la exploración en modo B puede superponerse con una imagen en modo F reconstruida a partir de la exploración en modo F del mismo campo de visión o de uno menos incluido en el campo de visión. La información del modo F puede presentarse usando colores, indicando diferentes colores diferentes velocidades o turbulencia de flujo positivas o negativas en la parte de la imagen de modo B en la que se superpone el punto de imagen. Como la formación de imágenes en modo F está pretendida para proporcionar solamente una nueva percepción cualitativa en el movimiento de la diana en el cuerpo de un paciente, el procesamiento del sistema de ultrasonidos de las señales de modo F no necesitan tener una alta resolución espacial o de velocidad en la amplitud o en la resolución de los puntos de imagen. Sin embargo, como un valor importante de la formación de imágenes en modo F es detectar los flujos relativos a estructuras anatómicas en el cuerpo, es habitualmente importante que la imagen en modo F se registre apropiadamente con la imagen en modo B en pantalla. Como esta técnica depende de la correlación de la señal obtenida de un pulso frente al pulso posterior, y como las microburbujas puede destruirse por el primer pulso, se genera una señal F que no está relacionada con el movimiento. Esta pérdida de correlación puede mostrarse en una diversidad de formatos de presentación pero típicamente se presenta en color.

En la adquisición de modo D (Doppler espectral), el sistema de ultrasonidos lanza una onda y procesa la señal de regreso para una diana única. La información del Doppler espectral puede obtenerse transmitiendo y recibiendo energía ultrasónica de onda continua (CW) u onda pulsada (PW). En la adquisición de Doppler CW, por ejemplo, Doppler de Potencia (angiografía Doppler), el receptor de ultrasonidos recibe continuamente ecos de todos los objetos en el área de sensibilidad del receptor en el cuerpo, y no puede aislar la información recibida de ningún intervalo de rango específico. El Doppler CW es muy útil cuando el área de sensibilidad del instrumento puede ajustarse, por reemplazo físico de la sonda o formación de ondas, o ambos, para incluir solamente la diana deseada. En la adquisición de Doppler PW, el instrumento de ultrasonidos recibe ecos de pulsos individuales, cuyo ritmo implica un intervalo de rango en el cuerpo del objeto que produce el eco. Un médico típicamente selecciona un intervalo de rango en el se espera que se localice la diana.

En la adquisición de modo D, es deseable tener la capacidad de producir mediciones cuantitativas detalladas sobre un intervalo muy grande de niveles de señal (rango dinámico). La información de modo D se procesa por el sistema de ultrasonidos para presentar el espectro de velocidad de la diana, representarlo frente al tiempo, o proporcionar una salida de audio que lleva información similar. La adquisición de Doppler espectral se describe en L. Hatle, y B. Angelsen, "Doppler Ultrasound in Cardiology" 1a ed. 1982) y (2a ed. 1984).

Además de la adquisición de modo B, F y D, también existe un cuarto modo, conocido como modo M, pero éste es simplemente una modalidad de presentación diferente de datos adquiridos de un modo similar a la adquisición en modo B o F. Los requisitos para la adquisición en modo M no son significativamente diferentes de los de la adquisición en modo B o F. Como alternativa, o además, también se contemplan los ultrasonidos tridimensionales, donde las exploraciones 3-D requieren sondas y un software especiales para acumular y representar las imágenes. Se apreciará que la energía de ultrasonidos emitida - si es suficientemente alta - puede alterar las microburbujas presentes en los vasos linfáticos. Los procedimientos de formación de imágenes basados en Doppler como se ha descrito anteriormente pueden detectar esto como una señal "pseudo Doppler" que permite la detección sensible y específica de las microburbujas que están inmovilizadas o se mueven muy lentamente (véase por ejemplo, el documento US 5.425.366).

En la técnica se conocen técnicas adicionales contempladas para su uso en la presente invención, y se describen, por ejemplo, en Gamsu y col., Diagnostic Imaging Review (W. B. Saunders Co 1998).

Puede aplicarse energía ultrasónica a al menos una parte del sujeto para formar imágenes del tejido diana. Después puede obtenerse una imagen visible de una región interna del sujeto, de modo que puede determinarse la identificación del ganglio linfático centinela.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la identificación de un ganglio linfático centinela en un sujeto al que se ha preadministrado microburbujas que comprenden una cubierta y un gas o precursor gaseoso, teniendo dichas microburbujas un tamaño medio de partícula de aproximadamente 0,25 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y una estabilidad a la presión de al menos el 50% a una presión de 120 mm Hg que comprende detectar dichas microburbujas acumuladas en dicho ganglio linfático centinela de dicho sujeto usando ultrasonidos.

El procedimiento de acuerdo con la invención no es útil solamente para identificar el ganglio linfático centinela, sino también para determinar si dicho ganglio linfático centinela muestra defectos o irregularidades en la estructura linfática. Por tanto, la presente invención también proporciona la discriminación entre ganglios linfáticos centinelas benignos y malignos en un sujeto que comprende

a) administrar a dicho sujeto una preparación que comprende microburbujas que comprenden una cubierta que comprende el 50-100% de fosfolípidos cargados negativamente y un gas o precursor gaseoso, teniendo dichas microburbujas un tamaño medio de partícula de aproximadamente 0,25 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y una estabilidad a la presión de al menos el 50% a una presión de 120 mm Hg,

b) permitir que dichas microburbujas se acumulen en dicho ganglio linfático centinela,

c) detectar dichas microburbujas en dicho ganglio linfático centinela usando ultrasonidos y

d) caracterizar dicho ganglio linfático centinela como benigno o maligno de acuerdo con el patrón de potenciación de contraste en el ganglio linfático.

Mattrey y col. observaron que durante la formación de imágenes por ultrasonidos del ganglio linfático centinela, el cáncer en el ganglio linfático no se llenaba con material de agente de contraste dejando de este modo un defecto de llenado. Sin embargo, se ha indicado que se necesita trabajo adicional para la confirmación (R. Mattrey y col., Academic Radiology 9, 2002, S231-S235). Ahora se ha descubierto que es posible clasificar los ganglios linfáticos centinela después de que se hayan identificado de acuerdo con el procedimiento de la invención a causa de sus diferentes patrones de potenciación de contraste: los ganglios linfáticos centinela benignos aparecen uniformemente ecogénicos mientras que los ganglios linfáticos centinela malignos muestran un patrón de potenciación heterogénico con áreas de ecogenicidad aumentada y áreas que no potencian. Este descubrimiento representa un avance clínico principal ya que el procedimiento de acuerdo con la invención no sólo permite la detección no invasiva y segura de ganglios linfáticos centinela, sino también de su infiltración metastásica.

## ES 2 278 189 T3

El procedimiento mencionado anteriormente proporciona buenos resultados por evaluación visual de imágenes de ultrasonidos adquiridas. La discriminación entre ganglios linfáticos benignos y malignos puede mejorarse adicionalmente por la aplicación de procedimientos de procesamiento de imágenes para potenciar la diferencia en el patrón de potenciación de contraste entre ganglios normales e infiltrados.

La invención se describirá ahora con mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### *Mediciones de estabilidad a la presión*

Se ensayaron diversas microburbujas que contienen agentes de contraste de ultrasonidos para la estabilidad a la presión:

Albunex™, microburbujas que contienen aire en una cubierta de albúmina desnaturalizada de suero humano, que pueden prepararse como se describe en el documento EP-A-359 246.

Sonovue™, microburbujas que contienen SF<sub>6</sub> encapsulado en una membrana fosfolípida.

Sonazoid™, microburbujas que contienen perfluorobutano encapsulado en una membrana de tensioactivo.

##### *a) Determinación de la distribución de tamaño y concentración de volumen*

La concentración de microburbujas y la distribución de tamaño de todas las muestras se determinaron por recuento Coulter con un Coulter Multisizer Mark II (Coulter Electronics Ltd., Luto, Inglaterra) equipado con una apertura de 50  $\mu\text{m}$  con un intervalo de medida nominal de 1 a 30  $\mu\text{m}$ . El análisis se realizó con 64 canales de tamaño espaciado logarítmicamente. Se diluyó una muestra de 20  $\mu\text{l}$  en 200 ml de Isoton II (Coulter Electronics) a temperatura ambiente y se agitó durante 4 minutos antes del análisis. Como respuesta analítica, se usaron la concentración del volumen de burbujas con un porcentaje del volumen de la suspensión y el diámetro medio del volumen de las microburbujas.

	Concentración del volumen de microburbujas como un porcentaje del volumen de la suspensión [%]	Diámetro medio del volumen de las microburbujas [mm]
Albunex™	0,7	10
Sonovue™	0,6	7
Sonazoid™	1,0	3

##### *b) Mediciones de la atenuación acústica*

El espectro de atenuación acústica de todas las muestras se midió como se describe por L. Hoff, Acoustic Characterization of Contrast Agents for Medical Ultrasound Imaging, Kluwer Academic Publishers, 2001, capítulo 4. Se midió la atenuación acústica de una onda de sonido que va a través de una suspensión diluida de las muestras usando un transductor de banda ancha con una frecuencia central de 3,5 MHz. Se repartió homogéneamente un volumen de muestra adecuado en 55 ml de Isoton II a temperatura ambiente antes del análisis. Se midió la transmisión por una técnica de ecos pulsados; se emitieron cortos pulsos de sonido desde el transductor y atravesaron el compartimiento de la célula de medición antes de reflejarse desde la pared posterior del compartimiento y las recibió de nuevo el transductor emisor. Los pulsos se digitalizan por un osciloscopio y se calculan los espectros de frecuencia por la transformada de Fourier. Para compensar el paso de transmisión y las características del transductor, los espectros se normalizan a los espectros de Isoton II puro. Los resultados se normalizaron a una dilución 1:1000. Se midió la atenuación acústica [dB/cm] a presión atmosférica a 3,5 MHz y la lectura de medición obtenida se ajustó al 100% de eficacia de atenuación acústica. Después de la aplicación de una presión de 120 mm Hg durante 30 segundos, se midió de nuevo la atenuación y se calculó la eficacia de atenuación acústica después de presión. La estabilidad a la presión se presentó como eficacia de atenuación después de presión en porcentaje de eficacia de atenuación antes de presión.

## ES 2 278 189 T3

	Estabilidad a la presión a 120 mm Hg [%]
Albunex™	0
Sonovue™	79 ± 2
Sonazoid™	98 ± 1

### 10 Ejemplo 2

#### *Detección y caracterización in vivo de ganglios linfáticos centinela*

15 Se usaron cerdos Sinclair anestesiados con tumores de melanoma para investigar la detección y caracterización de ganglios linfáticos centinela usando Sonazoid™.

#### a) *Detección in vivo de ganglios linfáticos centinela*

20 Se administró 1 ml de Sonazoid™ por vía intradérmica alrededor del tumor primario. Después de 5 minutos de masaje suave del sitio de inyección, se realizó una exploración por ultrasonidos con un explorador Siemens Elegera. El ganglio linfático centinela mostró una fuerte potenciación del contraste sobre la formación de imágenes en escala de grises por inversión de pulso y se evaluó posteriormente con formación de imágenes flujo de color de elevada potencia que dio un patrón de potenciación en mosaico característico de la ruptura de microburbujas. La identificación del ganglio centinela se aceleró adicionalmente por potenciación de contraste del canal linfático desde el sitio de inyección hasta el ganglio centinela. La localización del ganglio linfático se marcó sobre la piel. La localización del ganglio centinela se confirmó con inyecciones peritumorales de marcador radiocoloidal y colorante azul de acuerdo con la práctica clínica actual. La potenciación del contraste del ganglio linfático centinela estuvo presente durante hasta 3 horas.

30 El procedimiento descrito en el Ejemplo 2a se aplicó en 6 cerdos Sinclair con melanoma. Se evaluaron 17 tumores primarios con 31 melanomas usando ultrasonidos, linfocentellografía y colorante azul (la norma de oro). La exactitud de identificación correcta de ganglios centinela fue del 90% por ultrasonidos y del 81% por linfocentellografía.

#### b) *Detección y caracterización in vivo de ganglios linfáticos centinela*

35 Se administró 1 ml de Sonazoid™ por vía intradérmica alrededor de cada tumor primario en un cerdo Sinclair con 3 tumores de melanoma. Después de 5 minutos de masaje suave del sitio de inyección, se realizó exploración por ultrasonidos con un explorador Siemens Elegera y se identificaron los ganglios centinela como se ha descrito en el Ejemplo 2a. Uno de los ganglios linfáticos mostró un patrón de potenciación de contraste homogéneo, mientras que los otros dos mostraron un patrón de potenciación heterogéneo, a manchas. El primer ganglio se caracterizó como normal, mientras que los otros dos se caracterizaron como malignos en base a la formación de imágenes por ultrasonidos. El examen histopatológico microscópico de los ganglios linfáticos confirmó la ausencia de tumor en el primer ganglio y la presencia de tumor en los otros dos ganglios. La evaluación patológica produjo un pseudomapa de color de las muestras de patología que se correlacionaban bien con los patrones de potenciación de contraste observados por ultrasonidos con potenciación de contraste del tejido linfático normal y ausencia de potenciación en tejido tumoral.

50 El procedimiento descrito en el ejemplo 2b se aplicó en 6 cerdos Sinclair con melanoma. En total se investigaron 31 ganglios linfáticos. La exactitud de la detección correcta de la presencia o ausencia de tumores de melanoma metastásicos en los ganglios linfáticos fue del 86%.

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los ultrasonidos potenciados por el contraste y la patología.

### Ejemplo 3

#### 55 *Comparación de Albunex™ y Sonazoid™*

60 Se inyectó de forma interdigital 1 ml de Albunex™ como se ha descrito en el Ejemplo 1 en la pata trasera de un perro anestesiado. Se masajó suavemente el sitio de inyección durante 5 minutos. Se formaron imágenes del ganglio linfático de drenaje (huevo poplíteo) con un Explorador ATL HDI 5000 equipado con un transductor L12-5 que funciona en modo de inversión de pulso. No se observó potenciación de contraste al formar las imágenes 5 y 15 minutos después de la inyección, respectivamente.

65 Se inyectó de forma interdigital 1 ml de Sonazoid™ como se ha descrito en el Ejemplo 1, 20 minutos después de la inyección de Albunex™, en la misma pata trasera siguiendo procedimientos de formación de imágenes idénticos como se ha descrito en el Ejemplo 3a. Se observó una fuerte potenciación de contraste en la formación de imágenes 5 minutos después de la inyección y la potenciación se mantuvo en la formación de imágenes 15 minutos después de la inyección. El pico de potenciación de contraste fue más de 7 dB.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de microburbujas para la fabricación de una preparación para ultrasonidos para la identificación de un ganglio linfático centinela en un sujeto, en el que las microburbujas comprenden una cubierta que comprende del 50 al 100% de fosfolípidos cargados negativamente y un gas o precursor gaseoso, teniendo dichas microburbujas un tamaño medio de partícula de 0,25 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y una estabilidad a la presión de al menos el 50% a una presión de 120 mm Hg.

10 2. Uso de microburbujas para la fabricación de la preparación para ultrasonidos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la preparación se administra de forma intersticial, preferiblemente percutánea, a un sujeto.

15 3. Uso de microburbujas para la fabricación de la preparación para ultrasonidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el que las microburbujas son estables a variaciones de presión con formación de imágenes por ultrasonidos de un índice mecánico de al menos 0,2.

4. Uso de microburbujas para la fabricación de la preparación para ultrasonidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la preparación comprende adicionalmente un compuesto estimulador de macrófagos.

20 5. Uso de microburbujas para la fabricación de la preparación para ultrasonidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la identificación comprende

a) administrar a dicho sujeto la preparación,

25 b) permitir que dichas microburbujas se acumulen en dicho ganglio linfático centinela y

c) detectar dichas microburbujas en dicho ganglio linfático centinela usando ultrasonidos.

30 6. Uso de microburbujas para la fabricación de la preparación para ultrasonidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la identificación de dicho ganglio linfático centinela comprende el uso de formación de imágenes por ultrasonidos armónicos, formación de imágenes por ultrasonidos armónicos secundarios, formación de imágenes por inversión de pulso, en modo B, en modo F, en modo D o ultrasonidos tridimensionales.

35

40

45

50

55

60

65