



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 624**

51 Int. Cl.:
A61K 49/14 (2006.01)
A61K 49/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06753455 .2**
96 Fecha de presentación : **28.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1879625**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

54 Título: **Agentes de contraste para IRM dotados de capacidad de respuesta independiente de la concentración.**

30 Prioridad: **29.04.2005 EP 05103567**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73 Titular/es: **BRACCO IMAGING S.p.A**
Via Egidio Folli 50
20134 Milano, IT

72 Inventor/es: **Aime, Silvio y**
Terreno, Enzo

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 357 624 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

Agentes de contraste para IRM dotados de capacidad de respuesta independiente de la concentración

La presente invención se refiere al campo de la obtención de imágenes de diagnóstico mediante el uso de técnicas de obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM). Más en particular, se refiere a un nuevo uso de una clase de agentes de contraste paramagnéticos en un método para la determinación *in vivo* de parámetros físicos o químicos de interés diagnóstico, independientemente de la concentración local del agente de contraste administrado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad está bien establecido que el potencial de los procedimientos de obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) puede aumentarse adicionalmente cuando esta modalidad de diagnóstico se aplica junto con la administración de agentes de contraste (AC), es decir, productos químicos que pueden promover cambios marcados en las tasas de relajación de los protones tisulares. Los AC para IRM se representan principalmente por complejos paramagnéticos, que contienen sobre todo iones de Gd(III), Fe(III) o Mn(II), que afectan a las tasas de relajación del agua en masa a través del intercambio de moléculas de agua en sus esferas de coordinación (Caravan P, et al. Chem Rev 1999, 99:2293-2352; the Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. Chichester, RU: John Wiley & Sons; 2001. págs. 45-120).

La eficacia de un complejo paramagnético se evalúa mediante su aumento de la relajación protónica o relaxividad (r_i , $i = 1, 2$), que representa el aumento de la tasa de relajación protónica de una disolución acuosa que contiene una concentración 1 mM del agente paramagnético en comparación con la tasa de relajación protónica del agua neta. Para un complejo paramagnético, el aumento de la relajación protónica está principalmente gobernado por la elección del metal paramagnético, el tiempo de correlación rotacional del complejo y la accesibilidad del metal a las moléculas de agua circundantes, es decir el intercambio rápido de agua con la masa.

Están implicadas dos tasas de relajación características: R_1 que se define como la inversa del tiempo de relajación longitudinal o tiempo de relajación espín-red T_1 , es decir $1/T_1$, y R_2 que se define como la inversa del tiempo de relajación transversal o tiempo de relajación espín-espín T_2 , es decir $1/T_2$.

Cuanto mayor sea la relaxividad longitudinal (r_1), más grande es el aumento de la señal detectado en las imágenes por RM ponderadas en T_1 correspondientes y mejor es la diferenciación de contraste en las imágenes resultantes.

Existen algunos agentes de contraste cuya relaxividad está relacionada con, y puede depender de, las características físicas o químicas del microentorno en el que se distribuyen. Estos agentes se conocen como agentes de respuesta porque el contraste, en la imagen que promueven, responde a un parámetro físico o químico de interés diagnóstico. Se han notificado varios sistemas cuya relaxividad se hace dependiente del pH, la temperatura, PO_2 , actividad enzimática, concentraciones de iones y metabolitos (Jacques V, Top Curr Chem 2002, 221, 123-164).

Sin embargo, una propiedad de sensibilidad peculiar de este tipo no podría haberse explotado en la práctica porque las variaciones de T_1 detectadas no pueden atribuirse claramente a un cambio en la relaxividad y, por consiguiente, a una variación en el parámetro físico o químico que está examinándose, si no se conoce la concentración real del complejo paramagnético. Para que sea eficaz, un agente de respuesta para IRM debe presentar su capacidad de respuesta de un modo independiente de la concentración. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es un método de IRM y agentes que permitan superar esta desventaja.

SUMARIO DE LA INVENCION

Según el objetivo anterior, la presente invención se refiere a la identificación de una clase de agentes de respuesta cuyo uso permite la medición de un parámetro físico o químico de interés diagnóstico independientemente de la concentración real del propio agente. En un aspecto diferente, la invención se refiere a un método de uso de dichos agentes para la determinación de un parámetro físico o químico de interés diagnóstico, independientemente de la concentración absoluta del agente administrado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 se refiere a valores de R_{2p}/R_{1p} calculados como una función de la fuerza del campo magnético para un complejo de Gd(III) macromolecular ($q = 1$, $r = 3 \text{ \AA}$, $\tau_M = 200 \text{ ns}$) dotado de valores de τ_R en el intervalo de 0,5-10 ns. Para la relajación electrónica, se han usado un valor de Δ^2 de $2 \cdot 10^{19} \text{ s}^{-2}$ y un valor de τ_V de 10 μs (correspondiente a valores de τ_{1S} en el intervalo de 0,65-500 ns).

La figura 2a) se refiere a valores de R_{2p}/R_{1p} calculados como función de τ_R para sistemas basados en Gd(III) dotados de valores de τ_M en el intervalo de 0,05-1 μ s a 7 T.

La figura 2b) se refiere a valores de R_{2p}/R_{1p} calculados como función de τ_M para sistemas basados en Gd(III) dotados de valores de τ_R en el intervalo de 0,5-10 ns a 7 T.

5 La figura 3 muestra la estructura del aducto (Gd-1)₄/avidina.

La figura 4 muestra la dependencia de la temperatura de la razón R_{2p}/R_{1p} para el aducto (Gd-1)₄/avidina a 7 T. Se incluye la fórmula del complejo Gd-1 en la sección experimental. Las barras notificadas hacen referencia a la desviación estándar de tres mediciones de disoluciones que contienen 0,125, 0,25, y 0,5 mM del complejo paramagnético.

10 La figura 5 notifica la dependencia del pH de la razón R_{2p}/R_{1p} para el aducto Gd-DOTP/poliarginina (razón molar = 10) a 14,1 T y 312 K. La concentración del complejo de Gd(III) fue de 0,5 mM (cuadrados negros) y 0,25 mM (cuadrados blancos).

La figura 6 muestra la estructura del aducto macromolecular de Gd-II.

15 La figura 7 notifica la dependencia del campo magnético de R_{1p} (símbolos negros) y R_{2p} (símbolos blancos) medidos a 25°C y 600 MHz para una disolución que contiene el aducto de Gd-II ([Gd] = 1 mM). pH 7 (cuadrados), pH 10 (círculos), y pH 12 (triángulos).

La figura 8 notifica la dependencia de la razón R_{2p}/R_{1p} sobre la concentración de Gd(III) para el aducto macromolecular de Gd-II a cuatro valores de pH: pH 7 (cuadrados), pH 8,5 (círculos), pH 10 (triángulos), y pH 12 (rombos) (600 MHz, 25°C).

20 La figura 9 muestra la dependencia del pH correspondiente de la razón R_{2p}/R_{1p} calculada a partir del punto de datos notificado en la figura 8.

25 La figura 10 notifica la dependencia de la temperatura de R_{1p} (círculos) y R_{2p} (cuadrados) medidos a 300 MHz para una disolución que contiene liposomas paramagnéticos (POPC/Chol/DSPE-PEG, razón molar 55:40:5) que atrapa GdHPDO3A 200 mM. La concentración total del complejo de Gd(III) en la suspensión fue de 6,6 mM.

La figura 11 muestra la dependencia de la razón R_{2p}/R_{1p} sobre la concentración de liposomas (parte inferior del eje X) y Gd(III) (parte superior del eje X) para los liposomas paramagnéticos descritos en el ejemplo 4. Temperaturas: 298 K (cuadrados), 302 K (círculos), 307 K (triángulos superiores), y 312 K (rombos) (300 MHz).

30 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

35 Una clase de agentes de contraste que resuelve el problema al que se enfrenta la presente invención está representado por sistemas paramagnéticos de respuesta que responden a un parámetro físico o químico de interés diagnóstico en cuanto a que afectan a T_1 y T_2 de los protones de agua del disolvente, y en los que tal capacidad de respuesta de T_1 y T_2 a dicho parámetro sigue diferentes funciones de comportamiento. Para estos sistemas de respuesta, puede hacerse que la razón R_{2p}/R_{1p} sea independiente de la concentración real del propio agente mediante el mantenimiento de la dependencia funcional del mismo con respecto al parámetro de interés. Por consiguiente, mediante el uso de estos sistemas, puede obtenerse una determinación del parámetro de interés como independiente de la concentración del agente real mediante la medición de tal razón R_{2p}/R_{1p} .

40 En la presente invención, a menos que se indique lo contrario, con parámetro físico o químico de interés diagnóstico quiere decirse un parámetro seleccionado de: temperatura, pH, presión parcial de oxígeno (PO₂) o dióxido de carbono (PCO₂), concentración de ión o metabolito específico, o actividad enzimática específica.

45 Conociendo el valor de dicho(s) parámetro(s) físico(s) o químico(s), un experto en la técnica puede proporcionar fácilmente evaluaciones de diagnóstico de cualquier proceso fisiológico o metabólico de interés diagnóstico que se basa en dicho(s) parámetro(s).

50 Para protones acoplados de manera dipolar a un centro paramagnético, a fuerzas del campo magnético mayores de 0,2 T, los términos R_{2p} y R_{1p} (en los que R_{2p} es la contribución paramagnética con respecto a la tasa de relajación transversal medida y R_{1p} es la contribución paramagnética con respecto a la tasa de relajación longitudinal medida) en presencia de un complejo de Gd(III) macromolecular se describen en las siguientes ecuaciones:

$$R_{1p} = \frac{P_M}{T_{1M} + \tau_M} \Rightarrow \frac{1}{T_{1M}} = \frac{6}{15} \frac{K^{DIP}}{r_H^6} \left(\frac{\tau_C}{1 + \omega_H^2 \tau_C^2} \right) \quad (1)$$

$$R_{2p} = \frac{P_M}{T_{2M} + \tau_M} \Rightarrow \frac{1}{T_{2M}} = \frac{1}{15} \frac{K^{DIP}}{r_H^6} \left(4\tau_C + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_H^2 \tau_C^2} \right) \quad (2)$$

en las que P_M es la fracción molar de los protones móviles que interactúan de manera dipolar con el ión de Gd(III) (por ejemplo para una molécula de agua en la esfera de coordinación interna de Gd(III),

- 5 P_M es igual a $\frac{q[GdL]}{55.6}$ con q = número de moléculas de agua coordinadas con Gd(III)), τ_M es su tiempo de residencia medio, r_H su distancia media desde el centro metálico, ω_H su frecuencia de Larmor (rad s^{-1}), y τ_C su tiempo de correlación molecular ($\tau_C^{-1} = \tau_M^{-1} + \tau_R^{-1} + \tau_{1S}^{-1}$ con τ_R = tiempo de correlación rotacional o tiempo de reorientación y τ_{1S} = tiempo de relajación electrónica longitudinal). K^{DIP} es un valor constante ($3,887 \cdot 10^{-42} \text{ m}^6 \text{ s}^{-2}$) relacionado con la interacción dipolar entre los espines de electrón y nuclear.

- 10 A partir de las ecuaciones 1-2 puede obtenerse que para dicho agente macromolecular, la razón R_{2p}/R_{1p} es independiente de la concentración del propio agente, viéndose sólo afectado por los valores de τ_M , τ_R , τ_{1S} y ω_H . Por consiguiente, para estos compuestos, los cambios en la razón R_{2p}/R_{1p} que actúan como indicador de un cambio en el parámetro de interés se relacionan sólo con un cambio en τ_R y/o τ_M y/o τ_{1S} en los que tales cambios tienen un efecto diferente sobre los valores de R_{2p} y R_{1p} .

- 15 Por tanto, un primer objetivo de la presente invención es el uso de un agente paramagnético de rotación lenta que responde a cambios de un parámetro físico o químico de interés diagnóstico dado mediante cambios en la razón R_{2p}/R_{1p} para la preparación de composiciones de diagnóstico para la determinación de dicho parámetro en un órgano, fluido o tejido del cuerpo de ser humano o animal, mediante el uso de la IRM, de una manera que es independiente de la concentración absoluta de dicho agente administrado.

Un objetivo adicional de la presente invención es un método según la reivindicación 1 para la determinación *in vivo*, mediante el uso de IRM, de un parámetro físico o químico de interés diagnóstico en un órgano, fluido o tejido del cuerpo de ser humano o animal, comprendiendo el método:

- 25 - administrar a dicho ser humano o animal una cantidad eficaz desde el punto de vista de diagnóstico de un agente paramagnético de rotación lenta que responde a cambios del microentorno de dicho parámetro mediante cambios en la razón R_{2p}/R_{1p} , y
- registrar una obtención de imágenes de IRM que responde a dicho parámetro, que es independiente de la concentración real del agente administrado, mediante la medición de dicha razón.

- 30 La expresión "cantidad eficaz desde el punto de vista de diagnóstico" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cantidad del agente paramagnético de rotación lenta de la invención, o composición farmacéutica del mismo, que es suficiente para llevar a cabo su(s) fin(es) de diagnóstico previsto(s), es decir proporcionar imágenes altamente contrastadas y eficaces desde el punto de vista de diagnóstico que permitan la determinación del parámetro de interés.

- 35 Dichas dosificaciones se seleccionan obviamente por el profesional sanitario dependiendo del agente de corte administrado lentamente.

Según la presente invención con "agente o sistema paramagnético de rotación lenta" tal como se usa en el presente documento indistintamente, quiere decirse un agente o sistema paramagnético que tiene un valor de $\tau_R \geq 1 \text{ ns}$.

- 40 En un aspecto preferido de la invención dicho agente paramagnético de rotación lenta es un complejo metálico paramagnético macromolecular.

En otro aspecto, dicho sistema paramagnético de rotación lenta se representa como sistema paramagnético en el que el aumento de la relajación se genera por los efectos de susceptibilidad magnética.

Tales efectos, que se limitan estrictamente a la evolución transversal de la magnetización nuclear (es decir sólo afectan los valores de T_2), se inducen mediante gradientes de campo magnético microscópico creados por las diferencias en la susceptibilidad magnética entre compartimentos (JL Boxerman, RM Weisskoff, BR Rosen "Susceptibility effects in Whole Body Experiments" en "Methods in Biomedical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy" Ed. IR Young, John Wiley & Sons, Chichester, Vol. 1, pág. 654, 2000).

Esta contribución específica de T_2 es dependiente directamente del cuadrado de la intensidad de los gradientes de campo magnético que son proporcionales a las diferencias de la susceptibilidad magnética y la fuerza del campo magnético, y se ven afectados por el tamaño relativo de los compartimentos. La diferencia de la susceptibilidad magnética entre los compartimentos puede aumentarse significativamente si se confina una concentración bastante alta de una especie paramagnética en un compartimento. Ejemplos típicos de sistemas paramagnéticos de rotación lenta que generan un efecto de T_2 de susceptibilidad significativa se representan mediante compartimentos de tamaño nanométrico que contiene una cantidad bastante alta de un complejo metálico paramagnético.

Según la presente invención, a menos que se indique lo contrario, con la expresión "sistemas de tamaño nanométrico" quiere decirse un sistema que tiene un diámetro medio ≥ 5 nm. Preferiblemente, dichos sistemas atrapan el complejo metálico paramagnético a una concentración mínima de 5 mM.

Una lista no exhaustiva de sistemas de tamaño nanométrico que pueden atrapar complejos metálicos paramagnéticos incluye, por ejemplo, nanopartículas, microemulsiones, liposomas, cavidades proteicas y similares.

En otras palabras, como para todos los complejos metálicos paramagnéticos macromoleculares según la invención, para dichos sistemas de tamaño nanométrico la razón R_{2p}/R_{1p} es independiente de la concentración, viéndose sólo afectada por la fuerza del campo magnético, la cantidad del complejo atrapado y el tamaño del compartimento. En una realización de la invención, por consiguiente, el agente paramagnético de rotación lenta que presenta una razón R_{2p}/R_{1p} que responde a cambios del microentorno de un parámetro físico o químico de interés diagnóstico se representa como sistema de tamaño nanométrico cuya tasa de relajación transversal se ve afectada por los efectos de susceptibilidad magnética para el que, además, el valor de R_{2p} , y por consiguiente la razón R_{2p}/R_{1p} , es dependiente de un parámetro físico o químico o un proceso fisiológico o metabólico de interés diagnóstico.

Además del efecto de T_2 selectivo que surge de los efectos de susceptibilidad magnética, puede hacerse que la razón R_{2p}/R_{1p} para un sistema de tamaño nanométrico sea dependiente del parámetro de interés actuando sobre R_{1p} . Por ejemplo, este objetivo puede lograrse si el parámetro fisicoquímico afecta la permeabilidad al agua del compartimento que atrapa el complejo paramagnético.

Por tanto, en una realización, la presente invención se refiere a un método según la reivindicación 1 para la determinación *in vivo*, mediante el uso de IRM, de un parámetro físico o químico de interés diagnóstico en un órgano, fluido o tejido del cuerpo de ser humano o animal, en el que se administra un sistema de tamaño nanométrico que atrapa un complejo metálico paramagnético que responde a cambios de un parámetro físico o químico dado o un proceso fisiológico o metabólico de interés diagnóstico mediante cambios en la razón R_{2p}/R_{1p} .

Tal como se dijo anteriormente, para la clase particular de agente paramagnético de rotación lenta de la invención, la razón R_{2p}/R_{1p} es independiente de la concentración real del propio agente, mientras que dicha razón sólo se ve afectada por valores de τ_M , τ_R , τ_{1S} , tamaño, permeabilidad al agua del compartimento y ω_H .

Por tanto, desde un punto de vista diferente, puede decirse que la razón R_{2p}/R_{1p} medida para dichos agentes actúa como indicador de un cambio en el parámetro de interés porque los cambios que promueve dicho parámetro en los valores de τ_R y/o τ_M y/o τ_{1S} , y/o tamaño, y/o permeabilidad al agua del compartimento, a un valor de ω_H dado, tienen un efecto diferente sobre los valores de R_{2p} y R_{1p} .

En particular, cuando el sistema paramagnético de rotación lenta usado en el método de la invención es un complejo metálico paramagnético macromolecular, la razón R_{2p}/R_{1p} medida actúa como indicador de un cambio en el parámetro de interés porque los cambios que promueve dicho parámetro en los valores de τ_R y/o τ_M y/o τ_{1S} , a un valor de ω_H dado, tienen un efecto diferente sobre los valores de R_{2p} y R_{1p} .

Cuando, en una realización diferente, el sistema paramagnético de rotación lenta administrado es un sistema de tamaño nanométrico que atrapa un complejo metálico paramagnético, la razón R_{2p}/R_{1p} medida actúa como indicador de un cambio en el parámetro de interés porque los cambios que promueve dicho parámetro en el tamaño, y/o permeabilidad al agua del compartimento tienen un efecto diferente sobre los valores de R_{2p} y R_{1p} .

El método radiométrico para los agentes de respuesta según la presente invención se basa, por consiguiente, en la explotación del efecto diferencial tienen que los tiempos de correlación τ_R , τ_M y τ_{1S} sobre los valores de R_{1p} y R_{2p} para los complejos metálicos paramagnéticos de rotación lenta.

5 En un aspecto diferente, dicho método radiométrico se basa además en la explotación del efecto específico sobre valores de R_{2p} provocados por la presencia de efectos de susceptibilidad magnética cuando los sistemas paramagnéticos de rotación lenta son sistemas de tamaño nanométrico que atrapan un complejo paramagnético.

10 Con el objetivo de definir cómo seleccionar de manera adecuada tales valores de τ_R , τ_M , τ_{1S} y ω_H y, por consiguiente, cómo definir el complejo metálico paramagnético macromolecular que puede usarse ventajosamente en el método de la invención, se ha realizado una primera simulación teórica basada en las ecuaciones 1-2 que muestra que, a las fuerzas de los campos magnéticos usados en la IRM (0,2-7 T), la razón R_{2p}/R_{1p} comienza a ser sensible a la movilidad rotacional del complejo de Gd(III) (τ_R) para valores de τ_R mayores de 0,5 ns, en el que se prefieren los valores τ_R mayores de 1 ns y se prefieren aún más valores mayores de 5 ns (figura 1).

15 Una vez que se establece la fuerza del campo magnético, los valores de τ_R y τ_M tienen un efecto opuesto sobre la razón R_{2p}/R_{1p} según puede obtenerse mirando a las simulaciones adicionales realizadas y notificadas en la figura 2 a) y b). En la simulación de la figura 2a) se han notificado los valores de R_{2p}/R_{1p} como función de τ_R para sistemas basados en Gd(III) dotados de valores de τ_M en el intervalo de 0,05-1 μ s a 7 T. En la simulación de la figura 2b) se han calculado valores de R_{2p}/R_{1p} como función de τ_M para sistemas basados en Gd(III) dotados de valores de τ_R en el intervalo de 0,5-10 ns a 7 T. A partir de las 1 y 2, se desprende que τ_R afecta a la razón R_{2p}/R_{1p} mediante su efecto sobre τ_C y por consiguiente sobre T_{iM} ($i=1,2$), mientras que τ_M influye sobre R_{2p}/R_{1p} mediante el efecto limitante sobre R_{ip} mediante el término ($T_{iM} + \tau_M$).

25 Basándose en estos resultados, una clase de agentes de respuesta para su uso en el método de la invención puede comprender compuestos de complejos paramagnéticos macromoleculares dotados tanto de protones acoplados de manera dipolar como de valores de $\tau_R \geq 1$ ns, siempre que su movilidad rotacional (τ_R) y/o el tiempo de residencia medio τ_M de los protones móviles acoplados de manera dipolar a su centro metálico y/o su tiempo de relajación electrónica longitudinal τ_{1S} sean dependientes del parámetro de interés. Para un compuesto dado, se conoce bien en la técnica que la dependencia de dichos valores de τ_R , τ_M , τ_{1S} del parámetro de interés puede verificarse fácilmente trazando la razón R_{2p}/R_{1p} con respecto a dicho parámetro: cuando se verifica una variación significativa de dicha razón con respecto al parámetro de interés, entonces τ_R y/o τ_M y/o τ_{1S} del compuesto sometido a prueba son dependientes de este parámetro.

35 Entre dichos agentes de respuesta, se prefieren particularmente compuestos de complejos metálicos paramagnéticos macromoleculares dotados de valores de τ_R de desde 1 hasta 10 ns y valores de τ_M de desde 0,01 hasta 1 μ s, según la reivindicación 1.

40 En la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, con la expresión complejo paramagnético macromolecular quiere decirse un complejo metálico paramagnético dotado de una tasa de rotación lenta, es decir un complejo dotado de un valor de τ_R mayor de 0,5 ns, en el que se prefieren valores de τ_R mayores de 1 ns y se prefieren aún más valores de desde 5 hasta 10 ns.

La tasa de rotación lenta de los agentes de respuesta según la invención puede obtenerse controlando el tamaño molecular del sistema paramagnético, por ejemplo mediante la formación de enlaces covalentes o no covalentes con macromoléculas o sustratos endógenos que confieren al agente el peso molecular deseado.

45 Para agentes de respuesta de tamaño nanométrico de la invención, por ejemplo, los sistemas son nanopartículas con un diámetro medio ≥ 5 nm, que atrapan un complejo metálico paramagnético a una concentración mínima de 5 mM.

50 El complejo paramagnético atrapado en dicho sistema de tamaño nanométrico puede ser cualquier complejo metálico paramagnético de la técnica, sin ninguna limitación en lo que se refiere a su peso molecular.

55 En lo que respecta a los agentes de tamaño nanométrico que responden a la temperatura, un sistema preferido (para experimentos de obtención de imágenes realizados a campos magnéticos ≥ 3 T) puede representarse como un liposoma paramagnético dotado de las siguientes características: i) diámetro medio ≥ 150 nm, ii) permeabilidad al agua de la membrana liposómica $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ cm s⁻¹, iii) concentración del complejo metálico paramagnético atrapado (con respecto al compartimento acuoso interno del liposoma) ≥ 50 mM. Preferiblemente, el complejo metálico paramagnético atrapado es un complejo de Gd(III).

En la presente descripción, con la expresión agente de contraste paramagnético o complejo paramagnético o complejo metálico paramagnético, tal como se usa en el presente documento indistintamente, quiere decirse cualquier complejo quelado con un ión metálico paramagnético bi y trivalente, que tiene preferiblemente un número atómico que oscila entre 20 y 31, 39, 42, 43, 44, 49, y entre 57 y 83 tal como, por ejemplo, $\text{Fe}^{(2+)}$, $\text{Fe}^{(3+)}$, $\text{Cu}^{(2+)}$, $\text{Cr}^{(3+)}$, $\text{Eu}^{(3+)}$, $\text{Dy}^{(3+)}$, $\text{La}^{(3+)}$, $\text{Yb}^{(3+)}$ o $\text{Mn}^{(2+)}$ y $\text{Gd}^{(3+)}$, siendo este último incluso más preferido.

Más preferiblemente, el agente de respuesta de rotación lenta para su uso en el método de la invención es un complejo de $\text{Gd}(\text{III})$ macromolecular dotado de un valor de τ_R entre 1 y 10 ns, un τ_M de desde 0,01 hasta 1 μs para el que, además, τ_R y/o τ_M son dependientes del parámetro de interés.

Por consiguiente, en un método preferido según la invención, se usa un complejo de $\text{Gd}(\text{III})$ que se mueve lentamente que tiene un valor de τ_R de desde 1 hasta 10 ns y un τ_M de desde 0,01 hasta 1 μs y en el que τ_R y/o τ_M y/o τ_{1S} son dependientes del parámetro de interés.

En un método de la invención igualmente preferido, se usa un agente de tamaño nanométrico que se mueve lentamente que tiene un diámetro medio ≥ 5 nm y que atrapa un complejo paramagnético con una concentración igual o mayor que 5 mM para el que el tamaño del sistema y/o los efectos de susceptibilidad magnética son dependientes de un parámetro de interés diagnóstico.

Como referencia general, no exhaustiva, para los complejos metálicos paramagnéticos o los sistemas de tamaño nanométrico que atrapan un complejo metálico paramagnético según la invención, véase, por ejemplo, la sección experimental a continuación.

Los complejos paramagnéticos de la invención también pueden estar convenientemente en forma de sales fisiológicamente aceptables. Cationes preferidos de bases inorgánicas que pueden usarse adecuadamente para salificar los complejos de la invención comprenden iones de metales alcalinos o alcalinotérreos tales como potasio, sodio, calcio o magnesio.

Cationes preferidos de bases orgánicas comprenden, entre otros, aquellos de aminas primarias, secundarias y terciarias tales como etanolamina, dietanolamina, morfolina, glucamina, N-metilglucamina, N,N-dimetilglucamina. Aniones preferidos de ácidos inorgánicos que pueden usarse adecuadamente para salificar los complejos de la invención comprenden los iones de haloácidos tales como cloruros, bromuros, yoduros u otros iones tales como sulfato.

Aniones preferidos de ácidos orgánicos comprenden aquellos de los ácidos usados de manera rutinaria en técnicas farmacéuticas para la salificación de sustancias básicas tales como, por ejemplo, acetato, succinato, citrato, fumarato, maleato u oxalato.

Cationes y aniones preferidos de aminoácidos comprenden, por ejemplo, aquellos de taurina, glicina, lisina, arginina, ornitina o de ácidos aspártico y glutámico.

Un objetivo adicional de la presente invención es una composición de diagnóstico para su uso en la obtención de imágenes por RM de un parámetro físico o químico de interés diagnóstico que comprende al menos un complejo o sistema paramagnético que se mueve lentamente dotado de un valor de τ_R de desde 1 hasta 10 ns y un valor de τ_M de desde 0,01 hasta 1 μs para el que, además, la movilidad rotacional τ_R y/o el tiempo de residencia medio τ_M de los protones móviles acoplados de manera dipolar al centro metálico y/o el tiempo de relajación electrónica longitudinal τ_{1S} son dependientes de dicho parámetro de interés.

En una realización de la invención, dicha composición de diagnóstico comprende un sistema de tamaño nanométrico que atrapa una disolución 5 mM de un complejo paramagnético, que responde a cambios del microentorno de un parámetro físico o químico dado o un proceso fisiológico o metabólico de interés diagnóstico mediante cambios en la razón $R_{2\rho}/R_{1\rho}$ y para el cual el tamaño del sistema y/o los efectos de susceptibilidad magnética son dependientes de un parámetro de interés diagnóstico.

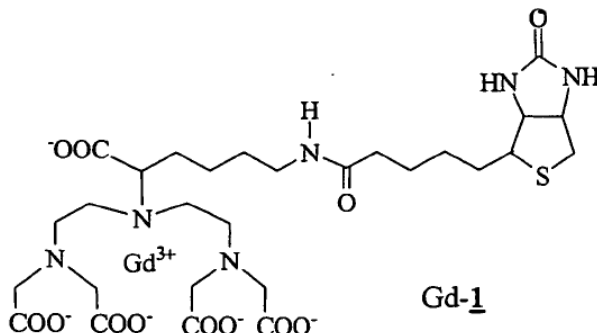
SECCIÓN EXPERIMENTAL

Se notifica una lista no limitativa de sistemas de rotación lenta preferidos de la invención en la siguiente sección, para mostrar mejor a modo de ejemplo el amplio potencial de aplicación de la presente invención.

Ejemplo 1

Como prueba de principio, se han investigado las propiedades de respuesta de un complejo de $\text{Gd}(\text{III})$ macromolecular frente a la temperatura, un parámetro cuya medición no invasiva *in vivo* es importante para fines o bien de diagnósticos o bien terapéuticos.

Entre varias posibilidades, se eligió el aducto formado por cuatro unidades de complejo **1** y avidina como sistema que se mueve lentamente. El complejo **1** es un derivado de GdDTPA que soporta sobre su superficie un resto de biotina. Se notifica a continuación la estructura de este complejo. GdDTPA es el ejemplo más representativo de agentes de contraste para IRM, ya comercializados con el nombre Magnevist®. Avidina es una glicoproteína tetramérica (PM de aproximadamente 68 kDa) que une fuertemente ($K_A = 10^{15}$) (Green NM, Adv Prot Chem 1975, 29, 85-133) cuatro unidades de biotina (figura 3).



Se sometió a prueba el protocolo R_{2p}/R_{1p} para la medición de temperatura en tres disoluciones que contenían cantidades diferentes de aducto (Gd-1)₄/avidina (en tampón PBS a pH 7,4). La concentración de Gd-1 en las tres disoluciones era de 0,125, 0,25, y 0,5 mM, respectivamente. Se midieron los valores de R_1 y R_2 para protones de agua a 7,05 T (correspondiente a una frecuencia de Larmor de protones de 300 MHz) para cada disolución en el intervalo de temperatura 298-318 K.

Se obtuvieron las contribuciones paramagnéticas de R_{1p} y R_{2p} a las tasas de relajación observadas sustrayendo las contribuciones diamagnéticas correspondientes (R_{id}) medidas para cada temperatura en ausencia del agente paramagnético, es decir $R_{ip} = R_i - R_{id}$.

En el intervalo de temperatura investigado, la razón R_{2p}/R_{1p} es lineal con una pendiente positiva de aproximadamente 0,35 unidades/grado (figura 4).

De manera importante, la desviación entre los valores de R_{2p}/R_{1p} para las tres disoluciones a una temperatura dada es muy pequeña, demostrando así la validez de este enfoque. El aumento de valores de R_{2p}/R_{1p} con el aumento de la temperatura es el resultado de una participación significativa de τ_R en la determinación de la tasa de relajación transversal. De hecho, los valores de R_{2p} aumentan con la temperatura, mientras los valores de R_{1p} muestran una tendencia opuesta. Esto significa que valores de τ_M en el intervalo de temperatura considerado están probablemente en el medio entre T_{2M} y T_{1M} ($T_{1M} > \tau_M > T_{2M}$).

Por el contrario, en ausencia de Avidina, la razón R_{2p}/R_{1p} para disoluciones que contienen una concentración de Gd-1 de 0,125, 0,25, y 0,5 mM es de aproximadamente 1,3 y, además, no se ve afectado en absoluto por cambios de temperatura.

Ejemplo 2

Como prueba de principio, se ha investigado la propiedad de respuesta de un complejo de Gd(III) macromolecular frente a pH, otro marcador *in vivo* de diagnostico importante.

En este caso, el sistema de rotación lenta elegido fue el aducto no covalente formado por Gd-DOTP (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrametilenofosfónico) y poliarginina. GdDOTP es un complejo macrocíclico cargado negativamente que puede unirse, a través de fuerzas electrostáticas, a compuestos cargados positivamente, incluyendo poliaminoácidos catiónicos como poliarginina. (Aime S, Angew Chem Int Ed 2003, 42, 4527-4529).

La esfera de coordinación interna de Gd-DOTP carece de moléculas de agua y, por tanto, se ha explicado la relaxividad relativamente alta medida para este complejo en términos de una contribución de segunda esfera grande que surge de la presencia de varias moléculas de agua estrechamente unidas a los grupos fosfonato del quelato y, por tanto, acopladas de manera dipolar al ión de Gd(III).

En analogía a algunos otros poliaminoácidos catiónicos como polilisina, el movimiento de rotación de poliarginina es dependiente del pH debido al paso desde una estructura de rotación más rápida (a pH ácido) debido a la repulsión de los grupos guanidina cargados positivamente hacia una estructura de hélice α de rotación más lenta y más rígida formada a pH básico cuando se desprotonan los residuos de guanidina.

La afinidad de unión entre Gd-DOTP y poliarginina es tan fuerte ($K_A = 3 \cdot 10^4$ tal como se determina mediante mediciones relaxométricas) que es muy fácil preparar una disolución en la que el complejo paramagnético se une completamente al polímero.

Se sometió a prueba el protocolo R_{2p}/R_{1p} para la medición de pH en dos disoluciones que contenían cantidades diferentes de aducto de Gd-DOTP/poliarginina (en tampón HEPES 10 mM). La concentración del complejo de Gd(III) en las dos disoluciones fue de 0,25 y 0,5 mM, respectivamente, y la razón molar de Gd-DOTP/poliarginina fue de 10/1. Se midieron los valores de R_1 y R_2 para protones de agua a 14,1 T (correspondiente a una frecuencia de Larmor de protones de 600 MHz) y 312 K.

Se obtuvieron las contribuciones paramagnéticas R_{1p} y R_{2p} a las tasas de relajación observadas sustrayendo las contribuciones diamagnéticas correspondientes (R_{id}) medidas en cada valor de pH en ausencia del agente paramagnético.

El resultado mostrado en la figura 5 respalda fuertemente la aplicabilidad correcta del enfoque propuesto también para sistemas macromoleculares que no incluyen ninguna molécula de agua coordinada con el centro metálico, siempre que las tasas de relajación de dichos sistemas estén dominadas por la contribución de protones de agua acoplados de manera dipolar presentes en la segunda esfera de coordinación del centro metálico.

Ejemplo 3

Como prueba de principio adicional, se ha investigado la capacidad de respuesta al pH de un aducto covalente a base de Gd(III) macromolecular.

El sistema modelo se representa por un quelato de Gd(III) unido covalentemente, a través de un resto escuárico, a un esqueleto de poliornitina (Gd-II, figura 6).

Tal como ya se mencionó en el ejemplo 2, se sabe que poliaminoácidos básicos, como poliornitina, experimentan un cambio conformacional reversible controlado por pH desde una estructura "helicoidal al azar", predominante a $\text{pH} < 9$ cuando se protonan los residuos de ornitina, hacia una estructura "pseudo-helicoidal α ", predominante a $\text{pH} > 11$ cuando se desprotonan los residuos de ornitina (GC Hammes, PB Roberts, J Am Chem Soc, 91, 1812, 1969). De manera interesante, se ha demostrado que la movilidad rotacional de las dos conformaciones son diferentes y se ha observado un valor de τ_R más prolongado para la conformación "seudo-helicoidal α " estructuralmente ordenada y significativamente más rígida (véase, por ejemplo, S Aime, M Botta, SG Crich, G Giovenzana, G Palmisano, M Sisti, Chem Commun, 1577, 1999).

La figura 7 notifica la dependencia del campo magnético de R_{1p} y R_{2p} medida a tres valores de pH, 7, 10, y 12, de una disolución de Gd-II que contiene 1 mM de ión de Gd(III).

El aumento de R_{1p} observado con el aumento de pH es una evidencia clara de la ralentización del movimiento reorientacional del complejo macromolecular provocada por el cambio conformacional del polímero. Un análisis cuantitativo detallado de los perfiles de R_{1p} , realizado usando la teoría de Solomon-Bloembergen-Morgan, implementado con el modelo Lipari-Zsabo, indicó que tiempos reorientacionales tanto globales (τ_R^g) como locales (τ_R^l) para el aducto macromolecular eran dependientes del pH (se obtuvieron τ_R^g de 1,0, 1,7, y 3,6 ns a pH 7, 10, y 12, respectivamente).

De manera interesante, los valores de R_{2p} no son dependientes del campo magnético, porque están dominados por τ_C y este último parámetro, en este caso, está dominado por τ_R . Por esta razón, los valores de R_{2p} se ven afectados significativamente por el pH de la disolución.

Para confirmar la independencia de la concentración de la razón R_{2p}/R_{1p} , se han medido las contribuciones paramagnéticas a las tasas de relajación a 14 T, 25°C, y a cuatro valores de pH (7, 8,5, 10, y 12), como función de la concentración del ión de Gd(III). El resultado, notificado en las figuras 8 y 9, muestra claramente que la razón R_{2p}/R_{1p} es independiente de la concentración del agente macromolecular pero dependiente del parámetro de interés.

Ejemplo 4

Se han investigado las propiedades de respuesta frente a la temperatura de un liposoma que atrapa un complejo de Gd(III) como ejemplo de un sistema de respuesta de tamaño nanométrico según la invención. Se ha preparado el liposoma paramagnético hidratando una película lipídica delgada fabricada de una mezcla de lípidos (POPC/Chol/DSPE-PEG, razón molar 55:40:5 en el que POPC es 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, Chol es colesterol, y DSPE-PEG es 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(polietilenglicol)-2000) con una disolución 200 mM de Gd-HPDO3A (un agente de contraste comercializado como ProHance®). Tras una extrusión repetida con un filtro de 400 nm de diámetro, se ha dializado exhaustivamente la suspensión de liposoma frente a tampón Hepes isotónico con el fin de eliminar el complejo de Gd(III) no atrapado. El diámetro medio de liposoma tras la diálisis era de 260 nm.

La figura 10 notifica la dependencia de la temperatura de R_{2p} y R_{1p} para este sistema de tamaño nanométrico, medida a 7 T. Las dos contribuciones paramagnéticas muestran una tendencia opuesta con el aumento de la temperatura: R_{2p} disminuye, mientras R_{1p} aumenta.

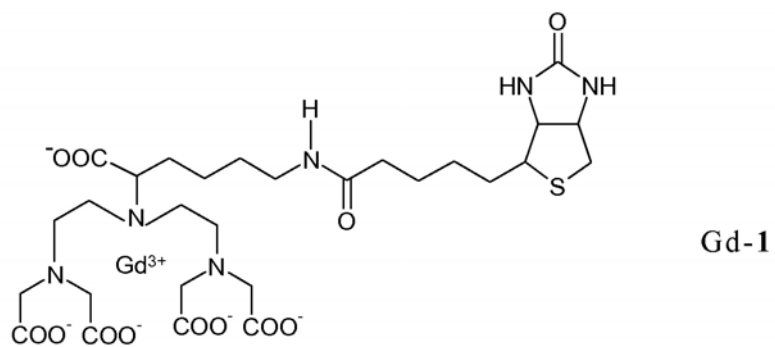
5 Puede explicarse el comportamiento observado considerando que la contribución de R_{1p} se controla por la permeabilidad al agua de la membrana liposómica y, por esta razón, un aumento de temperatura conduce a un aumento de R_{1p} . Por el contrario, efectos de susceptibilidad magnética, cuyo grado disminuye según aumenta la temperatura, dominan los valores de R_{2p} .

10 Se ha demostrado la independencia de la concentración de la razón R_{2p}/R_{1p} midiendo valores de R_{2p} y R_{1p} de disoluciones que contienen cantidades diferentes de liposomas (y por consiguiente de complejo de Gd(III), figura 11).

El comportamiento diferente mostrado por R_{1p} y R_{2p} frente a la temperatura hace que la razón R_{2p}/R_{1p} sea fuertemente dependiente de este parámetro (figura 12).

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación *in vivo*, mediante el uso de la técnica de IRM, de parámetro físico o químico de interés diagnóstico en un órgano, fluido o tejido del cuerpo de ser humano o animal, comprendiendo el método:
 - 5 - administrar a dicho ser humano o animal una cantidad eficaz desde el punto de vista de diagnóstico de un agente paramagnético de rotación lenta que responde a cambios del microentorno de dicho parámetro mediante cambios en la razón R_{2p}/R_{1p} , que se selecciona de
 - 10 - un complejo metálico paramagnético macromolecular dotado de al menos una molécula de agua lábil coordinada con el centro metálico y que tiene un valor de τ_R de desde 1 hasta 10 ns y un valor de τ_M de desde 0,01 hasta 1 μs , y
 - 15 - un sistema de tamaño nanométrico que atrapa un complejo metálico paramagnético a una concentración mínima de 5 mM, y que tiene un diámetro medio ≥ 5 nm, y
 - 20 - registrar una obtención de imágenes de IRM que responde a dicho parámetro mediante la medición de la razón R_{2p}/R_{1p} .
 2. Método según la reivindicación 1, en el que la razón R_{2p}/R_{1p} medida actúa como indicador de un cambio en el parámetro de interés.
 3. Método según la reivindicación 1, en el que el metal del complejo o agente paramagnético es un lantánido o un ión de metal de transición.
 4. Método según la reivindicación 3, en el que el ión metálico se selecciona de $Fe^{(2+)}$, $Fe^{(3+)}$, $Cu^{(2+)}$, $Cr^{(3+)}$, $Eu^{(3+)}$, $Dy^{(3+)}$, $La^{(3+)}$, $Yb^{(3+)}$ o $Mn^{(2+)}$ y $Gd^{(3+)}$.
 5. Método según la reivindicación 4, en el que el ión metálico es $Gd^{(3+)}$.
 6. Método según la reivindicación 1, en el que el complejo metálico paramagnético macromolecular es el aducto ($Gd-1$)₄/avidina, o el aducto Gd-DOTP/poliarginina, o el aducto macromolecular de $Gd-II$.
 7. Método según la reivindicación 1, en el que el sistema paramagnético de tamaño nanométrico es una nanopartícula, una microemulsión, un liposoma o una cavidad proteica.
 8. Método según la reivindicación 1, en el que el sistema paramagnético de tamaño nanométrico es un liposoma que atrapa Gd-HPDO3A.
 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el parámetro físico o químico de interés diagnóstico se selecciona de temperatura, pH, presión parcial de oxígeno o dióxido de carbono, concentración de ión o metabolito específico, actividad enzimática específica.
 10. Uso de un agente paramagnético de rotación lenta que responde a un parámetro físico o químico dado de interés diagnóstico mediante cambios en la razón R_{2p}/R_{1p} y seleccionado de un complejo metálico paramagnético macromolecular dotado de al menos una molécula de agua lábil coordinada con el centro metálico y que tiene un τ_R de desde 1 hasta 10 ns y un valor de τ_M de desde 0,01 hasta 1 μs , y un sistema de tamaño nanométrico que atrapa un complejo metálico paramagnético, a una concentración mínima de 5 mM, y que tiene un diámetro medio ≥ 5 nm, para la preparación de una composición de diagnóstico para su uso en la determinación de dicho parámetro en un órgano, fluido o tejido del cuerpo de ser humano o animal, mediante el uso de IRM, de una manera que es independiente de la concentración absoluta de dicho agente administrado.
 11. Compuesto seleccionado de los siguientes:
 - 45 - el aducto ($Gd-1$)₄/avidina, en el que $Gd-1$ tiene la siguiente estructura



- el aducto macromolecular de Gd-II.

12. Compuestos según la reivindicación 11 para su uso como agentes de contraste.

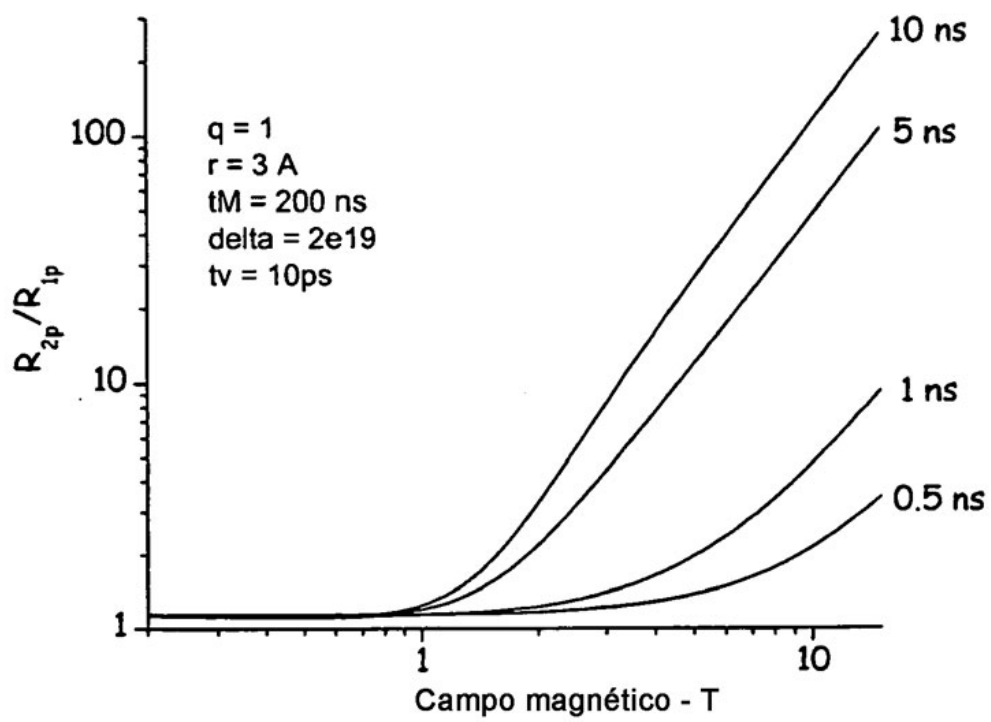


Figura 1

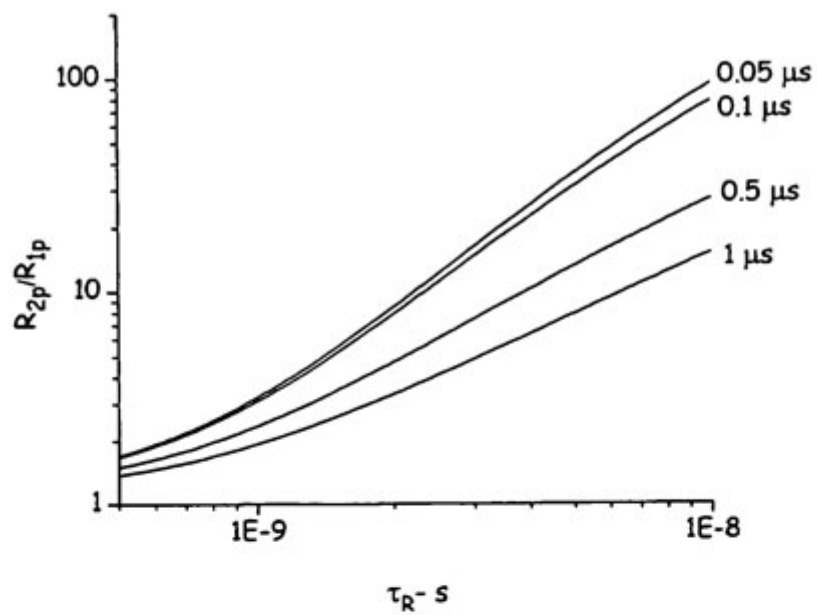


Figura 2a)

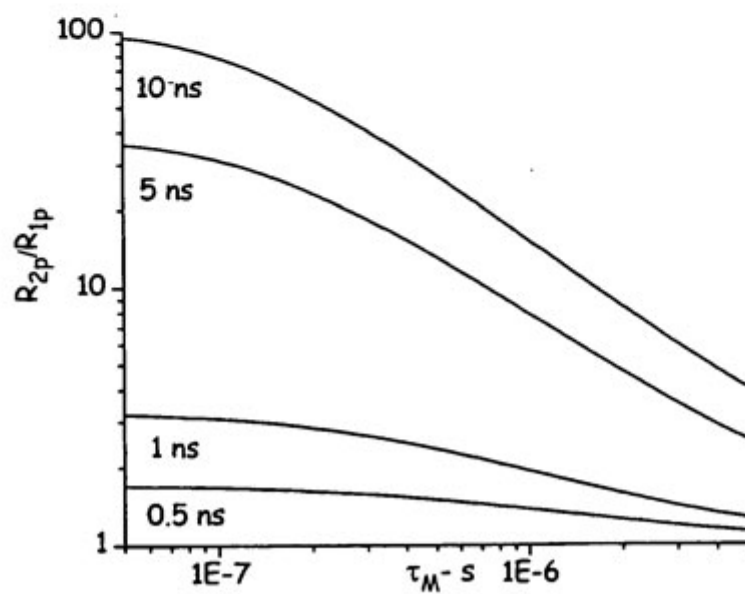


Figura 2b)

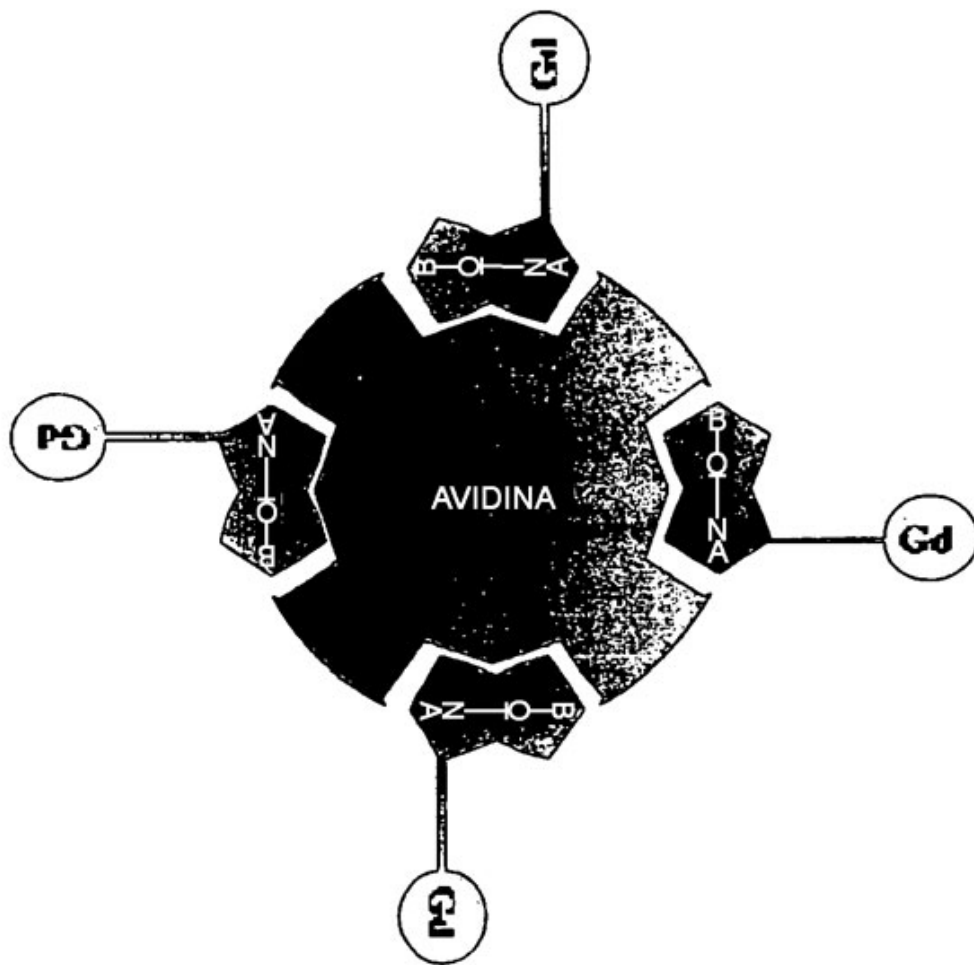


Figura 3

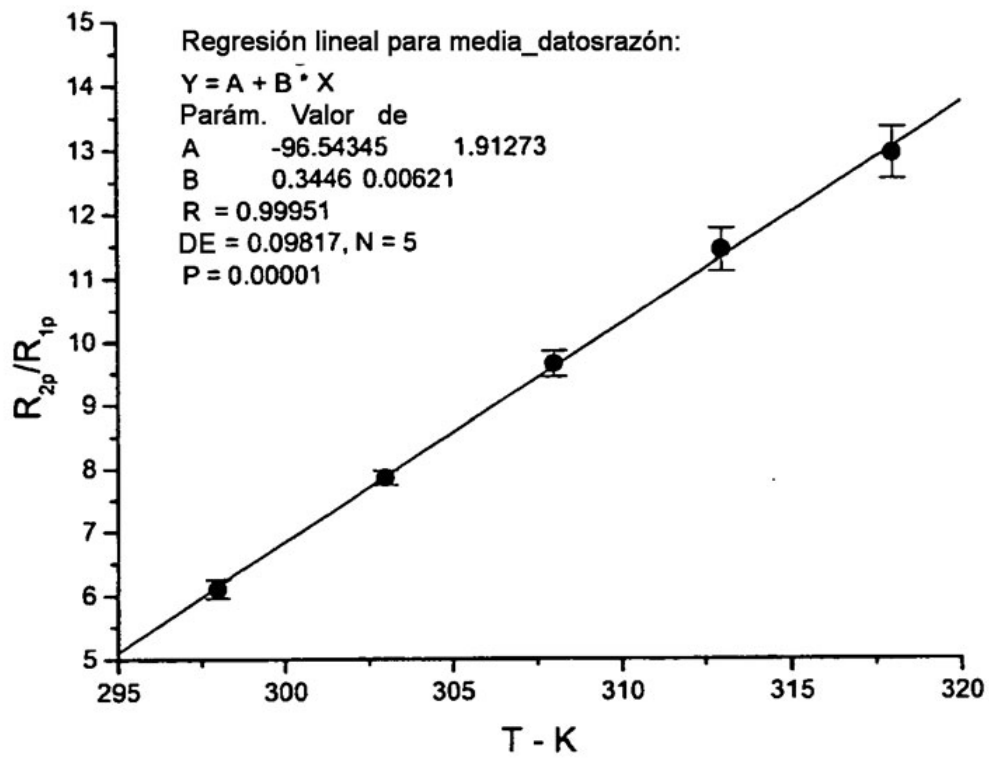


Figura 4

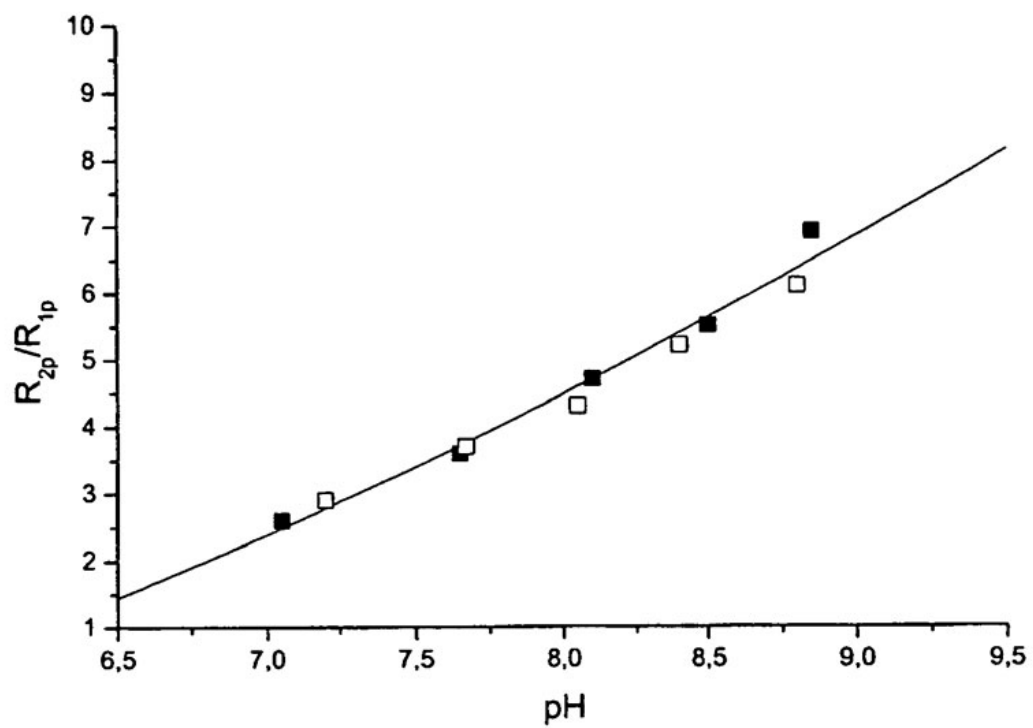


Figura 5

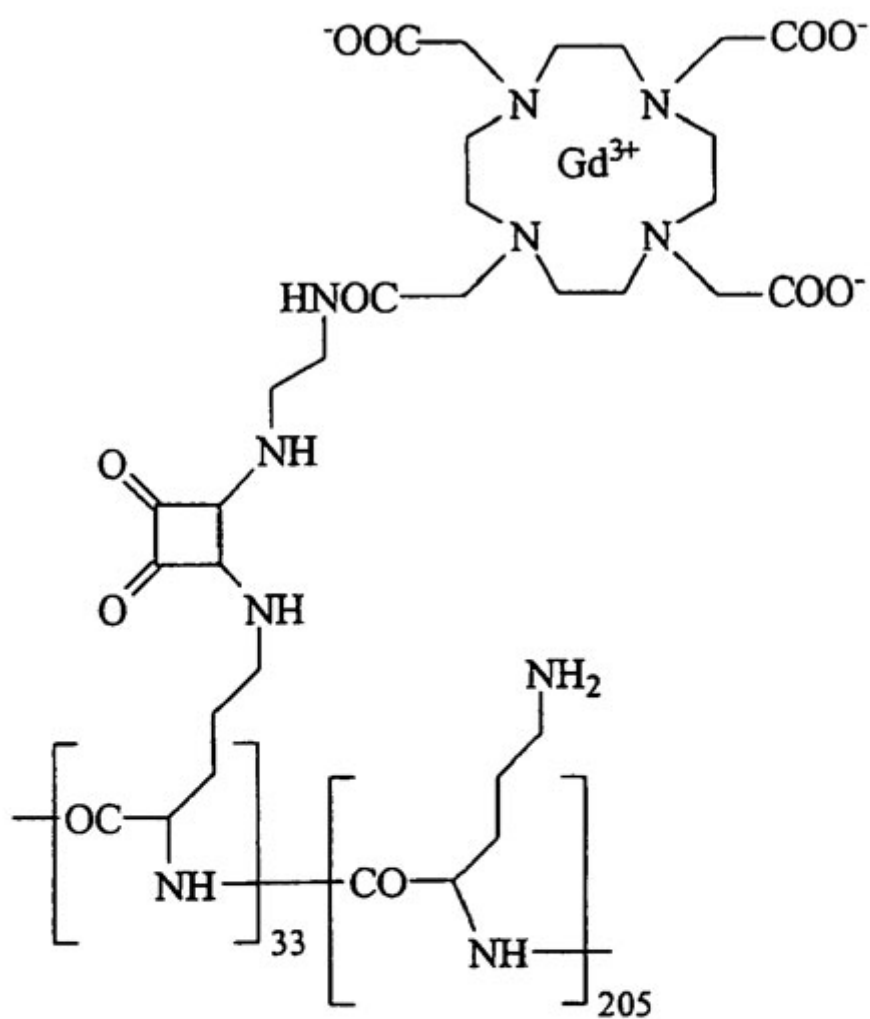
Gd-II

Figura 6

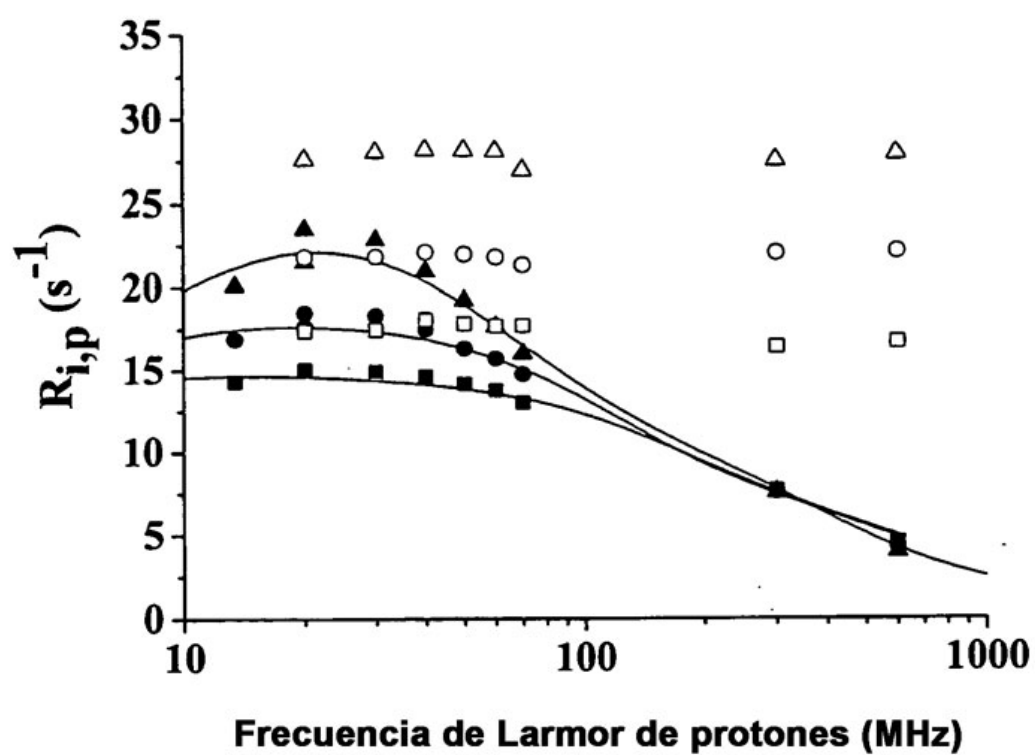


Figura 7

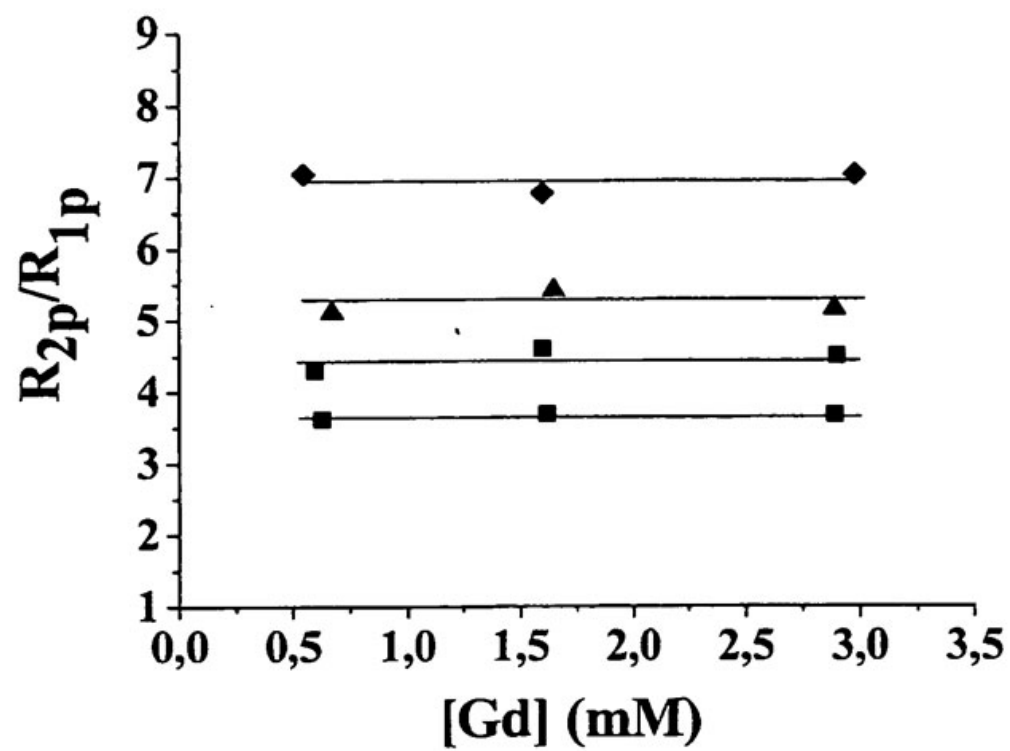


Figura 8

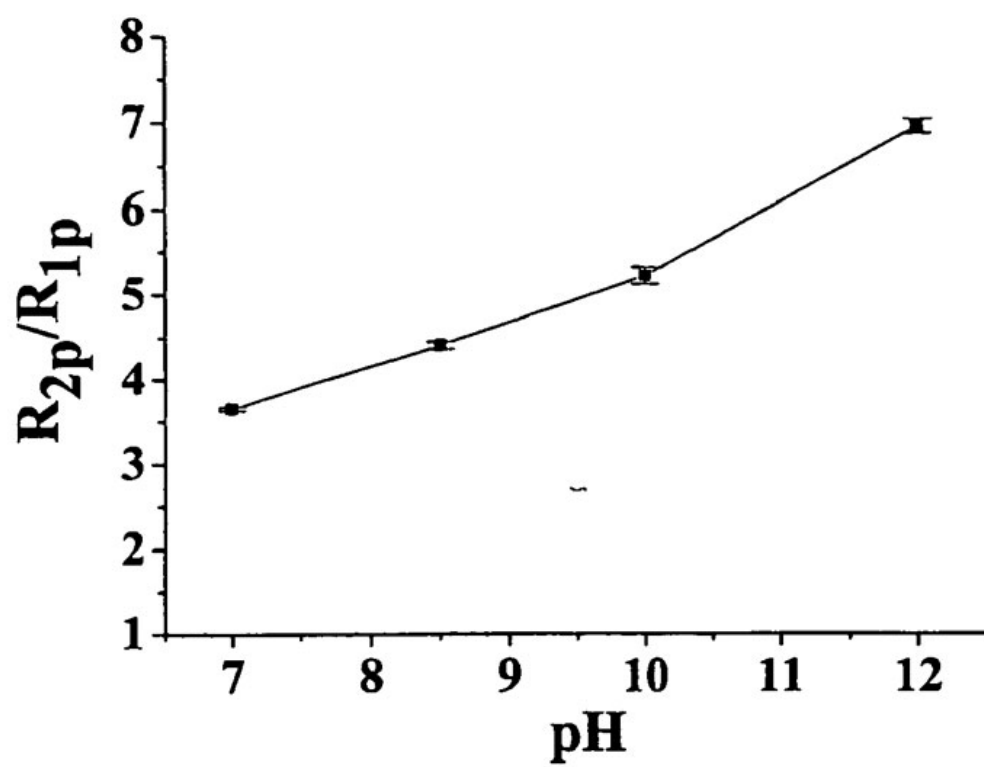
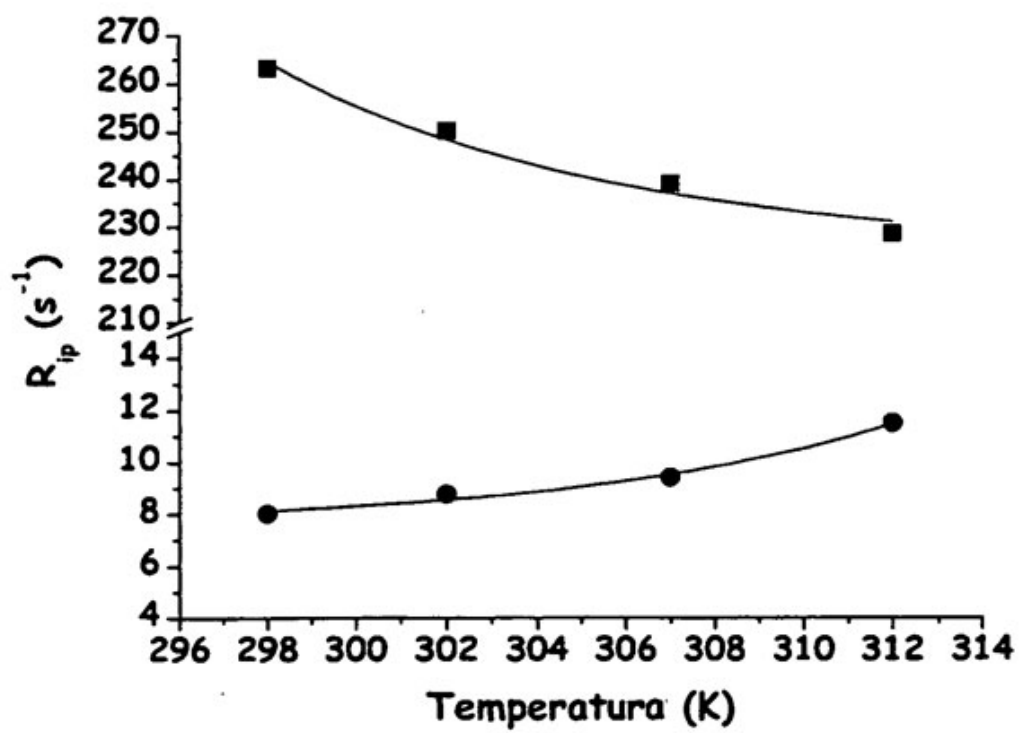


Figura 9



Temperatura 10

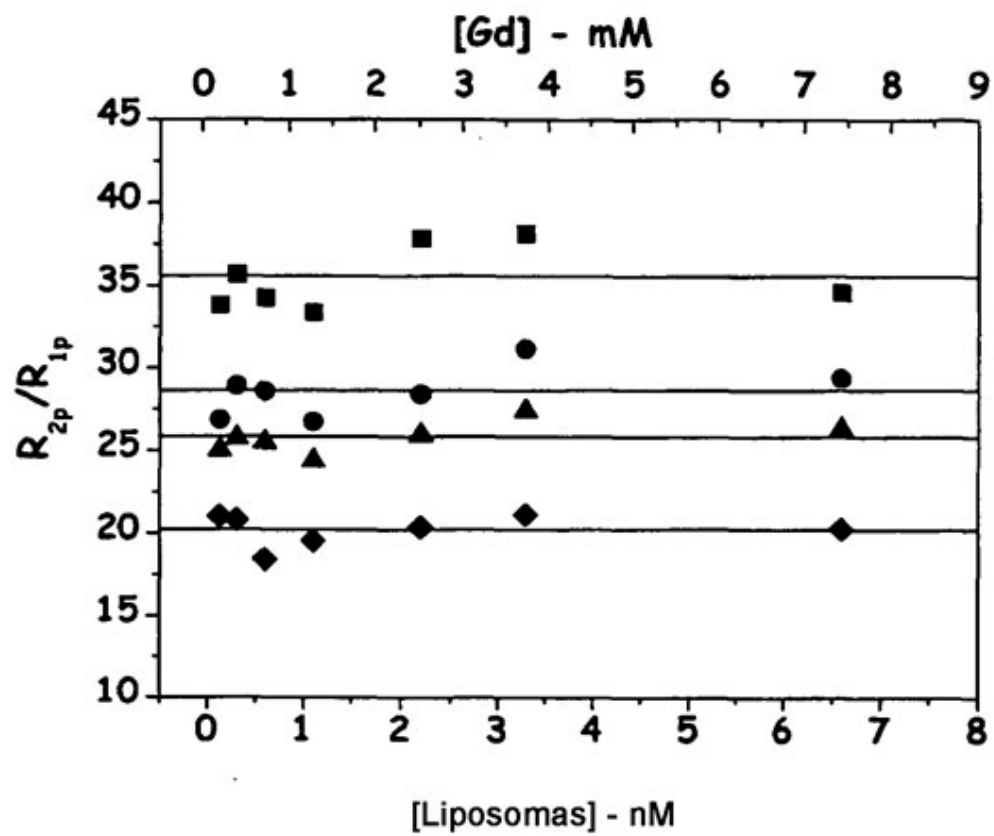


Figura 11

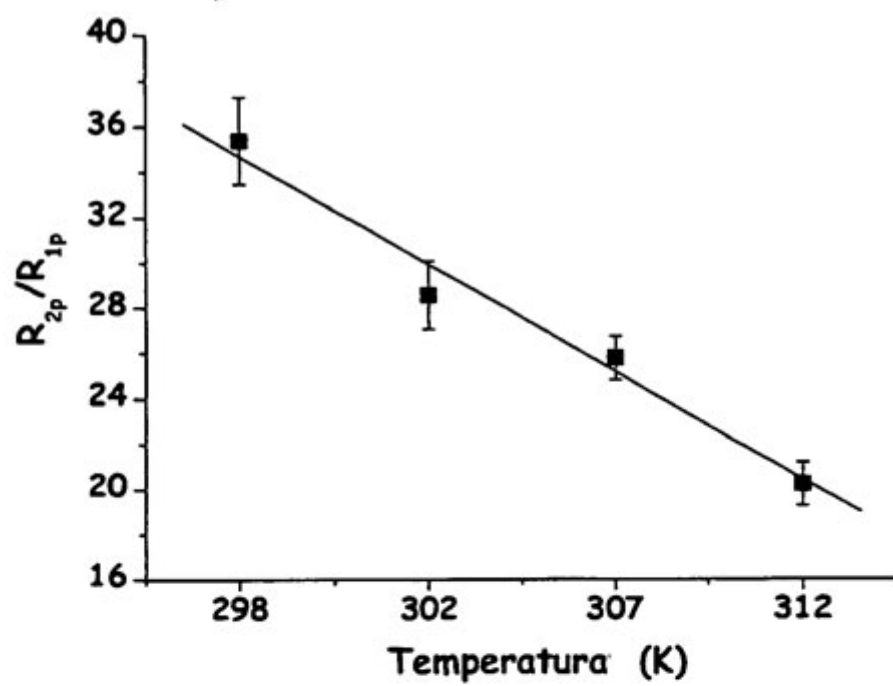


Figura 12