

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 943**

51 Int. Cl.:

A61K 49/18 (2006.01)

A61K 49/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2020** **PCT/PL2020/050021**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2020** **WO20185104**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2020** **E 20727397 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2023** **EP 3937988**

54 Título: **Agente de contraste de IRM para su uso en el diagnóstico de cambios en el endotelio de vasos sanguíneos**

30 Prioridad:

11.03.2019 PL 42923119

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

04.10.2023

73 Titular/es:

UNIWERSYTET JAGIELLONSKI (50.0%)

Golebia 24

31-007 Kraków, PL y

LIPID SYSTEMS SP. Z.O.O. (50.0%)

72 Inventor/es:

BAR, ANNA;

BOROWIK, TOMASZ;

CHLOPICKI, STEFAN;

LANGNER, MAREK y

PRZYBYLO, MAGDALENA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 949 943 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agente de contraste de IRM para su uso en el diagnóstico de cambios en el endotelio de vasos sanguíneos

5 Estado de la técnica

El objeto de la presente invención es el agente de contraste de IRM para el diagnóstico no invasivo de cambios tempranos que se producen en el curso del desarrollo de la disfunción endotelial de los vasos sanguíneos, que va acompañada de cambios bioquímicos locales difíciles de monitorizar y pequeños cambios en la ultraestructura del endotelio y la pared de los vasos sanguíneos. Este agente de contraste tiene la forma de un complejo hidrófilo que contiene Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida). Se usa gadolinio (es decir, Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida)) comúnmente como agente de contraste de obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) en diagnósticos cardiovasculares y soporta procedimientos a través de obtención de imágenes intraoperatorias, por ejemplo, durante la termoablación por ultrasonidos (1; 2; 3). Los agentes de contraste a base de gadolinio disponibles en el mercado son complejos, cuyo objetivo es reducir su toxicidad y mejorar su farmacocinética (4). Estas preparaciones cumplen su papel en la obtención de imágenes del sistema circulatorio, sin embargo, su bajo peso molecular hace que penetren en los espacios tisulares de manera relativamente rápida e inespecífica, lo que limita significativamente las posibilidades de su uso como herramienta de diagnóstico selectivo en patologías cardiovasculares o en la obtención de imágenes de estadios tempranos del cáncer. Para usar la obtención de imágenes por IRM en el diagnóstico de afecciones patológicas relacionadas con la disfunción cardiovascular, están desarrollándose preparaciones basadas en nanopartículas, polímeros, micelas o agregados lipídicos, con mayor frecuencia en forma de liposomas (5). El problema de toxicidad permanece sin resolver en el caso de nanopartículas y partículas poliméricas, mientras que en el caso de agregados, tales como micelas y liposomas, la principal dificultad es obtener una preparación estable cuando está en el sistema circulatorio. Una solución parcial a estos problemas se logra usando preparaciones que contienen gadolinio complejo. Los complejos hidrófilos pueden usarse solos (Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida)), mientras que los complejos anfífilos tienen una alta afinidad por los agregados lipídicos (6). Cuando se usan complejos hidrófilos de bajo peso molecular, se obtienen baja selectividad y parámetros farmacocinéticos no deseados, mientras que, debido a la alta polaridad del gadolinio, la afinidad del complejo anfílico por la membrana lipídica es limitada, lo que da como resultado una baja estabilidad del complejo.

Un ejemplo del uso de liposomas como agente de contraste de IRM es el presentado en la patente WO2018/051289 A2, donde el gadolinio quelado se une a un enlazador polimérico anclado en la membrana con una molécula lipídica. Este agente de contraste está destinado a diagnósticos por IRM en mujeres embarazadas.

Una de las necesidades médicas no satisfechas es la capacidad de detectar de manera temprana los cambios en el fenotipo endotelial vascular, permitiendo una intervención farmacológica temprana para prevenir la progresión de la enfermedad. La homeostasis de los vasos sanguíneos y el sistema cardiovascular está controlada por la función endotelial, que es responsable de la regulación de muchos procesos importantes, tales como permeabilidad endotelial, flujo sanguíneo, procesos trombóticos, fibrinolíticos e inflamatorios (10). En el caso de disfunción endotelial, la homeostasis está alterada, lo que es un signo de muchas enfermedades cardiovasculares y tiene importancia diagnóstica y terapéutica en aterosclerosis, hipertensión, insuficiencia cardíaca y en muchas otras enfermedades tales como, por ejemplo, cánceres (11). Una de las características básicas de la disfunción endotelial es un trastorno del control local y dependiente de NO de la luz de los vasos sanguíneos, y el grado de esta alteración puede ser el indicador de la progresión de la disfunción endotelial y las enfermedades cardiovasculares (12). La evaluación del cambio dependiente de NO en la luz de los vasos sanguíneos se basa en medir el diámetro de los vasos sanguíneos en respuesta a un agente químico o físico usando una variedad de métodos de medición que incluyen angiografía, pletismografía, tonometría o ultrasonografía Doppler (13). En condiciones clínicas, los métodos invasivos tienen un uso limitado. Los métodos no invasivos son una alternativa deseable y actualmente se usan ampliamente para evaluar la función dependiente del endotelio de la pared de los vasos sanguíneos, incluida la evaluación de la dilatación mediada por flujo (FMD) en la arteria braquial (14) medida por ultrasonidos o hiperemia reactiva (RH-PAT) en la circulación sanguínea periférica (15).

La obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) también puede proporcionar información sobre el estado de la pared de los vasos sanguíneos con alta resolución espacio-temporal de una manera que permita la evaluación del estado funcional del endotelio (16). La IRM *in vivo* también es la técnica preferida para evaluar el endotelio en animales experimentales (17). La medición simultánea del diámetro vascular dependiente del endotelio y la permeabilidad endotelial usando IRM proporciona oportunidades únicas para una comprensión no invasiva de la función endotelial *in vivo* (18). La integridad estructural comprometida del endotelio luminal y microvascular y la mayor densidad de microvasos aumentan la permeabilidad vascular en la aterosclerosis y, particularmente, la placa propensa a la ruptura. El mapeo de T1 usando un agente de contraste de unión a albúmina podría usarse para cuantificar cambios de la permeabilidad vascular asociados con aterosclerosis e inestabilidad de placas (23).

El objeto de la invención es un agente de contraste para su uso en el diagnóstico de cambios tempranos en la función endotelial vascular indicativos de disfunción endotelial, y está en forma de una suspensión acuosa que contiene Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida), como agente de contraste hidrófilo, encapsulado dentro de liposomas monocapa de un tamaño de 50 nm a 200 nm, en donde la membrana lipídica de los liposomas está compuesta por

una mezcla que contiene: fosfatidilcolina, colesterol y polietilenglicol unidos covalentemente a la molécula de fosfatidiletanolamina (PEG-PE).

5 Preferiblemente, la razón molar de agente de contraste con respecto a componentes lipídicos es de 1:1000 a 5:1, lo más preferiblemente de 1:50 a 2:1.

Preferiblemente, la razón molar de lípidos con respecto a colesterol en la membrana lipídica es de 10:1 a 5:1.

10 Preferiblemente, los liposomas monocapa contienen PEG2000-PE en una cantidad de hasta el 10 % en moles de todos los componentes anfífilos.

15 Preferiblemente, el agente de contraste de IRM según la invención contiene al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que comprende: caldiamida, hidróxido de sodio, sustancia osmóticamente activa, antioxidante, y/o una mezcla de los mismos.

Preferiblemente, el contraste según la invención contiene, como sustancia osmóticamente activa, una sustancia seleccionada del grupo que comprende solución salina, disolución de monosacárido o disacárido y/o una mezcla de los mismos.

20 Preferiblemente, la concentración del agente de contraste hidrófilo en la fase acuosa de la suspensión es de 1 a 200 g/l.

25 La presente invención son liposomas que contienen un agente de contraste de IRM hidrófilo para evaluar la función endotelial basándose en cambios en la permeabilidad endotelial. La combinación de un agente de contraste encapsulado eficientemente con un portador de liposomas bien caracterizado con tamaños y composición bioquímica bien definidos permite la determinación de cambios en el endotelio de los vasos sanguíneos con sensibilidad suficiente para diagnosticar la función endotelial en animales experimentales y seres humanos.

30 La esencia de la solución según la invención es un nuevo agente de contraste de IRM dedicado al diagnóstico temprano y la posterior monitorización de la disfunción del endotelio vascular. El nuevo agente de contraste de IRM consiste en Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) encapsulado dentro de liposomas monocapa. La composición y el tamaño de estos liposomas están adaptados a la fisiopatología de la disfunción endotelial. Los elementos estructurales de la pared de los liposomas son fosfolípidos y colesterol biológicamente neutros, lo que hace que la pared de los liposomas sea impermeable, y polietilenglicol unido covalentemente al fosfolípido, lo que garantiza una circulación duradera de liposomas en el torrente sanguíneo y, como consecuencia, su acumulación en la pared de los vasos sanguíneos con un endotelio vascular cambiado patológicamente. Los tamaños de los liposomas se seleccionan de tal manera que puedan penetrar en la pared del vaso con un endotelio vascular cambiado patológicamente. El diámetro de los liposomas monocapa según la invención está en el intervalo de 50 a 200 nm.

40 Los liposomas unilamelares pueden contener un componente anfífilo seleccionado del grupo que comprende fosfolípidos, esfingolípidos, lípidos modificados químicamente y esteroides, especialmente fosfatidilcolinas y/o mezclas de las mismas, preferiblemente mezclas de fosfatidilcolina con polietilenglicol unido covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina (PEG-PE) o una mezcla de fosfatidilcolina con colesterol y PEG-PE.

45 El uso de contraste hidrófilo (Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida)) encapsulado en el interior acuoso de los liposomas resuelve la mayoría de las dificultades descritas anteriormente. La invención divulgada, combinada con la posibilidad de modificar los parámetros de los liposomas (tamaño, carga superficial o accesibilidad superficial) permite obtener agentes de contraste de IRM con parámetros que permiten el diagnóstico de disfunción endotelial temprana, y no solo estadios tardíos de la enfermedad provocados por disfunción endotelial, como es el caso con la detección de cambios ateroscleróticos, o vasculitis avanzada (7; 8; 9).

50 La solución descrita difiere de las soluciones conocidas, que se basan en la afinidad del ligando unido a liposomas o anticuerpo específico para el receptor o epítipo para garantizar la especificidad celular o tisular. La solución según la invención tiene selectividad tisular utilizando la correlación entre la topología tisular (endotelio) y la integridad, y los parámetros de los liposomas. Según la invención, se ha encontrado sorprendentemente que el diagnóstico de la disfunción endotelial requiere que el diámetro de los liposomas no supere los 200 nm para que puedan penetrar fácilmente debajo de la capa de endotelio vascular.

60 La solución según la invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos y figuras, que no limitan el alcance de su protección de ninguna manera.

65 Los liposomas se prepararon según el procedimiento divulgado en la patente PCT/EP2018/057400 "High-efficiency encapsulation of hydrophilic compounds in unilamellar liposomes" donde se combina gadolinio en la fase acuosa con una alta concentración de lípido disuelto en propilenglicol. Las sustancias anfífilas que son los elementos estructurales de los liposomas deben tener un valor de logP mayor de 5 para garantizar su estabilidad en los fluidos fisiológicos. Como resultado, se obtienen liposomas con un alto contenido de gadolinio de manera diferente al método dado a

conocer en la patente US 2012/0141381 A1 "Methods for loading contrast agents into a liposome" donde los lípidos se hidratan después de mezclarse en un disolvente orgánico, que se retira antes de que se formen los liposomas.

Ejemplo 1.

Se añadió Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida), también conocida como gadodiamida, disuelta en una disolución acuosa de caldiamida de sodio a pH 7,45, a fosfatidilcolina purificada (Lipoid GmbH, Alemania) disuelta en propilenglicol. La mezcla completa se agitó a 60 °C hasta que se formó una suspensión homogénea, lechosa. Entonces, la suspensión así obtenida se extruyó a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm para obtener un gel de liposomas homogéneo caracterizado por un tamaño uniforme de liposomas que encapsulan el agente de contraste.

Tabla 1. Composición de agente de contraste.

AGENTE DE CONTRASTE:	% en peso
Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida)	14,8
SUSTANCIAS ADICIONALES:	
Fosfatidilcolina purificada	30
Propilenglicol	20
Caldiamida de sodio	0,62
Hidróxido de sodio	0,01
Agua purificada	34,57
TOTAL	100

La razón molar de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) con respecto a sustancias anfífilas es de aproximadamente 1:2. El tamaño promedio de los liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,4 es de 124 nm con PDI = 0,12. La eficiencia de encapsulación fue del 77 % $\pm$ 5 %. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

La figura 1 muestra la homogeneidad de la suspensión de liposomas. El panel izquierdo muestra la distribución de tamaños de liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,4 y el panel derecho muestra la calidad de hacer coincidir la función de correlación con los datos experimentales. La eficiencia de encapsulación fue del 77 % $\pm$ 5 %. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

Ejemplo 2.

Se añadió Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) disuelta en una disolución acuosa de caldiamida de sodio a pH 7,45 a fosfatidilcolina purificada (Lipoid) con la adición de colesterol disuelto en propilenglicol. La mezcla completa se agitó a 60 °C hasta que se formó una suspensión homogénea, lechosa. Entonces, la suspensión así obtenida se extruyó a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm para obtener un gel de liposomas homogéneo caracterizado por un tamaño uniforme de liposomas que encapsulan el agente de contraste.

Tabla 2. Composición de agente de contraste.

AGENTE DE CONTRASTE:	% en peso
Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida)	14,8
SUSTANCIAS ADICIONALES:	
Fosfatidilcolina purificada	27
Colesterol	3
Propilenglicol	20
Caldiamida de sodio	0,62
Hidróxido de sodio	0,01
Agua purificada	34,57
TOTAL	100

La razón molar de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) con respecto a sustancias anfífilas es de aproximadamente 1:2. El tamaño promedio de los liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,4 es de 132 nm con PDI = 0,17. La eficiencia de encapsulación fue del 87 % $\pm$ 6 %. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

La figura 2 muestra la homogeneidad de la suspensión de liposomas. El panel izquierdo muestra la distribución de tamaños de liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,4 y el panel derecho muestra la calidad de hacer coincidir la función de correlación con los datos experimentales. La eficiencia de encapsulación fue del 87 % $\pm$ 6 %. La eficiencia de encapsulación de gadolinio se determinó usando ultrafiltración. El

ejemplo 2 muestra que la composición lipídica del liposoma puede cambiar la eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida).

Ejemplo 3.

Se añadió Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) disuelta en una disolución acuosa de caldiamida de sodio a pH 7,45 a fosfatidilcolina purificada (Lipoid) con la adición de colesterol y PEG-PE (polietilenglicol con un peso molecular de 2000 Da unido covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina) disuelto en propilenglicol. La mezcla completa se agitó a 60 °C hasta que se formó una suspensión homogénea, lechosa. Entonces, la suspensión así obtenida se extruyó a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm para obtener un gel de liposomas homogéneo caracterizado por un tamaño uniforme de liposomas que encapsulan el agente de contraste.

Tabla 3. Composición de agente de contraste.

AGENTE DE CONTRASTE:	% en peso
Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida)	14,8
SUSTANCIAS ADICIONALES:	
Fosfatidilcolina purificada	22
Colesterol	6
PEG-PE	2
Propilenglicol	20
Caldiamida de sodio	0,62
Hidróxido de sodio	0,01
Agua purificada	34,57
TOTAL	100

La razón molar de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) con respecto a sustancias anfífilas es de aproximadamente 1:2. El tamaño promedio de los liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,4 es de 120 nm con PDI = 0,2. La eficiencia de encapsulación fue del 74 % $\pm$ 8 %. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

Ejemplo 4.

Se añadió Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) disuelta en una disolución acuosa de caldiamida de sodio a pH 7,45 a fosfatidilcolina purificada (Lipoid) disuelta en propilenglicol. La mezcla completa se agitó a 60 °C hasta que se formó una suspensión homogénea, lechosa. Entonces, la suspensión así obtenida se extruyó a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm para obtener un gel de liposomas homogéneo caracterizado por un tamaño uniforme de liposomas que encapsulan el agente de contraste.

Tabla 4. Composición de agente de contraste.

AGENTE DE CONTRASTE:	% en peso
Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida)	20
SUSTANCIAS ADICIONALES:	
Fosfatidilcolina purificada	30
Propilenglicol	20
Caldiamida de sodio	0,84
Hidróxido de sodio	0,01
Agua purificada	29,15
TOTAL	100

La razón molar de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) con respecto a sustancias anfífilas es de aproximadamente 2:3. El tamaño promedio de los liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,4 es de 105 nm con PDI = 0,15. La eficiencia de encapsulación fue del 82 % $\pm$ 5 %. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

Ejemplo 5

Se añadió Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) disuelta en una disolución acuosa de caldiamida de sodio a pH 7,45 a fosfatidilcolina purificada (Lipoid) disuelta en propilenglicol. La mezcla completa se agitó a 60 °C hasta que se formó una suspensión homogénea, lechosa. Entonces, la suspensión así obtenida se extruyó a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm para obtener un gel de liposomas homogéneo caracterizado por un tamaño uniforme de liposomas que encapsulan el agente de contraste.

Tabla 5. Composición de agente de contraste.

AGENTE DE CONTRASTE:	% en peso
Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida)	0,1
SUSTANCIAS ADICIONALES:	
Fosfatidilcolina purificada	30
Propilenglicol	20
Caldiamida de sodio	0,01
Hidróxido de sodio	0,01
Agua purificada	49,88
TOTAL	100

La razón molar de Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida) con respecto a sustancias anfífilas es de aproximadamente 1:300. El tamaño promedio de los liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,35 es de 110 nm con PDI = 0,1. La eficiencia de encapsulación fue del 84 % $\pm$ 6 %. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

Ejemplo 6.

Se añadió Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida) disuelta en una disolución acuosa de caldiamida de sodio a pH 7,45 a fosfatidilcolina purificada (Lipoid) disuelta en glicerol. La mezcla completa se agitó a 60 °C hasta que se formó una suspensión homogénea, lechosa. Entonces, la suspensión así obtenida se extruyó a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm para obtener un gel de liposomas homogéneo caracterizado por un tamaño uniforme de liposomas que encapsulan el agente de contraste.

Tabla 6. Composición de agente de contraste.

AGENTE DE CONTRASTE:	% en peso
Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida)	1
SUSTANCIAS ADICIONALES:	
Fosfatidilcolina purificada	30
Glicerol	20
Caldiamida de sodio	0,04
Hidróxido de sodio	0,01
Agua purificada	48,95
TOTAL	100

La razón molar de Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida) con respecto a sustancias anfífilas es de aproximadamente 1:30. El tamaño promedio de los liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,4 es de 106 nm con PDI = 0,12. La eficiencia de encapsulación fue del 86 % $\pm$ 7 %. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

Ejemplo 7.

Se añadió Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida) disuelta en solución salina a pH 7,45 a fosfatidilcolina purificada (Lipoid) y vitamina E disuelta en propilenglicol. La mezcla completa se agitó a 60 °C hasta que se formó una suspensión homogénea, lechosa. Entonces, la suspensión así obtenida se extruyó a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm para obtener un gel de liposomas homogéneo caracterizado por un tamaño uniforme de liposomas que encapsulan el agente de contraste.

Tabla 7. Composición de agente de contraste.

AGENTE DE CONTRASTE:	% en peso
Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida)	1
SUSTANCIAS ADICIONALES:	
Fosfatidilcolina purificada	20
Propilenglicol	30
Hidróxido de sodio	0,01
Vitamina E	1
Solución salina	47,99
TOTAL	100

La razón molar de Gd-dietilentríaminopentaacetato-bis(metilamida) con respecto a sustancias anfífilas es de aproximadamente 1:20. El tamaño promedio de los liposomas con un agente de contraste encapsulado en una

disolución acuosa a pH 7,4 es de 112 nm con PDI = 0,21. La eficiencia de encapsulación fue del $88 \% \pm 6 \%$. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

Ejemplo 8.

Se añadió Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) disuelta en una disolución acuosa de caldiamida de sodio a pH 7,45 a fosfatidilcolina purificada (Lipoid) disuelta en propilenglicol. La mezcla completa se agitó a 60 °C hasta que se formó una suspensión homogénea, lechosa. Entonces, la suspensión así obtenida se extruyó a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm para obtener un gel de liposomas homogéneo caracterizado por un tamaño uniforme de liposomas que encapsulan el agente de contraste.

Tabla 8. Composición de agente de contraste.

AGENTE DE CONTRASTE:	% en peso
Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida)	14,8
SUSTANCIAS ADICIONALES:	
Fosfatidilcolina purificada	20
Propilenglicol	20
Caldiamida de sodio	0,62
Hidróxido de sodio	0,01
Agua purificada	44,57
TOTAL	100

La razón molar de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) con respecto a sustancias anfífilas es de aproximadamente 1:20. El tamaño promedio de los liposomas con un agente de contraste encapsulado en una disolución acuosa a pH 7,4 es de 118 nm con PDI = 0,1. La eficiencia de encapsulación fue del $82 \% \pm 6 \%$. La eficiencia de encapsulación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) se determinó por ultrafiltración.

La eficacia del contraste de IRM según la invención se sometió a prueba en un modelo animal de disfunción endotelial.

Modelo animal de disfunción endotelial

Los experimentos se realizaron usando ratones ApoE/LDLR^{-/-} hembra de diferentes edades: 4, 6, 8, 12 y 28 semanas de edad (19) en comparación con ratones jóvenes de control (de 8 semanas de edad) (C57BL/6) sin disfunción endotelial. Todos los ratones (peso corporal 20-30 g) se alojaron en condiciones convencionales libres de patógenos (LD: 12/12, humedad: 60 %, temperatura: 23 °C).

Obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM)

Los experimentos de IRM se llevaron a cabo usando un escáner 9.4T (BioSpec 94/20 USR, Bruker, Alemania). Durante el experimento, los ratones se anestesiaron usando isoflurano (Aerrane, Baxter Sp. z o.o., Polonia, 1,5 % en volumen) en una mezcla de oxígeno y aire (1:2). Se monitorizaron la actividad cardíaca, la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal (mantenida a 37 °C, usando agua tibia circulante) usando el sistema de monitorización y sincronización (SA Inc., Stony Brook, NY, EE.UU.). Se tomaron imágenes de los ratones en posición supina para someter a prueba la función endotelial y la permeabilidad en diversos vasos sanguíneos.

Protocolo de IRM in vivo para la evaluación de la permeabilidad endotelial

Se realizaron mediciones de permeabilidad endotelial usando dos agentes de contraste de gadolinio (CA); agente de contraste de unión a albúmina de gadolinio de referencia (Galbumin, BioPAL, Worcester, MA, EE.UU. - 25 mg/ml, 4,5 ml/kg, i.v.) y nueva preparación según la invención - Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) colocada dentro de liposomas. Se midió el tiempo de relajación (T_1) antes y 30 min después de la administración intravenosa de CA para evaluar la permeabilidad de BCA usando la técnica de VFA (20), muestreando la señal usando valores variables de ángulos de volteo (FA) y luego ajustando el resultado al modelo de señal dependiente de T_1 esperado (21). Se obtuvieron imágenes 3D del arco aórtico usando la secuencia 3D IG-FLASH, para obtener una alta uniformidad del perfil de campo B_1 dentro de los subsegmentos medidos. Los parámetros de obtención de imágenes incluyeron los siguientes: T_R 10 ms, T_E 1,1 ms, FOV 30 x 30 x 4 mm³, tamaño de matriz 192 x 160 x 8, número de repeticiones 12. Se usaron ocho FA: 2°, 4°, 6°, 8°, 14°, 20°, 30° y 50°. Los valores de FA se establecieron cambiando la longitud de pulso de RF con potencia de amplificador constante. El tiempo total de escaneo para todos los ángulos fue de 16 min.

Análisis de datos: Las imágenes obtenidas se usaron para calcular mapas de T_1 antes y después de la administración de CA. El modelo de señal se ajustó píxel por píxel usando el software Matlab. Se compararon dos mapas de T_1 (antes y después de la administración de CA) para estimar el número de píxeles para los que T_1 había cambiado significativamente (en más del 50 %) después de la administración de CA (Npx50, marcado en rojo en la figura 3C).

El umbral (50 %) se determinó experimentalmente.

La figura 3 muestra una ilustración de la metodología para la evaluación *in vivo* basada en IRM de la respuesta dependiente del endotelio y la permeabilidad endotelial. La respuesta dependiente del endotelio a acetilcolina (Ach), expresada como cambios en el volumen del vaso, se evaluó en la arteria braquiocefálica (BCA) visible en la imagen 3D del arco aórtico (A) y en la aorta abdominal (AA) situada en la vista sagital del ratón (B). La evaluación de la respuesta del vaso a la dilatación mediada por flujo (FMD), también expresada como cambios en el volumen del vaso, se realizó en la arteria femoral (FA), visible en la imagen 3D de la extremidad posterior izquierda (D). Los píxeles para los que T_1 había cambiado más del 50 % después de CA (Npx50) se marcaron en rojo en una imagen en sección transversal representativa de los vasos sanguíneos que surgen del arco aórtico (C).

Los datos obtenidos se presentan como media y desviación estándar. Las pruebas estadísticas se realizaron usando STATISTICA 10 (Stat Soft Inc., EE.UU.) usando una prueba paramétrica (análisis de la varianza unidireccional (ANOVA) con una prueba de Tukey). Un valor p de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Demostración de que el sujeto de la invención en forma de un gadolinio hidrófilo encapsulado en liposomas es un agente de contraste de IRM para la detección de cambios tempranos en el endotelio de los vasos sanguíneos.

Se usaron liposomas preparados, en el que se encapsuló Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) (GD liposoma) como agentes de contraste de obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) para la detección *in vivo* de disfunción endotelial basándose en cambios en la permeabilidad endotelial en ratones ApoE/LDLR_{-/-}. Para comparación, la evaluación de la permeabilidad endotelial se realizó usando un agente de contraste de gadolinio de unión a albúmina (GD albúmina).

El desarrollo de permeabilidad endotelial aumentada en la arteria braquiocefálica (BCA) en ratones ApoE/LDLR_{-/-}.

En el experimento presentado, se usó el agente de contraste que tenía la composición del ejemplo 8. Como se muestra en la figura 4B, la preparación de Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) encapsulada en el liposoma permitió la detección de cambios tempranos en la permeabilidad endotelial, observados como un aumento en Npx50, que ya se observó en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 4 semanas de edad (Npx50: aumento del 100 % en comparación con los ratones de control, C57BL/6). Los cambios en la permeabilidad endotelial se exacerbaron por la progresión de la aterosclerosis en ratones ApoE/LDLR_{-/-}, y se observó un aumento de 4 veces en Npx50 en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 28 semanas de edad. A diferencia de la administración del agente de contraste liposomal, la inyección intravenosa de GD albúmina provocó cambios significativos en el parámetro Npx50 (aumento de aproximadamente el 100 %) solo en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 28 semanas de edad. Además, en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 4-12 semanas de edad no se mostró un aumento significativo en la permeabilidad de la pared vascular evaluada usando GD albúmina (aumento en Npx50 de entre el 3 % y el 30 %, en comparación con ratones de control; figura 4A).

La figura 4 muestra un aumento de la permeabilidad endotelial en la arteria braquiocefálica en ratones ApoE/LDLR_{-/-}. El número de píxeles alrededor de la luz de BCA para los que T_1 ha cambiado en más del 50 % (Npx50) después de usar el agente de contraste de gadolinio de unión a albúmina (A: GD-albúmina) o Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) encapsulada en liposomas (B: GD-liposoma) se expresan como un porcentaje del control en ratones ApoE/LDLR_{-/-} (columnas blancas) de diferentes edades: Ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 4 semanas de edad (ApoE_4W, n = 4), ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 6 semanas de edad (ApoE_6W, n = 4), ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 8 semanas de edad (ApoE_8W, n = 6), ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 12 semanas de edad (ApoE_12W, n = 5) y ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 28 semanas de edad (ApoE_28W, n = 6). El control son ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad (C57_8W, n = 6, columnas negras).

Progresión de un deterioro de la respuesta dependiente del endotelio a la administración de acetilcolina en la BCA y la aorta abdominal (AA) en ratones ApoE/LDLR_{-/-}.

Para evaluar la sensibilidad de la detección de disfunción endotelial usando el nuevo agente de contraste, que es una invención, también se evaluó la función endotelial alterada en ratones ApoE/LDLR_{-/-} mediante otras técnicas basadas en IRM; detección de la respuesta dependiente del endotelio a la acetilcolina (figura 5) y la medición del aumento del flujo después de la oclusión de vasos a corto plazo (FMD, figura 6). Como se describe en la publicación reciente de los inventores (22), la respuesta dependiente del endotelio a la acetilcolina (Ach, figura 5B) en la aorta abdominal (AA) es el método *in vivo* más sensible para detectar cambios en el fenotipo endotelial. La administración intraperitoneal de Ach dio como resultado la detección de una respuesta funcional de la AA significativamente deteriorada en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 4 semanas de edad (cambio de volumen de la AA: aproximadamente el 23 % en comparación con aproximadamente el 34 % en ratones de control). Se observó una progresión adicional del deterioro de la respuesta de la AA a Ach en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 6-8 semanas de edad y como vasoconstricción paradójica en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 12 y 28 semanas de edad (cambio en el volumen de la AA: aproximadamente -8 % y -23 %, respectivamente). Los cambios en la función endotelial de la BCA, descritos como vasodilatación dependiente del endotelio alterada en respuesta a Ach, solo se observaron en ratones de 12 semanas de edad (cambios de volumen: aproximadamente el 2 %, figura 5A). La respuesta de la BCA a Ach en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 4 a 8 semanas de edad permaneció sin cambios (cambios en el volumen de la BCA: aproximadamente el 10 %) y fue comparable a la

respuesta vasodilatadora normal observada en los ratones de control de 8 semanas de edad (cambio de volumen en la BCA: 11,26 %). Además, la alteración de la respuesta dependiente del endotelio al aumento en el flujo después de la oclusión de vasos a corto plazo (FMD) no se observó antes que en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 12 semanas de edad (cambio de volumen en la FA: aproximadamente el 16 % en comparación con aproximadamente el 34 % en ratones de control, figura 6). La respuesta de FMD en ratones ApoE/LDLR_{-/-} más jóvenes, de 8 semanas de edad, permaneció sin cambios, en comparación con los ratones de control (cambio de volumen de la FA: aproximadamente el 31 %).

Estos experimentos muestran claramente que la evaluación de los cambios en la permeabilidad endotelial usando el agente de contraste liposomal, que es una invención, permite la detección de cambios funcionales en el endotelio vascular en una etapa temprana similar del desarrollo de disfunción endotelial como la evaluación de la respuesta dependiente del endotelio a la administración de Ach en la aorta abdominal, que era el método más sensible para la detección de cambios en el fenotipo endotelial, en los estudios previos de los inventores (22). La detección de cambios funcionales en la BCA, así como en la respuesta de FMD, está última es el método de referencia en la evaluación de la función endotelial en afecciones clínicas (12, 13), fue posible en una etapa posterior del desarrollo de disfunción endotelial, en comparación con la evaluación usando un agente de contraste liposomal que es un objeto de una invención.

La figura 5 muestra la progresión de la respuesta dependiente del endotelio alterada a la administración de acetilcolina en la arteria braquiocefálica y la aorta abdominal en ratones ApoE/LDLR_{-/-}. Cambios en el volumen diastólico final de la arteria braquiocefálica (A: BCA-ACH) y la aorta abdominal (B: AA-ACH) 25 minutos después de la administración de acetilcolina en ratones ApoE/LDLR_{-/-} (columnas blancas) de diferentes edades: Ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 4 semanas de edad, ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 6 semanas de edad, ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 8 semanas de edad, ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 12 semanas de edad, ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 28 semanas de edad en comparación con ratones C57BL/6 de control de 8 semanas de edad (C57_8W, n = 4, columnas negras). Estadísticas: ANOVA unidireccional seguida de la prueba *post hoc* de Tukey (la normalidad se evaluó usando la prueba de Shapiro-Wilk); *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

La figura 6 muestra la progresión de la respuesta dependiente del endotelio alterada a un aumento en el flujo después de la oclusión de vasos a corto plazo (FMD) en la arteria femoral (FA) en ratones ApoE/LDLR_{-/-} de diferentes edades: Ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 8 semanas de edad (ApoE_8W, n = 6), ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 23 semanas de edad (ApoE_12W, n = 6) y ratones ApoE/LDLR_{-/-} de 28 semanas de edad (ApoE_28W, n = 5), en comparación con los ratones C57BL/6 de control de 8 semanas de edad (C57_8W, n = 5, columnas negras). Estadísticas: ANOVA unidireccional seguida de la prueba *post hoc* de Tukey (la normalidad se evaluó usando la prueba de Shapiro-Wilk); *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

Referencias

- Kim HK, Lee GH, Chang Y (2018) Gadolinium as an MRI contrast agent. *Future Med Chem* 10, 639-661.
- Ibrahim MA, Dublin AB (2018) Magnetic Resonance Imaging (MRI), Gadolinium. En *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- de Smet M, Heijman E, Langereis S *et al.* (2011) Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: An *in vivo* proof-of-concept study. *J Control Release* 150, 102-110.
- Le Fur M, Caravan P (2018) The biological fate of gadolinium-based MRI contrast agents: a call to action for bioinorganic chemists. *Metallomics*.
- Lux J, Sherry AD (2018) Advances in gadolinium-based MRI contrast agent designs for monitoring biological processes *in vivo*. *Curr Opin Chem Biol* 45, 121-130.
- Glogard C, Stensrud G, Hovland R *et al.* (2002) Liposomes as carriers of amphiphilic gadolinium chelates: the effect of membrane composition on incorporation efficacy and *in vitro* relaxivity. *Int J Pharmaceut* 233, 131-140.
- Erdogan S, Medarova ZO, Roby A *et al.* (2008) Enhanced tumor MR imaging with gadolinium-loaded polychelating polymer-containing tumor-targeted liposomes. *J Magn Reson Imaging* 27, 574-580.
- Jin YQ, Zhang NP, Li CL *et al.* (2017) Nanosystem composed with MSNs, gadolinium, liposome and cytotoxic peptides for tumor theranostics. *Colloid Surface B* 151, 240-248.
- Nitta N, Takakusagi Y, Kokuryo D *et al.* (2018) Intratumoral evaluation of 3D microvasculature and nanoparticle distribution using a gadolinium-dendron modified nanoliposomal contrast agent with magnetic resonance microimaging. *Nanomed-Nanotechnol* 14, 1315-1324.
- Franses JW, Drosu NC, Gibson WJ *et al.* (2013) Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer

inflammation and metastasis. *Int J Cancer* 133, 1334-1344.

11. Walczak M, Suraj J, Kus K *et al.* (2015) Towards a comprehensive endothelial biomarkers profiling and endothelium-guided pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 67, 771-777.

12. Frolov M, Drozd A, Kowalewska A *et al.* (2015) Comprehensive assessment of vascular health in patients; towards endothelium-guided therapy. *Pharmacol Rep* 67, 786-792.

13. Raitakari OT, Celermajer DS (2000) Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol* 50, 397-404.

14. Phinikaridou A, Hua N, Pham T *et al.* (2013) Regions of low endothelial shear stress colocalize with positive vascular remodeling and atherosclerotic plaque disruption: an *in vivo* magnetic resonance imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging* 6, 302-310.

15. van Bochove GS, Straathof R, Krams R *et al.* (2010) MRI-determined carotid artery flow velocities and wall shear stress in a mouse model of vulnerable and stable atherosclerotic plaque. *MAGMA* 23, 77-84.

16. Davignon J, Ganz P (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109, III27-32.

17. Bar A, Skorka T, Jasinski K *et al.* (2016) Retrospectively gated MRI for *in vivo* assessment of endothelium-dependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. *Nmr Biomed* 29, 1088-1097.

18. Morawski AM, Winter PM, Crowder KC *et al.* (2004) Targeted nanoparticles for quantitative imaging of sparse molecular epitopes with MRI. *Magn Reson Med* 51, 480-486.

19. Ishibashi S, Herz J, Maeda N *et al.* (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4431-4435.

20. Wang J, Qiu M, Kim H *et al.* (2006) T1 measurements incorporating flip angle calibration and correction *in vivo*. *J Magn Reson* 182, 283-292.

21. Bar A, Skorka T, Jasinski K *et al.* (2015) MRI-based assessment of endothelial function in mice *in vivo*. *Pharmacol Rep* 67, 765-770.

22. Bar A, Targosz-Korecka M, Suraj J *et al.* (2019) Degradation of Glycocalyx and Multiple Manifestations of Endothelial Dysfunction Coincide in the Early Phase of Endothelial Dysfunction Before Atherosclerotic Plaque Development in Apolipoprotein E/Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *J Am Heart Assoc.* 19 de marzo de 2019;8(6):e011171

23. Phinikaridou A, Andia MA *et al.* (2016) Increased Vascular Permeability Measured With an Albumin-Binding Magnetic Resonance Contrast Agent Is a Surrogate Marker of Rupture-Prone Atherosclerotic Plaque. *Circ Cardiovasc Imaging* 9(12), 1-12.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agente de contraste de IRM para su uso en un método de diagnóstico de cambios en el endotelio de vasos sanguíneos, en forma de una suspensión acuosa que contiene como agente de contraste hidrófilo Gd-dietilentriaminopentaacetato-bis(metilamida) encapsulado dentro de liposomas monocapa de 50 nm a 200 nm de tamaño, en donde la membrana lipídica de liposomas está hecha de una mezcla que contiene: fosfatidilcolina, colesterol y polietilenglicol unidos covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina (PEG-PE).
- 10 2. El agente de contraste para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la razón molar de agente de contraste con respecto a componentes lipídicos es de 1:1000 a 5:1, preferiblemente de 1:50 a 2:1.
- 15 3. El agente de contraste para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque la razón molar de lípidos con respecto a colesterol en la membrana lipídica es preferiblemente de 10:1 a 5:1.
4. El agente de contraste para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los liposomas monocapa contienen PEG2000-PE en una cantidad de hasta el 10 % en moles de todos los componentes anfífilos.
- 20 5. El agente de contraste para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque contiene al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que comprende: caldiamida, hidróxido de sodio, sustancia osmóticamente activa, antioxidante, y/o una mezcla de los mismos.
- 25 6. El agente de contraste para su uso según la reivindicación 5, caracterizado porque la sustancia osmóticamente activa contiene una sustancia seleccionada del grupo que comprende solución salina, disolución de monosacárido o disacárido y/o una mezcla de los mismos.
- 30 7. El agente de contraste para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la concentración del agente de contraste hidrófilo en la fase acuosa de la suspensión es de 1 a 200 g/l.

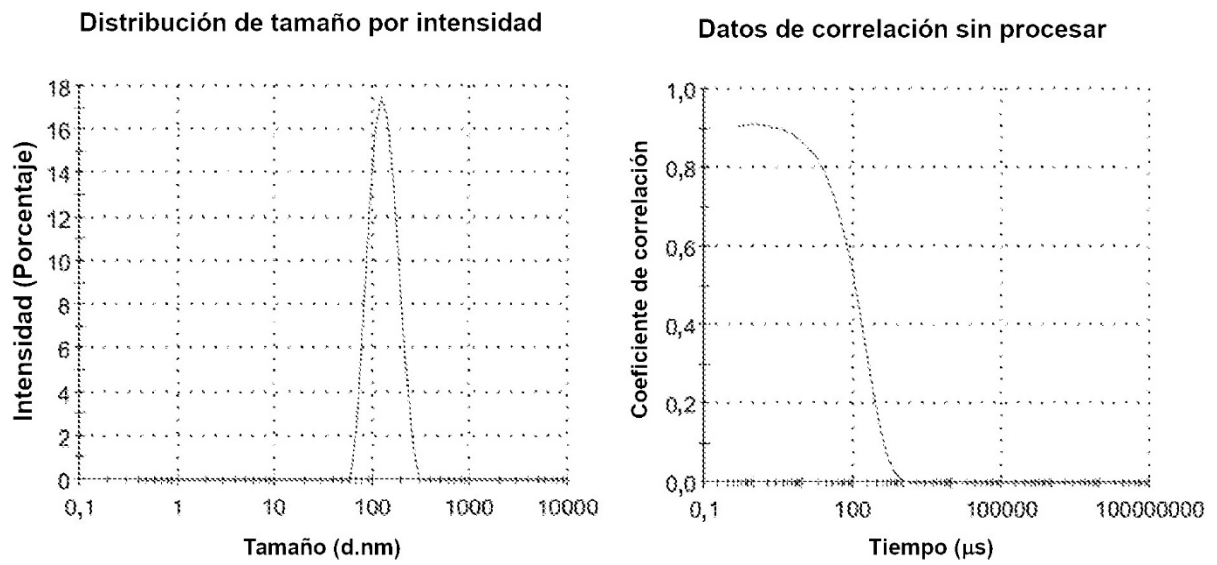


Fig. 1

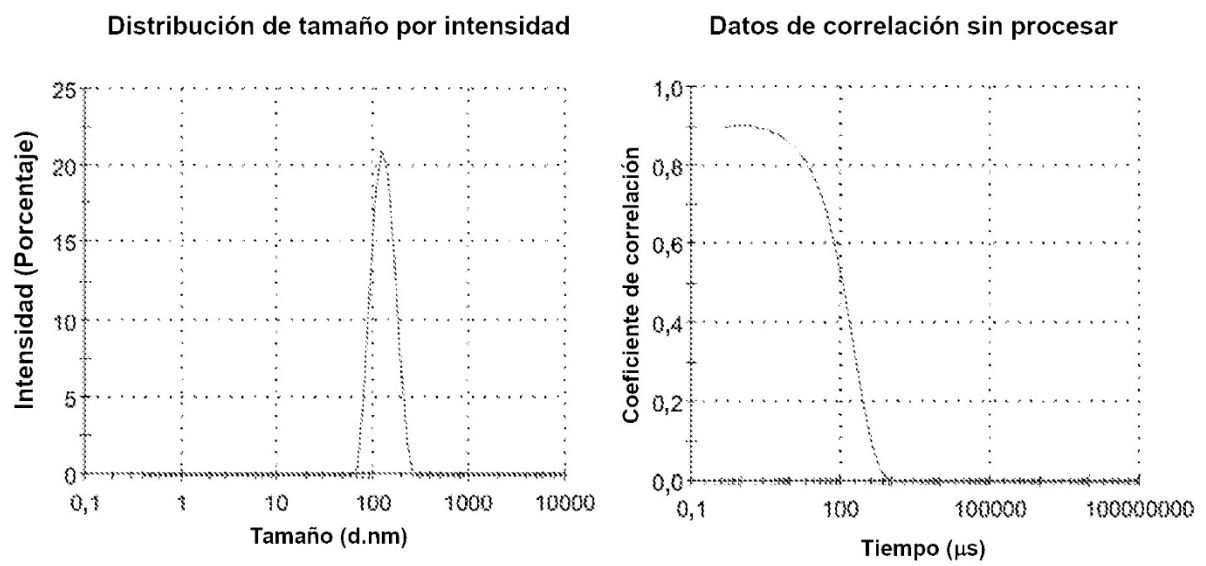


Fig. 2

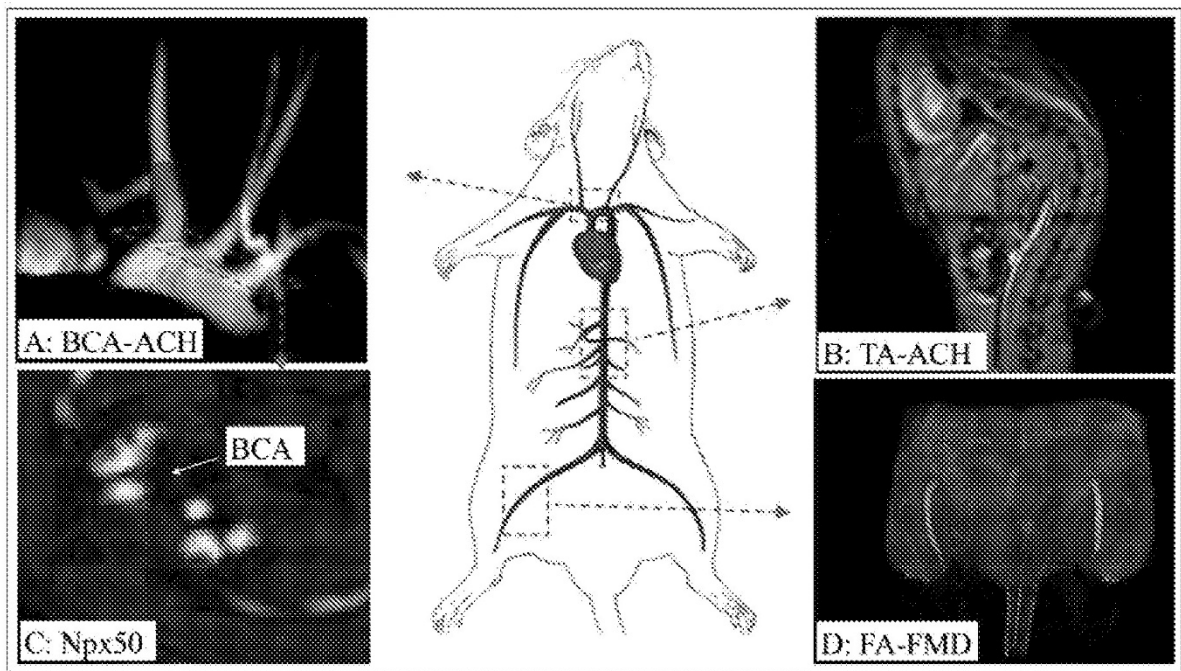


Fig. 3

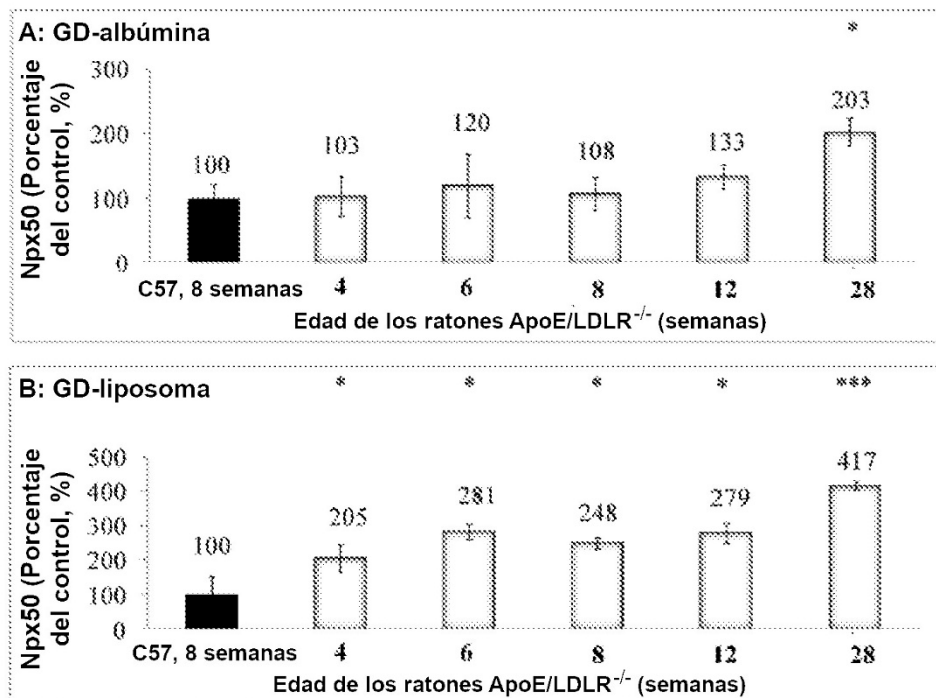


Fig. 4

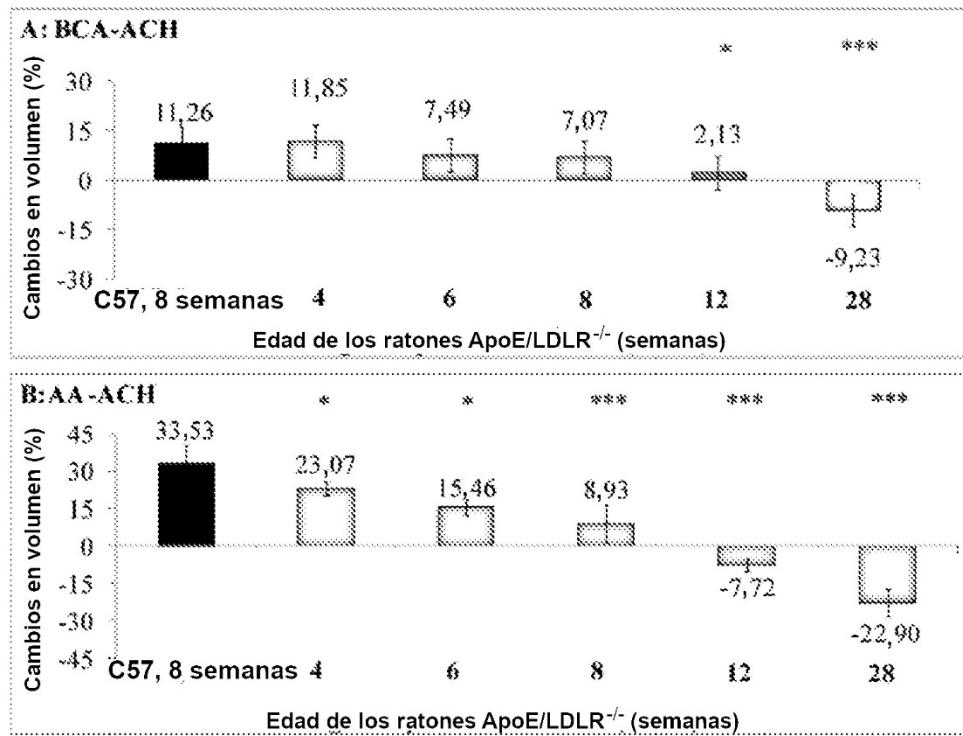


Fig. 5

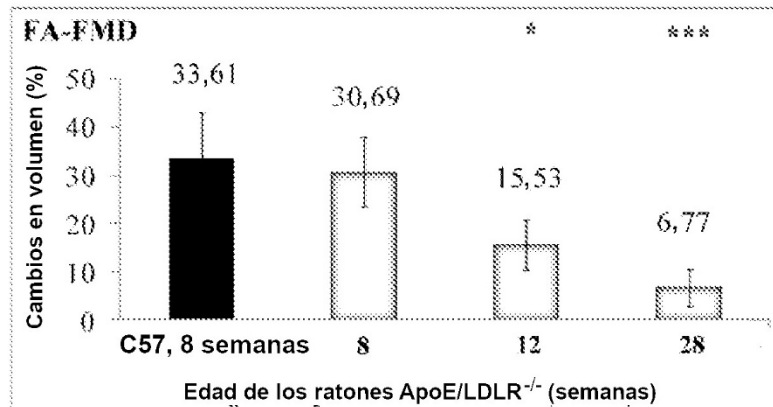


Fig. 6