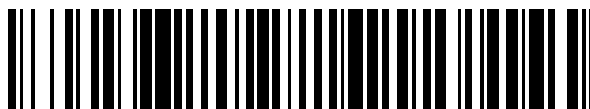


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 026**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)
A61B 1/00 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
A61K 47/58 (2007.01)
A61B 1/313 (2006.01)
A61B 1/04 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 21/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2012 PCT/JP2012/072640**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13035750**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2012 E 12829505 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2774625**

54 Título: **Sonda molecular fluorescente de tipo polímero**

30 Prioridad:

05.09.2011 JP 2011193237

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

26.07.2017

73 Titular/es:

**MAEDA, HIROSHI (100.0%)
21-24 Kotoh 3-chome Higashi-ku Kumamoto-shi
Kumamoto 862-0909, JP**

72 Inventor/es:

**MAEDA, HIROSHI;
HASHIZUME, MAKOTO;
FANG, JUN;
NAKAMURA, HIDEAKI;
QIN, HAIBO;
HACKBARTH, STEFFEN y
MURATA, MASAHARU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 627 026 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

Sonda molecular fluorescente de tipo polímero

5 Campo técnico

La presente solicitud se registra reivindicando la prioridad de la Solicitud de Patente Japonesa No. 2011-193237.

10 La presente invención se refiere a sondas moleculares fluorescentes para implementar la detección fluorescente (visualización) de tumores o, además de la detección fluorescente, tratamiento fotodinámico, por ejemplo, utilizando endoscopio o laparoscopio fluorescente.

Antecedentes de la técnica

15 El cáncer (tumor) es la enfermedad número uno como causa de muerte en Japón. Con la excepción de los cánceres de útero y gástrico en los primeros estadios, en los que, a través de operación quirúrgica, hay bastantes casos de éxito. Aunque se conocen resultados relativamente buenos en los casos de leucemia linfocítica mediante el uso de quimioterapia, en muchos otros tipos de cáncer, como por ejemplo, cáncer de hígado metastásico, cánceres de pulmón, de mama, de páncreas, de esófago, de vejiga/colangio carcinoma, riñón, próstata, ovario, cerebro, así como
20 cánceres metastásicos como carcinoma pleural y abdominal, se ha conseguido avanzar muy poco en los últimos 30 años. (Documento diferente a patente 1: Fortune (2004), publicación marzo).

La detección temprana en el Estadio 1 seguida de una cirugía curativa podría suponer un mejor resultado terapéutico como el observado en cáncer gástrico, con la excepción del cáncer de hígado, cuya etiología es una
25 infección crónica de virus de la hepatitis.

Dadas las circunstancias, los autores de la presente invención han llevado a cabo una investigación en relación con un método de entrega de fármacos macromoleculares (o poliméricos) de forma selectiva a los tumores y han descubierto un nuevo concepto de efecto-EPR (efecto de permeabilidad y retención aumentada) y lo han notificado
30 (Documento diferente a patente 2: Cancer Research, 1986 (12) 46, 6787-6392). Asimismo, los autores de invención han desarrollado y notificado agentes terapéuticos contra el cáncer macromoleculares tales como SMNCS, el primer agente anticanceroso de unión macromolecular, así como otros fármacos antitumorales micelares macromoleculares [Documento de patente 1: WO 2004/103409; Documento de patente 2: WO 2006/112361; Documento diferente a
35 patente 3: Adv. Drug Deliv. Rev. 6, 181-202 (1991); Documento diferente a patente 4: J. Control. Release, 74, 47-61 (2001); y Documento diferente a patente 5: Bioconj. Chem. 21, 797-802 (2010), etc.]

Documentos de la técnica anterior**Documentos de patente**

40 Documento de patente 1: WO 2004/103409
Documento de patente 2: WO 2006/112361

Documentos diferentes a patente

45 Documento diferente a patente 1: Fortune 2004, marzo
Documento diferente a patente 2: Cancer Research. 1986 (12), 46, 6787-6392.
Documento diferente a patente 3: Adv. Drug Deliv. Rev. 6, 151-202 (1991)
Documento diferente a patente 4: J. Control. Release, 74, 47-61 (2001)
50 Documento diferente a patente 5: Bioconj. Chem. 21, 797-802 (2010)

Sumario de la invención**Problema que se resuelve con la invención**

55 El objeto de la presente invención es desarrollar sondas moleculares fluorescentes macromoleculares para una detección (visualización) fluorescente eficiente de tumores o para la implementación de detección fluorescente y tratamiento fotodinámico, por ejemplo, mediante el uso de endoscopio de fluorescencia o laparoscopio fluorescente, así como un nuevo complejo útil como dichas sondas moleculares fluorescentes.

Medios para resolver el problema

Los autores de la presente invención han realizado una investigación rigurosa para resolver el problema mencionado y han completado la presente invención. En concreto, han logrado desarrollar sondas moleculares fluorescentes (FL) macromoleculares que pueden presentar fluorescencia tras la irradiación de luz con una longitud de onda específica,
65 y sondas moleculares fluorescentes/fotosensibilizadoras (FL/PS) macromoleculares que pueden presentar

fluorescencia y generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) por irradiación de luz.

La presente invención incluye lo siguiente:

- 5 [1] Una sonda molecular fluorescente macromolecular para detección fluorescente de tumor que comprende un complejo que comprende una molécula fluorescente y una macromolécula (o polímero) biocompatible, tal como se define en las reivindicaciones.
- [2] La sonda molecular fluorescente macromolecular según el punto [1] anterior, que es para la detección fluorescente de tumor mediante el uso de un endoscopio fluorescente o un laparoscopio fluorescente.
- 10 [3] La sonda molecular fluorescente macromolecular según el punto [1] anterior, que se utiliza como un agente antitumoral para tratamiento fotodinámico.
- [4] Un complejo que comprende una molécula fluorescente y una macromolécula biocompatible, donde la macromolécula biocompatible se selecciona entre copolímeros de hidroxipropilmetacrilamida, copolímeros de hidroxipropilmetacrilamida en los que se ha introducido un grupo funcional y mezclas de los mismos.
- 15 [5] Se describe asimismo en el presente documento un complejo que comprende una molécula fluorescente y una macromolécula biocompatible, donde la molécula fluorescente se selecciona entre rosa de bengala, verde de indocianina, ftalocianidina unida a Zn, porfirinas, feoforbida unida a Zn, azul de metileno, Foscan unido a Zn, ortofenantrolina de Zn, Fenantrolina de Cu, acriflavina, acrinol, diamina acridina, naranja de acridina, tetraciclina, aminofluoresceína, tetrametilrodamina, aminorodamina, diclorofluoresceína y mezclas de los mismos, y
- 20 la macromolécula biocompatible seleccionada entre copolímeros de estireno-ácido maleico, copolímeros de estireno-ácido maleico que tienen una cadena lateral de ácido maleico multi-funcionalizada, copolímero de hidroxipropilmetacrilamida, albúmina de suero, transferrina, inmoglobulina, α 1-acido glucoproteína, α 1-antitripsina, gelatina solubilizada, polialcohol vinílico, polivinil pirrolidona y mezclas de los mismos.
- 25 [6] Se describe asimismo en el presente documento el complejo según los puntos anteriores [4] o [5], donde la molécula fluorescente se selecciona entre rosa de bengala, azul de metileno, foscan unido a Zn, acridina, riboflavinas, clorofila, porfirinas y mezclas de los mismos.
- [7] Se describe asimismo el complejo según el punto [5] anterior, donde la macromolécula biocompatible se selecciona entre copolímeros de estireno-ácido maleico, copolímeros de estireno-ácido maleico que tienen una
- 30 cadena lateral de ácido maleico multi-funcionalizada y mezclas de los mismos.
- [8] El complejo según cualquiera de los puntos [4] a [7] anteriores, donde la molécula fluorescente está unida no covalentemente a la macromolécula biocompatible, y el complejo está en forma de micela en la que la molécula fluorescente está encapsulada en la macromolécula biocompatible.
- [9] El complejo según cualquiera de los puntos [4] a [7] anteriores, donde la molécula fluorescente está unida
- 35 covalentemente a la macromolécula biocompatible a través de un espaciador.
- [10] El complejo según cualquiera de los puntos [4] a [7] anteriores, donde la molécula fluorescente está unida covalentemente a la macromolécula biocompatible sin un espaciador.
- [11] Se divulga además un método para producir el complejo según el punto [7] anterior, que comprende:
- 40 (a) solubilizar un copolímero de estireno-ácido maleico (SMA) o su derivado en un agua alcalina con un pH por encima de 8,
- (b) añadir una molécula fluorescente a la solución obtenida en (a) anterior, y
- (c) disminuir el pH de la solución de la mezcla obtenida en (b) anterior por debajo de pH 5 con un ácido para
- 45 hacer precipitar el complejo de SMA-molécula fluorescente.
- [12] Se divulga también un método para producir el complejo según el punto [7] anterior que comprende:
- (a) unir un radical maleico o un radical anhídrido maleico de un copolímero de estireno-ácido maleico (SMA) o su derivado a un grupo funcional de un espaciador, que es reactivo con el radical del SMA o su derivado, y
- 50 (b) unir un grupo funcional de la parte espaciadora del producto obtenido en (a) anterior al grupo funcional de una molécula fluorescente, que es reactiva con el grupo funcional de la parte espaciadora.
- [13] Se describe además un método para producir el complejo según el punto [7] anterior que comprende:
- 55 (a) la reacción del radical maleico de un copolímero estireno-ácido maleico (SMA) o su derivado con un grupo funcional de una molécula fluorescente para unir el radical del SMA o su derivado al grupo funcional de la molécula fluorescente.

Efectos de la invención

- 60 De acuerdo con la presente invención, es posible conferir capacidad de direccionamiento a tumor a moléculas fluorescentes (FL) conocidas y detectar así tumores diminutos de muy pocos mm de diámetro por fluorescencia. Concretamente, al irradiar una sonda molecular fluorescente con una longitud de onda de luz de excitación utilizando una fuente luminosa de un endoscopio, se hace posible la detección específica (visualización) de tumores. Por otra
- 65 parte, cuando la molécula fluorescente es una molécula fotosensibilizadora (PS), la molécula puede generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) por irradiación de una luz de excitación para eliminar células de tumor (tejido) (por tanto, un

tratamiento fotodinámico).

Por consiguiente, sobre la base de la presente invención, al introducir luz de irradiación que tiene una luz de excitación adecuada en la cavidad del organismo a través del endoscopio, laparoscopio o cistoscopio, es posible producir fluorescencia en el área del tumor e implementar de esta forma una detección altamente sensible y el tratamiento de tumores al mismo tiempo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta un diagrama de flujo de un método para preparar una sonda molecular fluorescente macromolecular [Método I].

La Figura 2 presenta un esquema de reacción de un método para preparar sondas moleculares fluorescentes macromoleculares [Método II].

La Figura 3 presenta la detección de tumor de alta sensibilidad utilizando la sonda molecular fluorescente macromolecular que se describe en el presente documento.

La Figura 4 presenta un mapa conceptual de la generación de fluorescencia y oxígeno singlete [1O_2] tras la interrupción de la estructura micelar.

La Figura 5 presenta características espectroscópicas (espectro de absorción UV/visible (A) y espectros fluorescentes (B)) de micelas SMA que encapsulan azul de metileno (MB) (micela SMA-MB).

La Figura 6 presenta características espectroscópicas (espectro de absorción UV/visible (A) (a,b) y espectro de fluorescencia (B)) de micelas SMA que encapsulan verde de indocianina (ICG) (micela SMA-ICG).

La Figura 7 presenta las características espectroscópicas (espectro de absorción UV/visible (A) (a,b) y espectro de fluorescencia (B)) de micelas SMA que encapsulan rosa de bengala (RB).

La Figura 8 presenta las características espectroscópicas (espectro de absorción UV/visible (A) (a,b) y espectro de fluorescencia (B)) de micelas SMA que encapsulan Zn-Foscan.

La Figura 9 presenta los espectros de absorción UV/visible (en DMSO) o (a) un complejo unido covalentemente de protoporfirina (PP)-HPMA (HPMA-PP) y PP libre y (b) un complejo unido covalentemente de protoporfirina Zn (ZnPP)-HPMA (HPMA-ZnPP) y ZnPP libre, y espectros de fluorescencia (en solución acuosa) de (c) HPMA-PP y PP libre. HPMA-PP existe como micelas en solución acuosa y tiene poca fluorescencia. No obstante, presenta fluorescencia cuando la estructura micelar se desintegra en presencia de 2% de Tween 20. (d) presenta los espectros de fluorescencia de HPMA-ZnPP. HPMA-ZnPP tiene poca fluorescencia, pero presenta fluorescencia cuando se desintegra la estructura micelar en presencia de 0,5 % de Tween 20.

La Figura 10 presenta la distribución de tamaño según se revela por la dispersión de luz dinámica de (a) micelas HPMA-PP y (b) micelas HPMAZnPP.

La Figura 11 presenta la cinética en la sangre de (a) PP libre y HPMA-PP y (b) ZnPP libre y HPMA-ZnPP. HPMA-PP o HPMA-ZnPP presentan un nivel de concentración varias veces más alto que PP libre o ZnPP libre en el AUC (área bajo la curva de concentración-tiempo del fármaco en plasma) y por tanto el primero es más eficaz que el segundo.

La Figura 12 presenta un perfil de generación de oxígeno singlete [1O_2] con rosa de bengala tras irradiación de luz.

La Figura 13 presenta la actividad de eliminación de células tumorales de micelas SMA-MB en cáncer de páncreas humano, células PC 1.0.

Descripción de las realizaciones

La sonda molecular fluorescente macromolecular de la presente invención comprende un complejo que comprende una molécula fluorescente (FL) (en adelante denominada "molécula FL") y una macromolécula (o polímero) biocompatible, que es capaz de detectar (o visualizar) por fluorescencia tumores mediante el uso de un endoscopio de fluorescencia o un laparoscopio fluorescente. Asimismo, cuando la molécula-FL también es una molécula fotosensibilizadora (en adelante denominada "molécula FL/PS") puede generar un oxígeno singlete [1O_2] tras la irradiación de luz, es útil para implementar un tratamiento fotodinámico además de la detección fluorescente del tumor.

Las moléculas fluorescentes de la invención se describen en las reivindicaciones.

La molécula fluorescente (FL) mencionada puede emitir luz fluorescente tras la irradiación de luz de una longitud de onda específica. Se describen en el presente documento por ejemplo rosa de bengala, verde de indocianina (ICG), ftalocianidina unida a Zn, porfirinas, feoforbida unida a Zn, azul de metileno, foscan unido a Zn, Zn ortofenantrolina, Cu Fenantrolina, acriflavina, acrinol, amina acridina, acridina, naranja de acridina, tetraciclina, aminofluoresceína, tetrametilrodamina, aminorodamina, diclorofluoresceína y protoporfirina unida a Zn (ZnPP), aclarrubicina, doxorubicina, pirarubicina y similares. Entre ellos se prefieren rosa de bengala, verde de indocianina (ICG), azul de metileno, Foscan unido a Zn, protoporfirina unida a Zn y tetrametilrodamina.

Los complejos de la invención comprenden protoporfirina unida a Zn (ZnPP), pirarubicina y mezclas de los mismos.

Entre las moléculas FL mencionadas, se prefieren moléculas fotosensibilizadoras (PS) (moléculas FL/PS) que

pueden generar oxígeno singlete, un tipo de las especies reactivas del oxígeno, tras irradiación con luz. Entre los ejemplos de la molécula FL/PS se incluyen rosa de bengala, azul de metileno, foscan unido a Zn, protoporfirina unida a Zn (ZnPP), aclarrubicina, doxorubicina, pirarrubicina, y similares. Entre ellos, son de preferencia rosa de bengala, azul de metileno, foscan unido a Zn, y protoporfirina unida a Zn.

Los complejos de la invención comprenden protoporfirina unida a Zn (ZnPP), pirarrubicina, y mezclas de los mismos.

En la presente invención, las moléculas FL (incluyendo moléculas FL/PS) se pueden utilizar en solitario o como una mezcla de las mismas.

La macromolécula biocompatible mencionada se refiere a una macromolécula que no tiene antigenicidad ni inmunogenicidad, no induce alergia, convulsión, ni similares, no tiene efecto sobre la coagulación de la sangre ni en la activación de complemento, no se acumula en el organismo durante un período de tiempo prolongado y no es tóxica, es útil para convertir la molécula FL en una macromolécula (que tiene un peso molecular no inferior a varias decenas de miles) que se puede concentrar altamente dentro del tumor en virtud del efecto EPR de la misma. Entre los ejemplos de macromoléculas biocompatibles se incluyen copolímeros de estireno-ácido maleico (SMA), SMA que tiene una cadena lateral de ácido maleico multi-funcionalizada, polímeros de hidroxipropilmetacrilamida (HPMA) y HPMA en el que se ha introducido un grupo funcional, albúmina de suero, transferrina, inmunoglobulina, α 1-acido glucoproteína, α 1-antitripsina, polietilén glicol, polialcohol vinílico, quitina/quitosano, polivinilpirrolidona, gelatina soluble, poliaminoácidos (p.ej. poliácido aspártico) y similares. Entre ellos, son preferentes SMA, SMA que tiene una cadena lateral de ácido maleico multi-funcionalizada, HPMA, HPMA en el que se ha introducido un grupo funcional y albúmina de suero.

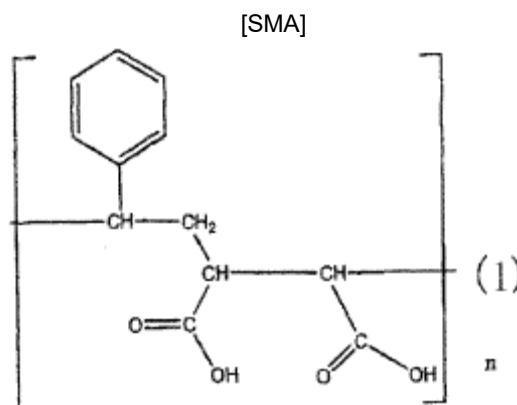
Los complejos de la invención comprenden HPMA, HPMA en el que se ha introducido un grupo funcional o mezclas de los mismos.

En la presente invención, la macromolécula biocompatible se puede utilizar en solitario o como una mezcla de las mismas. Cuando se utiliza una mezcla de dos o más macromoléculas biocompatibles, no tienen por qué estar conjugadas necesariamente todas las macromoléculas biocompatibles con la molécula FL, pudiendo estar conjugada únicamente una macromolécula biocompatible específica con las moléculas FL. Asimismo, pueden estar conectadas entre sí dos macromoléculas biocompatibles (por ejemplo, tal como se describe más adelante, SMA-albúmina, SMA-transferrina, HPMA-albúmina, HPMA-transferrina y similares).

Los complejos de la invención se definen en las reivindicaciones.

El copolímero estireno-ácido maleico (SMA) es un copolímero que comprende generalmente una unidad que se repite, tal como se muestra en la fórmula (1) a continuación, y comprenden una unidad de estireno y una unidad de ácido maleico (o anhídrido maleico) como unidad componente esencial. SMA se puede adquirir en el mercado o se puede sintetizar a través de un procedimiento de síntesis conocido. Generalmente, se obtiene por copolimerización de estireno y anhídrido maleico. En este caso, el radical del anhídrido maleico en SMA será un anhídrido, que se puede utilizar como tal o como la forma carboxilo libre por hidrólisis antes de su uso.

[Fórmula 1]



Entre los ejemplos del "SMA que tiene una cadena lateral de ácido maleico multi-funcionalizada" antes descritos, se incluyen aquellos que tienen una cadena lateral de ácido maleico con la que se conjuga albúmina o transferrina; aquellos que tienen una cadena lateral de ácido maleico cuyo grupo carboxilo está alquilado, como por ejemplo, etilado, butilado, modificado con butil celosolve o similares; aquellos que tienen una cadena lateral de ácido maleico

cuyo grupo carboxilo está amidado, aminoetilado, trihidroaminoetilado, hidroxiaminometanizado, mercaptoetilaminado, polietilenglicolado (PEG) o amino acidulado (p.ej., lisina, cisteína, otros conjugados con aminoácido y similares); y aquellos que tienen una cadena lateral de ácido maleico modificada con hidracina.

- 5 El SMA que tiene una cadena lateral de ácido maleico con el que se conjuga albúmina o transferrina incluye SMA-albúmina y SMA transferrina.

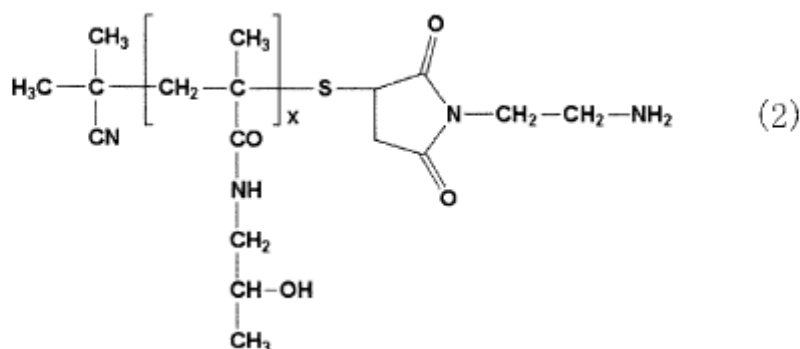
El SMA que tiene una cadena lateral de ácido maleico cuyo grupo carboxilo está butilado o modificado con butil celosolve incluye SMA Resins® (Sartomer Inc., Estados Unidos).

- 10 El polímero hidroxipropilmetacrilamida (HPMA) mencionado comprenden una unidad que se repite que se muestra entre corchetes [] de fórmula (2) a continuación. HPMA tiene una biocompatibilidad excelente y está exento de capacidad inmunogénica o para inducir inflamación, por lo que se puede utilizar de manera ventajosa como componente del complejo de la presente invención.

- 15 El HPMA utilizado en la presente invención se puede adquirir de fuentes comerciales o se puede sintetizar a través de un método conocido. En general, se puede sintetizar por polimerización de radicales convencional utilizando un monómero de hidroxipropilacrilamida en dimetilacetamida como disolvente utilizando AIBN (2,2'-azobisisobutironitrilo) como iniciador de la reacción de polimerización a 70 °C por ejemplo.

20 [Fórmula 2]

[HPMA]

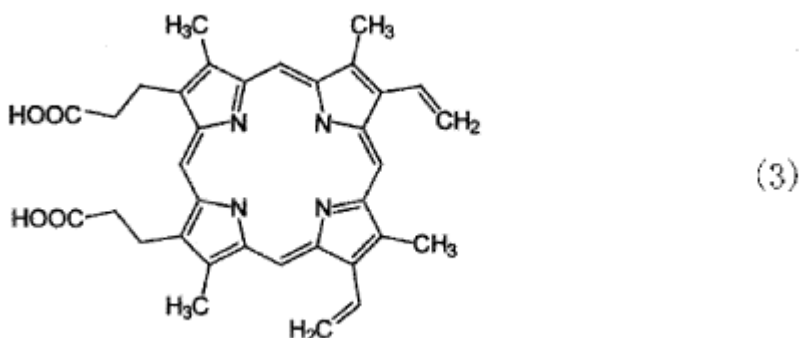


25

[Fórmula 3]

[Protoporfirina]

30



- 35 Entre los ejemplos de "HPMA en el que se ha introducido un grupo funcional" se incluyen aquellos que tienen un grupo amino terminal tal como se muestra en la fórmula (2) anterior; derivados de los mismos en cuyo grupo carboxilo se introduce cualquier aminoácido o péptido, o hidracina; derivados de los mismos amidados, etilaminados, mercaptoetilaminados o trishidroximetanizados, y similares.

- 40 Estos derivados de HPMA se pueden preparar por ejemplo en agua o en un disolvente, de manera similar a la síntesis de péptidos convencional. Por ejemplo, se puede conjugar el derivado representado por la fórmula (2) anterior con la molécula FL o la molécula FL/PS o bien a través del grupo amino terminal o bien a través del grupo hidroxilo del grupo hidroxipropilo. Por ejemplo, cuando la molécula FL o la molécula FL/PS es protoporfirina [véase

formula 3 anterior], se puede hacer reaccionar cada uno, o los dos, radicales carboxilo de protoporfirina con un grupo(s) hidroxilo de HPMA empleando un agente de deshidratación/condensación convencional para formar un enlace amida o éster para dar el conjugado deseado (cf. Figura 9a, el enlace de la fórmula HPMA-PP insertada en ella es un enlace éster). El número de PP que se conjuga con HPMA no está limitado en particular.

El derivado HPMA que tiene un grupo amino terminal representado por la fórmula (2) mencionado se puede conjugar con la albúmina o transferrina a través del enlace amida formado desde el grupo amino del derivado y el grupo carboxilo de la albúmina o transferrina para dar un conjugado como HPMA-albúmina, HPMA-transferrina, y similares. Dichos conjugados se pueden utilizar para formar complejos con las moléculas fluorescentes (FL) de la presente invención.

Dependiendo del grado de polimerización, pueden estar disponibles variedades de SMA o HPMA con diferentes pesos moleculares. Sin embargo, preferentemente, el SMA que se utiliza según la divulgación del presente documento puede ser su trímero (aproximadamente 660 Da) frente a los que tienen un peso molecular de aproximadamente 40 kDa, siendo sobre todo preferente entre 800 y 2500. Como HPMA, son preferentes aquellos que tienen un peso molecular comprendido entre 1000 y 20000.

Los complejos que comprenden moléculas fluorescentes (FL) y la macromolécula biocompatible mencionados pueden producirse por ejemplo a través del [Método I] al [Método III], más adelante. Dependiendo de los métodos de producción, los complejos se clasifican en aquellos donde la molécula FL está unida covalentemente a la macromolécula biocompatible y aquellos donde las moléculas FL no están covalentemente unidas a las macromoléculas biocompatibles y forman una micela. Asimismo, los complejos que comprenden la molécula FL unida covalentemente a la macromolécula biocompatible se pueden agregar para formar una micela (p.ej., véase Figura 9b).

[Método I] Micela de copolímero estireno-ácido maleico [SMA] de moléculas FL

El Método I es para encapsular las moléculas FL en una micela de SMA. En este caso, las moléculas FL no están covalentemente unidas a SMA. La micela se puede preparar de acuerdo con el diagrama de flujo que se muestra en la figura 1.

En concreto, se solubiliza SMA, si contiene partes de anhídrido maleico, en forma intacta como tal, o tras la hidrólisis de las partes de anhídrido maleico o modificación, como por ejemplo alquil esterificación de las partes, según sea necesario, añadiendo una solución alcalina acuosa (es decir agua que contiene un álcali como por ejemplo, una solución acuosa de NaOH 0,1 M) para elevar el pH por encima de 8 (p.ej. pH en torno a 8,5). Se añade a esta solución molécula FL para su reacción con MA. Esta etapa de mezclado se lleva a cabo preferentemente con agitación.

En este sistema, la relación (p/p) entre SMA y la molécula FL no está limitada en particular, siempre y cuando se pueda encapsular la molécula FL en una micela, si bien, por ejemplo, la molécula FL puede constituir entre 1 y 80 partes (p/p) por cada 100 partes de SMA. La temperatura y el tiempo de la etapa de mezclado (agitación) de SMA y la molécula FL no están limitados en particular, si bien, por ejemplo, la temperatura puede ser en torno a la temperatura ambiente (25°C) y el tiempo puede ser entre 1 y 2 horas.

A continuación, se acidula la mezcla añadiendo un ácido (p.ej., HCl 0,1 M) para disminuir el pH por debajo de 5 (p.ej., pH de aproximadamente 4,8). Como resultado, se pueden formar precipitados. Los precipitados obtenidos de esta forma se pueden recoger por centrifugación (p.ej. a 5000 rpm) y se puede descartar el sobrenadante. De esta manera, se puede obtener el complejo la molécula FL-SMA (micela).

Se puede someter el complejo obtenido (ppt) además a purificación, si es necesario. Los métodos de purificación no están limitados en particular y se puede llevar a cabo a través de métodos conocidos. Por ejemplo, el complejo (ppt) se puede purificar por repetición de los siguientes procedimientos: disolución en una solución alcalina acuosa a un pH de 7 a 8, seguido de diálisis, ultrafiltración y concentración. Asimismo, tras la purificación, se puede liofilizar el complejo.

A continuación, se explica con mayor detalle el procedimiento del Método I.

En primer lugar, se pesan 100 mg de copolímero SMA (o su derivado semi-butilado de éster alquílico, etc.) y se coloca en un vaso de precipitados de 200 ml, y se añaden de 30 a 60 ml de agua destilada y al mismo tiempo que se controla el pH con un medidor de pH, se añade lentamente NaOH 0,1 M con agitación y se eleva el pH a aproximadamente 8,5. A continuación, se añade a la mezcla 30 mg en total de un polvo de azul de metileno, partes alícuotas de 5 a 10 mg, al mismo tiempo que se agita. Después de agitar la mezcla durante 1 a 2 horas más a temperatura ambiente, se añade lentamente a la mezcla HCl 0,1 M para disminuir el pH a pH 4,8 o por debajo para dar una forma de micela de SMA de azul de metileno como precipitado. Cuando toda la micela de SMA-azul de metileno ha precipitado, se sigue centrifugando la solución (5000 rpm) para recoger los precipitados. A continuación, se suspenden los precipitados añadiendo 60 ml de 1 mM HCl con enfriamiento con hielo y se lava por centrifugación

(5.000 rpm) para recoger los precipitados. Se dispersan los precipitados en 300 ml de agua destilada y se lleva el pH de la dispersión a aproximadamente un pH neutro añadiendo gota a gota NaOH 0,1 M para solubilizar el precipitado completamente. Se somete la solución al sistema de filtrado molecular, Lab Scale TFF System (Millipore Ltd.) que tiene un tamaño molecular límite de 10 KDa, y se filtra/concentra a 30 ml a presión reducida. A continuación, se añaden al concentrado 400 ml de agua destilada, seguido de un procedimiento de diálisis/concentración en 40 ml dos veces y a continuación, se liofiliza el concentrado para obtener de 90 a 100 mg de polvo azul.

En los procedimientos anteriores, se pueden utilizar Foscan, verde de indocianina, rosa de bengala u otras moléculas fluorescentes en lugar de azul de metileno en la encapsulación de micela macromolecular.

[Método II] Producción de complejo que comprende molécula fluorescente y SMA, donde la molécula fluorescente está unida covalentemente con SMA.

El Método II consiste en unir el radical maleilo de SMA con la molécula fluorescente a través de un espaciador. En concreto, este método consiste en unir SMA a la molécula fluorescente covalentemente.

El espaciador mencionado no está limitado en particular siempre y cuando tenga un grupo funcional (p.ej. grupo amino, grupo carboxilo, grupo hidroxilo y similares) que sea reactivo con el radical ácido maleico o el radical anhídrido maleico y, al mismo tiempo, un grupo funcional (p.ej. un grupo amino, un grupo hidroxilo, y similares) que es reactivo con un grupo funcional de la molécula fluorescente, pero incluye etilendiamina, lisina, cisteína, ácido ϵ -amino caproico y similares.

La cantidad (relación molar) de espaciador utilizada es de 0,1 a 1,0 moles por cada 1 mol de los dos o más radicales de anhídrido maleico que existen en SMA.

En el método anterior, se conjuga un primer radical ácido maleico o radical anhídrido maleico de SMA con un grupo funcional del espaciador, que es reactivo con estos radicales (etapa (a)). En este punto, la temperatura y el tiempo no están limitados en particular, si bien, por ejemplo, la temperatura puede ser en torno a la temperatura ambiente (25 °C) y el tiempo puede ser toda la noche.

A continuación, se conjuga un grupo funcional de la parte espaciadora del producto que resulta de la etapa (a) anterior con un grupo funcional de la molécula fluorescente que es reactivo con el grupo funcional de la parte espaciadora (etapa (b)). La temperatura y el tiempo no están limitados en particular, si bien, por ejemplo, la temperatura puede ser de 0 °C a 80 °C, preferiblemente de 4 °C a 30 °C y el tiempo puede ser de 1 a 300 horas. El pH en la etapa (b) puede variar dependiendo del SMA, la molécula fluorescente y el espaciador que se utilice, pero puede ser por ejemplo de 8,5 a 9,0.

A continuación, se explica con mayor detalle el procedimiento del Método II.

Se muestra a modo de ejemplo un método en el que se utiliza L-lisina como espaciador y un marcado con FITC (Figura 2). En lugar de lisina, es posible utilizar L-arginina, L-histidina, diaminoetano, ácido ϵ -amino caproico o similares.

Se disuelve HCl de L-lisina (Lys) en 50 ml de NaHCO₃ 0,1 M. A continuación, se añade a la solución un copolímero de SMA que contiene un radical anhídrido maleico con agitación y se continúa esta reacción de acoplamiento durante toda la noche. A continuación, se purifica el producto resultante por cromatografía sobre Sephadex G-50 para separar la L-lisina sin reaccionar de SMA-lisina (SMA lisado) y recuperar la fracción SMA-Lys. Se lleva un seguimiento del producto eluido por DO (densidad óptica) a 230-260 nm (absorción). Esta reacción se puede llevar a cabo también en un disolvente como tetrahidrofurano, dimetilformamida y sulfóxido de dimetilo.

A continuación, se disuelve el SMA-Lys liofilizado (100 mg) en 50 ml de solución acuosa NaHCO₃ 0,1 M al mismo tiempo que se mantiene la solución a un pH de 8,5 a 9,0. A continuación, se añaden a la mezcla 20 mg de FITC para su reacción de manera similar a la reacción anterior para obtener SMA marcado con FITC.

En este procedimiento, se puede utilizar isotiocianato de rodamina (RITC) en lugar de FITC para producir el complejo SMA-rodamina.

[Método III] Preparación de complejo que comprende molécula fluorescente y macromolécula biocompatible (HPMA), donde la molécula fluorescente está unida covalentemente directamente a la macromolécula biocompatible.

El Método III consiste en unir un colorante fluorescente o un fotosensibilizador a polímero de hidroxipropil metacrilamida (HPMA) o similar por reacción química de un grupo funcional en un colorante fluorescente o un fotosensibilizador, como por ejemplo un grupo amino, un grupo hidroxilo, un grupo cetona o similar, con un grupo amino (véase fórmula (2) anterior), un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo cisteína, un grupo hidracina, o similar en HPMA o un derivado. En esta reacción, la relación en peso entre la macromolécula biocompatible y la molécula fluorescente no está limitada de forma particular. La temperatura de reacción y el período de reacción no

están limitados en particular, si bien la reacción se puede llevar a cabo por ejemplo a aproximadamente 30 °C durante 5-20 horas.

A continuación, se explica el Método III con mayor detalle.

5 Se disuelve en DMSO un colorante fluorescente o un fotosensibilizador como protoporfirina IX (281 mg) y se añade con agitación HPMA (570 mg). Se añaden a esta mezcla de reacción trietilamina (1 g), dimetilaminopiridina (DMAP) (1,2 g) y carbodiimida hidrosoluble (WSC, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (1,92 g) y se deja reaccionar a 10 50 °C. En lugar de WSC, se puede utilizar DCC (diciclohexilcarbodiimida) y se puede llevar a cabo la reacción en un disolvente. La reacción se puede llevar a cabo durante aproximadamente 12 horas. A continuación, para eliminar el catalizador, se añaden una pequeña parte alícuota de éter dietílico para recuperar el precipitado. Al repetir este proceso tres veces, se obtiene protoporfirina conjugada con HPMA (HPMAPP) como precipitado. Se disuelve el precipitado en dimetilformamida, seguido de cromatografía de columna de permeación de gel (BioBeads S-X1) para 15 separar PP sin reaccionar. A continuación, se disuelve HPMA-PP en agua estilada, seguido de ultrafiltración o cromatografía de columna sobre Shephadex G-25 o G-50 (tamaño de columna: Φ 1,0 a 5,0 cm x l 30 cm a 1,5 m) con agua destilada como eluyente. A continuación, se liofiliza el material eluido para producir un polvo.

[Método IV] Preparación de complejo que comprende molécula fluorescente y macromolécula biocompatible (proteína) donde la molécula fluorescente está covalentemente unida directamente a la proteína.

20 El Método IV consiste en unir FL y similares a una proteína y similares haciendo reaccionar químicamente un grupo funcional (reactivo) en FL, como pueda ser un grupo isotiocianato (-NCS) en colorante fluorescente, como isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) y similares, con un grupo amino en una proteína, por ejemplo, proteínas de suero como albúmina de suero, transferrina, inmunoglobulina (IgG) y 25 similares.

En este caso, la relación en peso de la macromolécula biocompatible y la molécula fluorescente no está limitada en particular a una relación específica, sin embargo, por ejemplo, se pueden utilizar 100 partes en peso de la macromolécula biocompatible por cada 0,5 a 10 partes en peso de la molécula fluorescente. Las condiciones de 30 reacción no están limitadas en particular, si bien por ejemplo, pueden ser aproximadamente la temperatura ambiente (25°C) durante aproximadamente 5 a 6 horas y hasta aproximadamente 20 horas, y el pH en la reacción entre la macromolécula biocompatible y la molécula fluorescente puede estar comprendido entre 7 y 10, preferentemente e aproximadamente 8,5.

35 A continuación, se explica con mayor detalle el Método IV.

Se disuelve albúmina de suero humano (100 mg) en NaHCO_3 0,1 M y se ajusta el pH a entre 8,0 y 9,0 con agitación con un agitador magnético. Se añade a la solución un reactivo fluorescente (20 mg), como por ejemplo un colorante fluorescente, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) y se continúa la reacción durante 5 a 6 horas, para un 40 extenso marcado fluorescente a un pH > 8,5 durante 20 horas. Después de esto, se dializa la reacción contra agua destilada o se aplica a cromatografía de columna sobre Sephadex G-25 o G-50 (tamaño de columna: Φ 1,0 a 5,0 cm x l 30 cm a 1,5 m) utilizando agua como eluyente para separar los productos descompuestos y los reactivos sin reaccionar. Se recoge la proteína marcada fluorescente deseada utilizando un tubo de diálisis y fluido dentro; o utilizando columna de Sephadex con un colector de fracción y se somete a liofilización para obtener el complejo 45 deseado.

Entre los complejos mencionados que comprenden moléculas fluorescentes (FL) y las macromoléculas biocompatibles, no se conoce ningún complejo donde la macromolécula biocompatible se seleccione entre HPMA, 50 las que tiene grupos funcionales y mezclas de los mismos.

Asimismo, entre los complejos mencionados, los que se mencionan a continuación no se conocen: aquellos en los que la molécula FL se selecciona entre rosa de bengala, verde de indocianina (ICG), ftalocianina unida a Zn, porfirinas, feoforbida unida a Zn, azul de metileno, Zn Foscan (Foscan), Zn ortofenantrolina, Cu fenantrolina, acriflavina, arinol, acridin diamina, acridina, naranja de acridina, tetraciclina, aminofluoresceína, tetrametilrodamina, 55 aminorodamina, diclorofluoresceína (preferiblemente, rosa de bengala, verde indocianina (ICG), azul de metileno, Foscan Zn, tetrametilrodamina), y mezclas de los mismos, y la macromolécula biocompatible seleccionada entre copolímeros de estilreno-maleílo (SMA) y SMA que tienen una cadena lateral de ácido maleico multi-funcionalizada, copolímeros de hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), HPMA con grupos funcionales, albúmina de suero, transferrina, inmunoglobulina, α 1-ácido glucoproteína, α 1-antitripsina (preferentemente, SMA, SMA que tienen una cadena lateral 60 de ácido maleico multi-funcionalizada, HPMA, HPMA con grupos funcionales y albúmina de suero), y mezclas de los mismos.

Las sondas moleculares fluorescentes macromoleculares de la presente invención pueden administrarse por vía intravenosa o arteria de alimentación tumoral, o se pueden administrar por vía oral como formulaciones oleosas. 65 Tras la administración, las sondas moleculares fluorescentes se acumularán en el tumor y teñirán el tumor de manera que será posible detectar tumores ductales o intracavitarios con un endoscopio de fluorescencia. Asimismo,

se pueden detectar con un laparoscopio de fluorescencia carcinomatosis peritoneal y pleural, o cánceres metastásicos peritoneal y pleural o sus nódulos sucesores (daughter nodules) por ejemplo metástasis en la pared torácica /pleura, omento mayor, o diafragma.

- 5 El "endoscopio de fluorescencia" mencionado deberá tener propiedades espectroscópicas de FL y PS que se ajusten al sistema óptico. Por ejemplo, se puede instalar el filtro de ajuste a un aparato óptico de fibra de Fuji Film u Olympus Co. Ltd. Alternativamente se puede usar también una fuente luminosa externa como por ejemplo Asahi Spectra Max303 (Asahi Spectra Ltd., Tokio).

- 10 El "laparoscopio fluorescente" mencionado no está limitado en particular siempre y cuando tenga propiedades espectroscópicas ajustadas, según lo mencionado, pero incluye por ejemplo un laparoscopio de SK-2D10D o SK-2D05S de Shinko Optical Co., Ltd.

- 15 La sonda molecular fluorescente de tipo macromolecular de la presente invención tendrá una estructura micelar y se llevará a las células cancerosas, más preferentemente, a través de la llamada endocitosis, para experimentar a continuación la desintegración en la célula en virtud de lo cual el FL se liberará en la célula. Las FL son ahora moléculas libres y si son moléculas PS generarán oxígeno singlete tras la irradiación y ejercerán un efecto citotóxico sobre las células tumorales.

- 20 El "tratamiento fotodinámico" utilizado en este punto se refiere a un método para el tratamiento del cáncer que se puede llevar a cabo irradiando luz mediante el uso de una fuente luminosa endoscópica para cánceres en órganos ducales, o utilizando un proyector que tenga luz xenón o utilizando una fuente luminosa de Asahi Spectra para cánceres en la superficie del cuerpo, durante entre varias horas y 2 días tras la administración de un agente macromolecular que contiene PS.

- 25 Las sondas fotosensibilizadoras (PS) convencionales utilizadas en el tratamiento fotodinámico se distribuyen a través de todo el organismo, incluyendo los tumores, lo que constituye un gran problema. Sobre todo, la fotosensibilidad debido a la distribución de las sondas por la superficie del organismo, como pueda ser la piel, causa un grave efecto secundario, que tiene como resultado el daño del tejido (células) de la superficie del cuerpo incluso, con luz ambiental de interior o de exterior. Los autores de la invención han realizado una conversión con éxito de la molécula PS de bajo peso molecular por la macromolécula, en virtud de lo cual se proporciona la acumulación selectiva de la macromolécula PS en el tumor. Gracias a esto se evita la acumulación en la piel normal y se reduce la posibilidad de que se produzca fotosensibilidad. Por otra parte, dado que las macromoléculas PS se acumulan en los tumores mucho más que en los tejidos normales, se hace posible la visualización en nódulos de tumor diminutos por fluorescencia y, por tanto, el efecto terapéutico incluso con una entrada relativamente baja de irradiación de luz permite una generación eficaz de oxígeno singlete en el tumor de forma selectiva, algo que es imposible con moléculas PS de bajo Pm. Es de esperar que se puedan evitar daños como la rotura de los sistemas nerviosos o los vasos sanguíneos causada por el láser de alta energía y que los tumores localizados en tejidos relativamente profundos puedan ser tratados eficazmente.

- 40 Se sabe que verde de indocianina (ICG) y rosa de bengala, descritos en el presente documento como molécula fotosensibilizadora (PS), se unen a la albúmina de suero tras inyección intravenosa. Este conjugado (complejo) se puede separar en albúmina libre y la molécula PS en el hígado y, después, se puede excretar la molécula PS a la bilis eficientemente. En las personas sanas, la vida media de la molécula PS en la sangre es de 15 a 30 min. Este tiempo de residencia en la sangre relativamente corto no es suficiente como para presentar el efecto EPR. En cambio, las micelas de SMA que encapsulan rosa de bengala, micelas de SMA que contienen ICG o similares, en la presente invención, pueden tener una vida media de 500 min o más, y presentar un fenómeno de absorción según el tiempo, efecto EPR, para presentar una acumulación significativamente más alta en tumores [Figura 3].

- 50 El oxígeno singlete tiene una reactividad muy alta y por tanto puede desplazarse a una distancia de solamente 0,1 μm en el sistema biológico. Esto indica que la absorción en las células diana de la molécula PS que produce el oxígeno singlete es necesaria para proporcionar la citopatía de oxígeno singlete. Cuando se acumulan moléculas fluorescentes/fotosensibilizadoras (FL/PS) en los tejidos de tumor, pero no se absorben en las células tumorales, la molécula FL/PS puede utilizarse para la visualización de tejidos tumorales por fluorescencia, pero no se puede utilizar eficientemente como agente fotosensibilizador. La conversión al vehículo de polímero a una formulación micelar de SMA tiene la ventaja de ser capaz de potenciar la absorción de sondas FL/PS en células. En lo que respecta a la conversión a una naturaleza macromolecular de las sondas FL/PS distinta la formación de micela, se pueden conjugar el conjugado de FL/PS a albúmina, transferrina, IgG o similares con SMA para facilitar la internalización en las células tumorales.

- 60 Otro gran problema puede derivarse de la fluorescencia no específica en tejidos no tumorales durante la detección de tumor fluorescente. La ventaja de las sondas moleculares fluorescentes macromoleculares es que las sondas se distribuyen mínimamente en el tejido normal debido al efecto EPR. Para conseguir un efecto EPR, el tiempo de circulación en plasma de dichas sondas FL/PS tiene que ser lo suficientemente prolongado. Las sondas FL/PS en la circulación pueden ser fluorescentes como un fondo en el tejido normal y por tanto, es posible que la fluorescencia en el tejido de tumor no sea alta y que se obtenga una relación S/N escasa. Este problema sin embargo, se puede

resolver con la formación micelar con SMA. Cuando dichas moléculas FL/PS se pliegan compactamente en las micelas SMA, no presentan fluorescencia. Por tanto no se observará generación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) cuando las moléculas PS se empaquetan en micelas de SMA. Concretamente, la fluorescencia por iluminación con luz no se aprecia cuando las moléculas FL/PS están empaquetadas en micelas en la sangre. Un vez que las micelas de SMA que incluyen las moléculas FL/PS llegan a las células tumorales por el efecto EPR y son absorbidas en las células, las micelas de SMA se desintegrarán y liberarán la molécula FL/PS libre. Con la iluminación de luz en la región de longitud de onda de excitación, las moléculas FL/PS libres pueden presentar fluorescencia y generar $^1\text{O}_2$ (oxígeno singlete). En consecuencia, las sondas empaquetadas en micelas de SMA en la sangre no presenta fluorescencia ni generan oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) incluso aunque se iluminen con luz (véase Figura 4). Dado que las sondas no son fluorescentes en tejidos o vasos sanguíneos normales, y no se observan fluorescencia no específica ni generación de $^1\text{O}_2$ en tejidos normal normales, son posibles la detección por visualización del tumor por fluorescencia específica de tumor y la generación selectiva de $^1\text{O}_2$ de tumor.

Los complejos de la presente invención se pueden utilizar para tratamiento fotodinámico (PDT). La fuente de luz utilizada para PDT puede ser láser He/Ne, lámpara de xenón y similares. Dado que las moléculas FL utilizadas en la presente invención se pueden adaptar a una amplia gama de longitudes de onda de excitación para fluorescencia, preferentemente, se utiliza una fuente de luz de lámpara de xenón en lugar de una fuente luminosa de láser, que puede emitir solamente a una longitud de onda determinada.

Para una detección eficaz de la sonda molecular fluorescente macromolecular de la presente invención, es posible utilizar un endoscopio, un laparoscopio, un cistoscopio, o similares, equipados con una cámara CCD, un filtro de luz de excitación y un filtro de luz de fluorescencia, donde los filtros se adaptan a las propiedades de la sonda molecular fluorescente.

Ejemplos

<Ejemplo 1> (Ejemplo de referencia) Preparación de micela de SMA con encapsulación de azul de metileno (MB), es decir, micela SMA-MB.

En primer lugar, se pesaron 100 mg de copolímero SMA (producto de Sartomer, EE.UU.; o su derivado butilado de éster alquílico, etc.) y se colocan en un vaso de precipitados de 200 ml; se añadieron de 30 a 60 ml de agua destilada. Después de controlar el pH con un medidor del pH, se añadió lentamente 0,1 M NaOH con agitación y se llevó el pH a aproximadamente 8,5. A continuación, se añadieron varias partes alícuotas de 5 a 10 mg de polvo de azul de metileno (MB, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka) hasta un total de 30 mg. Al cabo de 1 a 2 horas de mezclado, se añadió HCl 0,1 M para disminuir el pH a aproximadamente 4,8 hasta que apareció un precipitado azul. Tras la centrifugación (5000 rpm) de esta suspensión, se recogieron los precipitados. A continuación, se suspendieron los precipitados y se lavaron con 60 ml de HCl 1 mM enfriado con hielo. Continuando con la centrifugación a 5000 rpm, se recogieron los precipitados resultantes. A continuación, se suspendieron los precipitados en 300 ml de agua destilada y se añadió gota a gota NaOH 0,1 M para obtener la completa solución de la suspensión a un pH aproximadamente neutro. Se sometió esta solución a un sistema Milipore Labscale TPF para concentración y diálisis equipado con una membrana de Pm límite 10 KDa, y se concentró hasta 30 ml a presión positiva. Se añadieron 400 ml de agua destilada y se dializó y concentró la mezcla hasta 40 ml. Se repitió el procedimiento dos veces. Se liofilizó el producto concentrado para producir de 90 a 100 mg de polvo azul.

En la figura 5 se muestran los espectros de absorción de UV-visible y fluorescencia.

<Ejemplo 2> (Ejemplo de referencia) Preparación de micela de SMA con encapsulación de ICG (verde de indocianina), es decir micela de SMA-ICG

Se obtuvo micela SMA-ICG (rendimiento: aproximadamente 10 mg) de manera similar a la del Ejemplo 1, con la excepción de que se utilizó verde de indocianina (ICG) en lugar de azul de metileno. En la figura 6 se muestran los espectros de absorción y de fluorescencia.

(Ejemplo de referencia) Preparación de micela de SMA con encapsulación de rosa de bengala (RB), es decir micela de SMA-RB

Se obtuvo micela SMA-RB (rendimiento: aproximadamente 100 mg) de manera similar a la del Ejemplo 1, con la excepción de que se utilizó rosa de bengala (RB) en lugar de azul de metileno. En la figura 7 se muestran los espectros de absorción UV-visible y de fluorescencia.

<Ejemplo 4> (Ejemplo de referencia) Preparación de Zn-foscan de encapsulación de micela de SMA, es decir micela de SMA-Zn-Foscan

Se obtuvo micela SMA-Zn-foscan (rendimiento: aproximadamente 90 mg) de manera similar a la del Ejemplo 1 con la excepción de que se utilizó Zn-foscan en lugar de azul de metileno. En la figura 8 se muestran los espectros de absorción de UV/visible y de fluorescencia.

<Ejemplo 5> Preparación de complejo unido covalentemente de HPMA conjugada (HPMA-PP) con Zn-protoporfirina (ZnPP)-HPMA (HPMA-ZnPP)

Se disolvió protoporfirina IX (281 mg) en DMSO, y se añadió un polvo de copolímero de HPMA (570 mg) con agitación con un agitador magnético. Se añadieron tetraetilamina (1,0 g), DMAP (1,2 g) y WSC (1,92 g) y se dejó reaccionar a 50 °C con agitación. A continuación, se continuó agitando la reacción durante aproximadamente 12 horas. En la siguiente etapa, para separar el catalizador, se añadió éter dietílico y se recuperaron los precipitados. Se repitió esta etapa tres veces para obtener protoporfirina conjugada con HPMA (HPMA-PP) como precipitado. A continuación, se disolvió HPMA-PP en dimetilformamida y se sometió a cromatografía de permeación de gel de columna (BioBeads S-X1) para eliminar PP sin reaccionar. A continuación, se disolvió HPMA-PP en agua destilada, seguido de diálisis utilizando una membrana de diálisis de 10 kDa o cromatografía en columna sobre Sephadex G-25 o G-50 (columna Φ : 1,0 a 5,0 cm x l 30 cm a 1,5 m) con agua como eluyente. A continuación, se liofilizó la solución resultante para obtener un polvo (rendimiento: aproximadamente 650 mg). En las figuras 9a y 9c, se muestran los espectros de absorción UV-visible y fluorescencia, respectivamente.

Se obtuvo HPMA-ZnPP (rendimiento: aproximadamente 630 mg) de manera similar, con la excepción de que se utilizaron 280 mg de Zn-protoporfirina (ZnPP) en lugar de protoporfirina IX. En las Figuras 9b y 9d, se muestran los espectros de absorción de UV-visible y fluorescencia, respectivamente.

<Distribución del tamaño de partícula de HPMA-PP y HPMA-ZnPP>

Se disolvió HPMA-PP o HPMA-ZnPP obtenidos en solución salina fisiológica a una concentración de 1 mg/ml, y se utilizó un analizador del tamaño de partículas (Photal Model ELSZ2, Ohtsuka Electron Inc., Osaka, Japón) para medir la distribución de tamaño de HPMA-PP o HPMA-ZnPP. En la figura 10a y 10b, se muestran la distribución del tamaño de partícula de HPMA-PP y HPMA-ZnPP respectivamente. Como resultado, el diámetro medio de HPMA-PP fue $18,2 \pm 7,4$ nm, y el diámetro medio de HPMA-ZnPP fue $82,8 \pm 41,8$ nm.

<Comportamiento de HPMA-PP en la sangre en circulación>

Se disolvió HPMA-PP en solución salina fisiológica y se inyectó la solución a una dosis de 30 mg/kg a través de la vena caudal de ratones ddY. Con anestesia con éter, se tomó sangre después de laparotomizar a los ratones desde la vena cava inferior con una jeringa heparinizada transcurridos 5 minutos, 2 horas, 24 horas y 48 horas desde la inyección i.v. de HPMA-PP. Después de centrifugar las muestras de sangre a 2000 rpm, 4 °C, 20 min, se recogió cada muestra de plasma. A continuación, se añadieron 10 ml de plasma a 2 ml de DMSO y se midió la intensidad de fluorescencia de HPMA-PP a entre 635 y 660 nm con un espectrofotómetro de fluorescencia con excitación a 420 nm, y se midió el período de tiempo del cambio de concentración de HPMA-PP en plasma. El resultado muestra que HPMA-PP se encuentra en una concentración en el plasma diez veces mayor que PP libre (véase Figura 11a).

De manera similar, se trató HPMA-ZnPP, se midió la intensidad de fluorescencia de HPMA-ZnPP a entre 580 y 660 nm y se midió el período de tiempo del cambio de la concentración de HPMA-ZnPP en plasma. El resultado demuestra que HPMA-ZnPP se encuentra en una concentración diez veces mayor en el plasma que ZnPP libre (véase figura 11b).

<Ejemplo 6> (Ejemplo de referencia) Preparación de rodamina conjugada con albúmina.

En primer lugar, se disolvieron 100 mg de albúmina de suero humano en NaHCO_3 0,1 M y se ajustó el pH a entre 8,0 y 9,0, con agitación con un agitador magnético. Se añadieron a esta solución 20 mg de colorante fluorescente, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o similar a temperatura ambiente, y se agitó. Se continuó la reacción durante 5 a 6 horas o, cuando se deseó un marcado más extenso, se continuó la reacción durante 20 horas a pH > 8,5. Para eliminar los productos de descomposición y los materiales sin reaccionar, se dializó la mezcla de reacción con agua destilada a través de un procedimiento convencional. Alternativamente, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de columna sobre Sephadex G-25 o G-50 (Φ 3,0 a 5,0 cm x l 70 a 80 cm) con agua destilada como eluyente. Se recogió la proteína marcada fluorescente desalada por diálisis con un fluido de diálisis dentro o Sephadex seguido de liofilización del producto para obtener el complejo deseado (rendimiento: aproximadamente 98 mg).

<Ejemplo 7> (Ejemplo de referencia) Detección de tumor fluorescente empleando sondas moleculares fluorescentes

Se inocularon en ambos lados de la piel dorsal de ratones ddY 10^6 células de tumor S180, en cada sitio. Cuando el tumor llegó a de un tamaño de un diámetro palpable (5 a 8 mm), se les inyectó por vía intravenosa rodamina unida a albúmina (200 mg/kg) obtenida en el Ejemplo 7 o micela SMA-ICG (30 mg/kg) obtenida en el Ejemplo 2. Se observó la imagen fluorescente al cabo de 15 horas. Los resultados se muestran en la Figura 3.

En la Figura 3 (A) se muestra la imagen de fluorescencia de ratones portadores de tumor a los que se ha inyectado rodamina conjugada con albúmina (luz de excitación: $535 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, se observó fluorescencia con un filtro de trayectoria de banda de $600 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$), y (B) muestra la imagen de fluorescencia de ratones portadores de tumor

a los que se les ha inyectado SMA-ICG (luz de excitación: 710 nm $\pm$ 15 nm, se observó la imagen de fluorescencia con un filtro de trayectoria de banda de 800 nm $\pm$ 10 nm).

<Ejemplo 8> (Ejemplo de referencia) Generación de oxígeno singlete [$^1\text{O}_2$] desde rosa de bengala tras irradiación

Se demostró la generación de oxígeno singlete [$^1\text{O}_2$] desde rosa de bengala tras irradiación por RSE (resonancia de spin del electrón). Se llevó a cabo la detección del radical $^1\text{O}_2$ utilizando un agente de atrapamiento de spin TEMP (2,2,6,6-tetrametilpiperidina, Wako Pure Chem. Inc., Osaka, Japón). Generalmente, se utiliza TEMP como agente de atrapamiento de spin para atrapar oxígeno singlete y formas de su aducto $^1\text{O}_2$ que presenta señal triplete específica de [$^1\text{O}_2$] para su detección por espectroscopia de RSE (resonancia de spin del electrón).

Se añadió TEMP a una solución salina fisiológica que contenía micela SMA-rosa de bengala (SMA-RB) obtenida en el Ejemplo 3 o rosa de bengala libre a 33,0 μM , a 30 mM, y se realizó la irradiación de luz del siguiente modo; se obtuvieron espectros de RSE.

Se llevó a cabo la medida de ESR utilizando un instrumento de medida de RSE de tipo banda X (JEOL Co. Ltd, Tokio, Modelo FA 100), a una potencia de microondas de 4,0 mW, amplitud de 200 KHz, y ancho de modulación de 0,1 [mT]. Se llevó a cabo la irradiación de luz utilizando una lámpara de xenón 650 W (Master Projector Co., Modelo Master Lux-S, Rikagaku Seiki Co. Ltd, Tokio) a 10 cm de distancia desde el orificio de la lente al mismo tiempo que se refrigeraba con un ventilador de aire.

Tal como se muestra en la Figura 12, de manera similar a RB libre, la micela SMA-RB genera también oxígeno singlete, cuya intensidad fue aumentando dependiendo del tiempo de irradiación. En cambio, RB libre presentó un claro descenso al cabo de diez minutos, y dejó de generar oxígeno singlete completamente al cabo de 20 minutos o más tiempo de irradiación y por tanto [$^1\text{O}_2$] dejó de ser detectable. Esto sugiere que RB libre se descompone rápidamente por irradiación de luz. A partir de estos resultados, es evidente que la micela de SMA-RB puede generar establemente oxígeno singlete durante un período de tiempo más prolongado que RB libre, que es aproximadamente más estable que RB libre y que por lo tanto, la micela de SMA-RB es mucho más útil en comparación con RB libre. Dicha generación de oxígeno singlete en tumores induce muerte celular apoptótica o necrótica de células tumorales por reacción del oxígeno singlete con las células tumorales, y por tanto, es de esperar que tenga un efecto tumoral.

<Ejemplo 9> (Ejemplo de referencia) Efecto citotóxico de micela de SMA-MB en células PC1.0 línea celular de cáncer pancreático humano

Se colocaron células de cáncer pancreático humano PC1.0 en una placa de cultivo de 96 pocillos a 1000 células/pocillo y se cultivaron durante toda la noche. A continuación, se añadió azul de metileno (MB) o micela de SMA-azul de metileno (SMA-MB) a las células de cultivo indicadas, y se dejó en cultivo otras 48 horas. Se llevó a cabo la irradiación de luz utilizando una lámpara de xenón de tungsteno a 15 cm de distancia desde la superficie celular durante 20 minutos. A continuación, se determinó cuantitativamente la tasa de supervivencia de las células por método MTT. Los resultados mostraron que el efecto citotóxico había aumentado significativamente por la exposición de luz en ambos grupos. En la figura 13 y en la Tabla 1 se muestran los resultados.

Líneas celulares	Muestras de ensayo	Irradiación de luz	IC ₅₀ (μM)
PC1.0 (línea celular de cáncer pancreático humano)	Azul de metileno	Ninguna	4,5
		20 min	0,5
	Micela de SMA-azul de metileno	Ninguna	5,5
		20 min	0,1

REIVINDICACIONES

1. Un complejo que comprende una molécula fluorescente y una macromolécula biocompatible, donde la molécula fluorescente se selecciona entre rosa de bengala, verde de indocianina (ICG), ftalocianina unida a Zn, feoforbida unida a Zn, azul de metileno, foscan unido a Zn, Zn-ortofenantrolina, Cu fenantrorina, acriflavina, acrinol, acridina amina, acridina, naranja de acridina, aminofluoresceína, tetrametilrodamina, aminorodamina, diclorofluoresceína, protoporfirina unida a Zn (ZnPP), aclarubicina, pirarrubicina y mezclas de los mismos, donde la macromolécula biocompatible se selecciona entre polímeros de hidroxipropilmetacrilamida, polímeros de hidroxipropilmetacrilamida en los que se ha introducido un grupo funcional y mezclas de los mismos.
2. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la molécula fluorescente se selecciona entre rosa de bengala, azul de metileno, foscan unido a Zn, protoporfirina unida a Zn (ZnPP), aclarubicina, pirarrubicina y mezclas de los mismos.
3. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la molécula fluorescente es pirarrubicina.
4. El complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la molécula fluorescente (1) no está unida covalentemente a la macromolécula biocompatible y el complejo está en forma de una micela en la que la molécula fluorescente está encapsulada en una macromolécula biocompatible, (2) está unida covalentemente a la macromolécula biocompatible a través de un espaciador o (3) está unida covalentemente a la macromolécula biocompatible sin un espaciador.
5. El complejo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, para su uso como una sonda molecular fluorescente macromolecular para detección fluorescente de tumor.
6. El complejo de acuerdo con la reivindicación 5, donde la detección fluorescente de tumor es posible mediante el uso de un endoscopio fluorescente o laparoscopio fluorescente.
7. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso como un agente antitumoral.
8. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en tratamiento fotodinámico.
9. Un método para producir el complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende:
 - (a) hacer reaccionar un grupo funcional de una macromolécula biocompatible con un grupo funcional de una molécula fluorescente para unir el grupo funcional de la macromolécula biocompatible al grupo funcional de la molécula fluorescente.

[Figura 1]

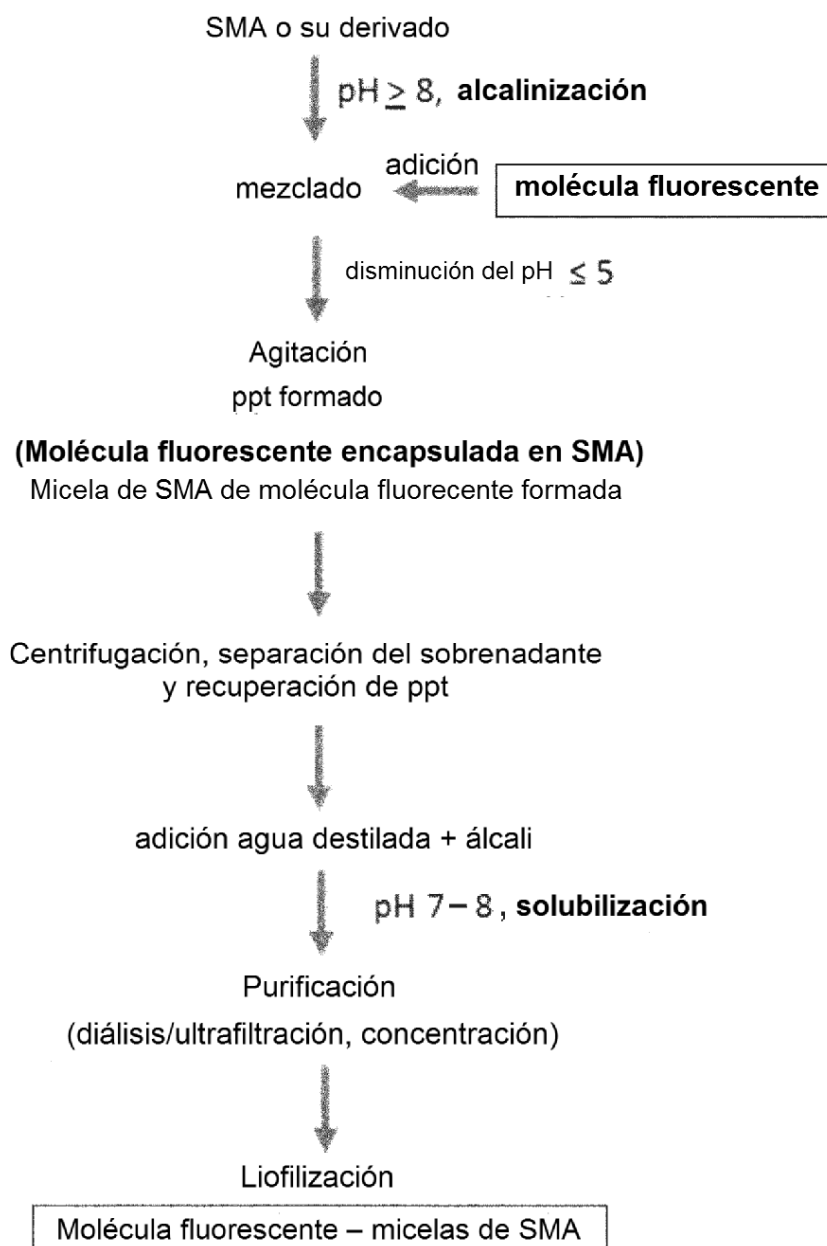


Figura 1. Diagrama de flujo de la preparación de molécula fluorescente - micela de SMA

[Figura 2]

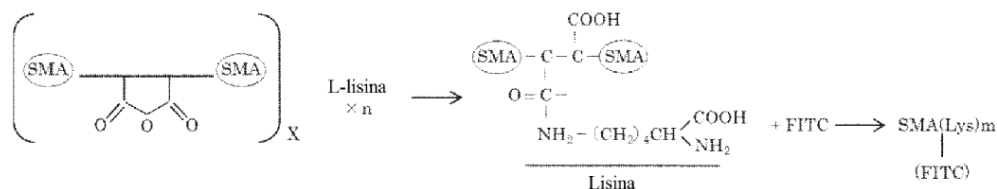


Figura 2. Esquema de reacción de la preparación de un complejo que comprende una molécula fluorescente (FITC) y SMA, en la que la molécula fluorescente está unida covalentemente con SMA a través de un espaciador (lisina). Entre la cantidad en exceso (moles n veces) de lisina añadida, se conjugan m moles de lisina con SMA.

[Figura 3]

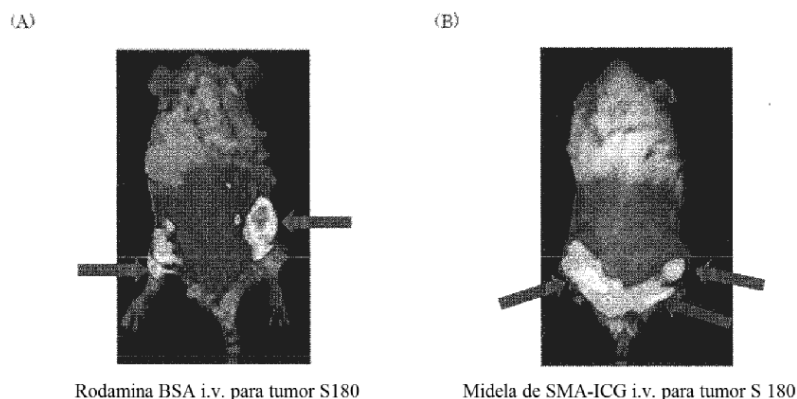


Figura 3. Detección de tumor de alta sensibilidad mediante el uso de una sonda molecular fluorescente. Las zonas brillantes a la derecha y a la izquierda mostradas con flechas indican las zonas de tumor.

[Figura 4]

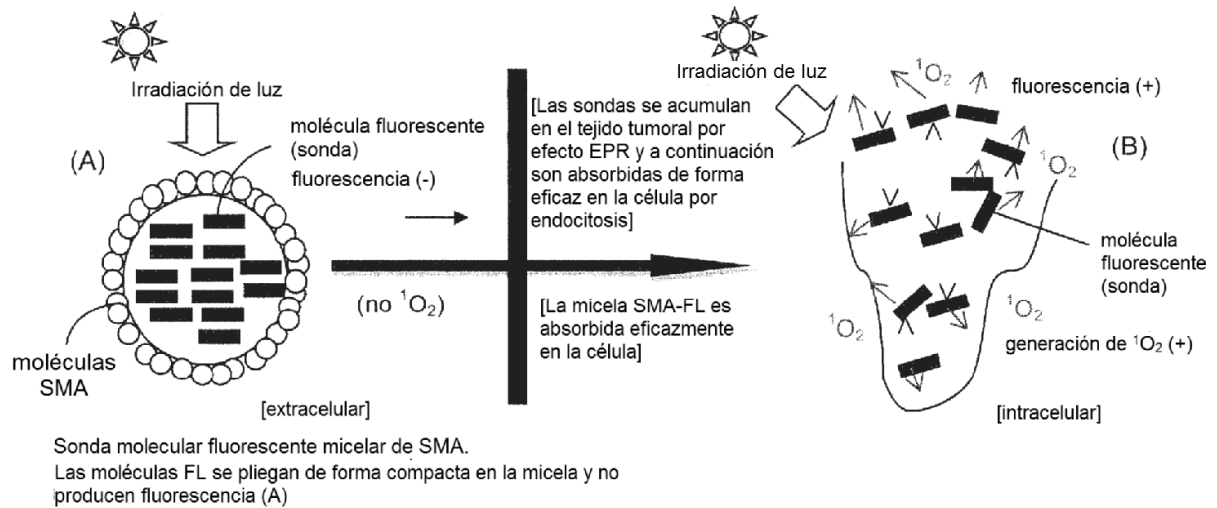
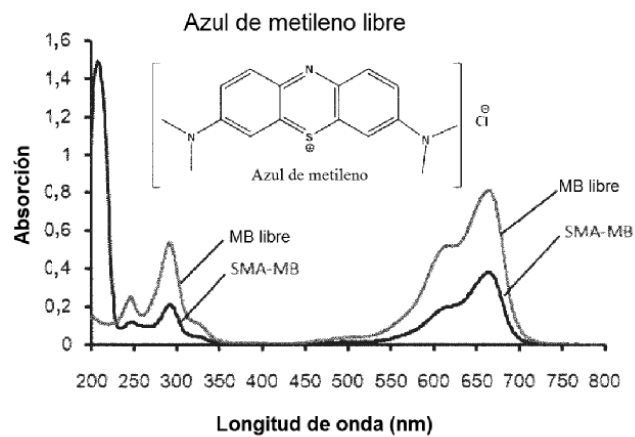


Figura 4. Mapa conceptual de la generación de fluorescencia y oxígeno singlete [$^1\text{O}_2$] tras la irradiación de luz.

[Figura 5]

(A)



(B)

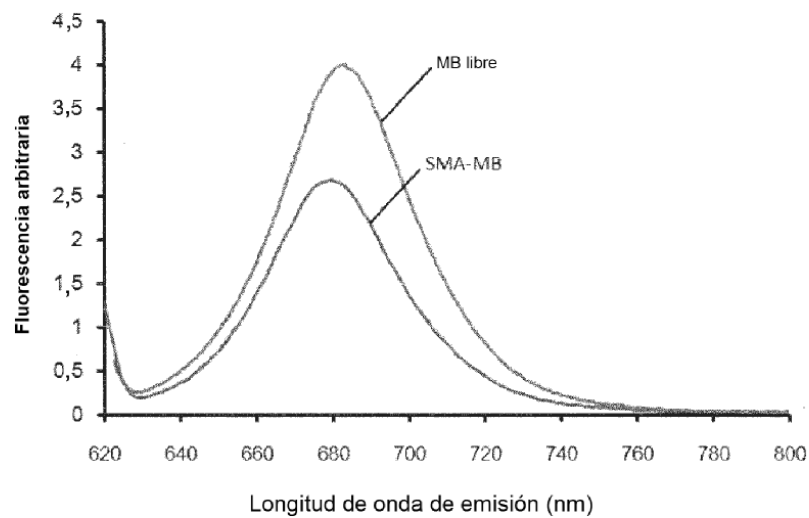
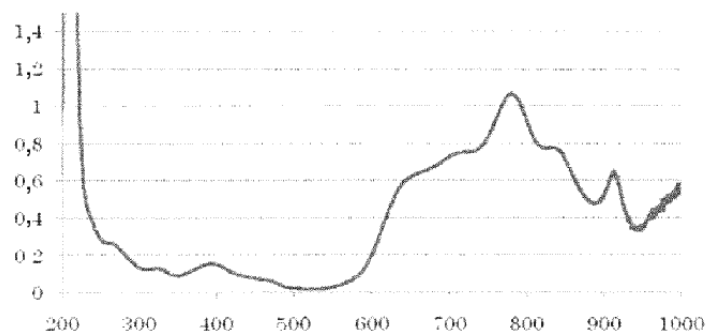


Figura 5. Características espectroscópicas de micelas de SMA que encapsulan azul de metileno (MB) (micelas de SMA-MB)

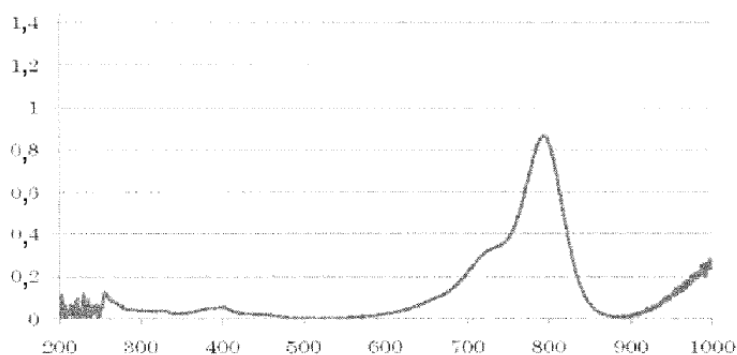
[Figura 6]

(A) Espectros de absorción de micelas SMA-ICG

(a) en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 a 100 µg/ml.



(b) en dimetil sulfóxido (DMSA) 25 µg/ml.



(B) Espectro de fluorescencia de micelas SMA-ICG en tampón fosfato 0,1 M a 5 µg/ml excitado a 765

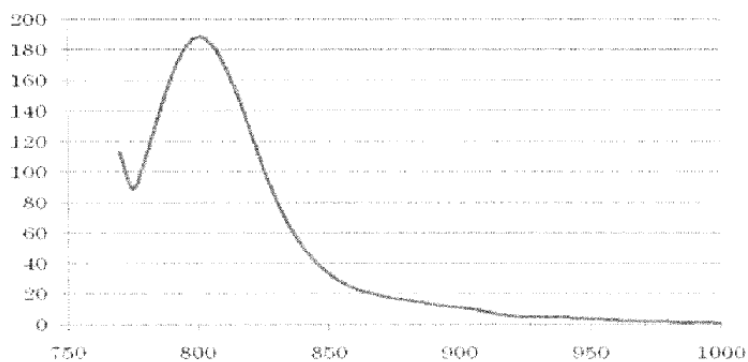
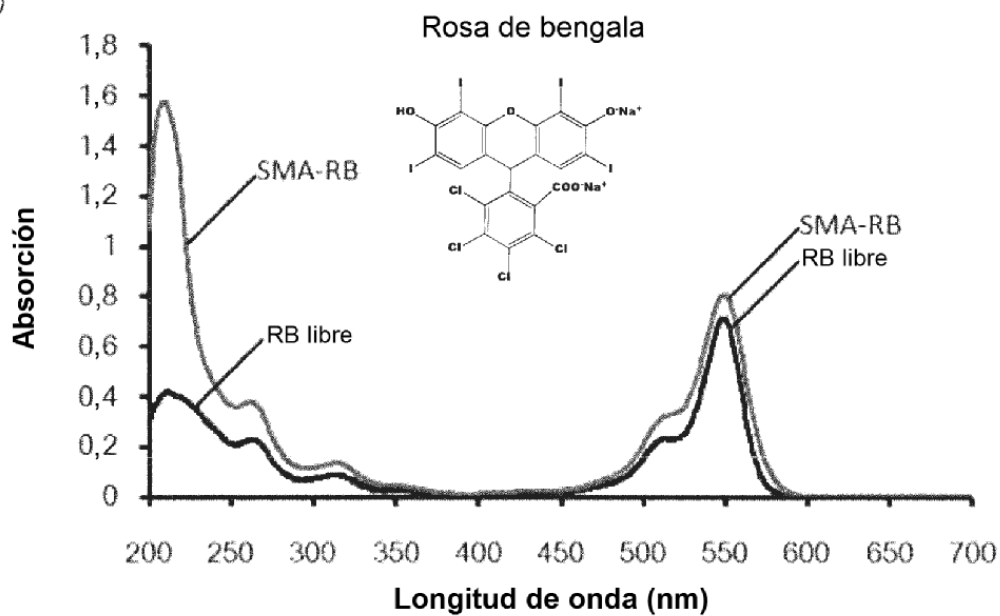


Figura 6. Características espectroscópicas de micelas de SMA que encapsulan verde indocianina (ICG) (micelas de SMA-ICG)

[Figura 7]

(A)



(B)

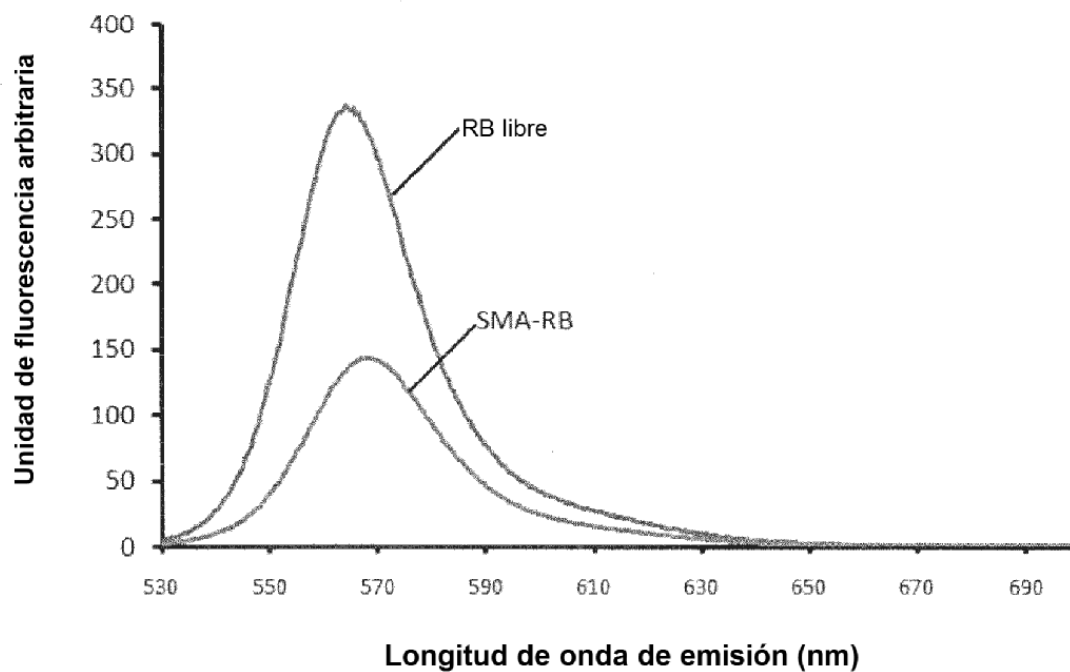
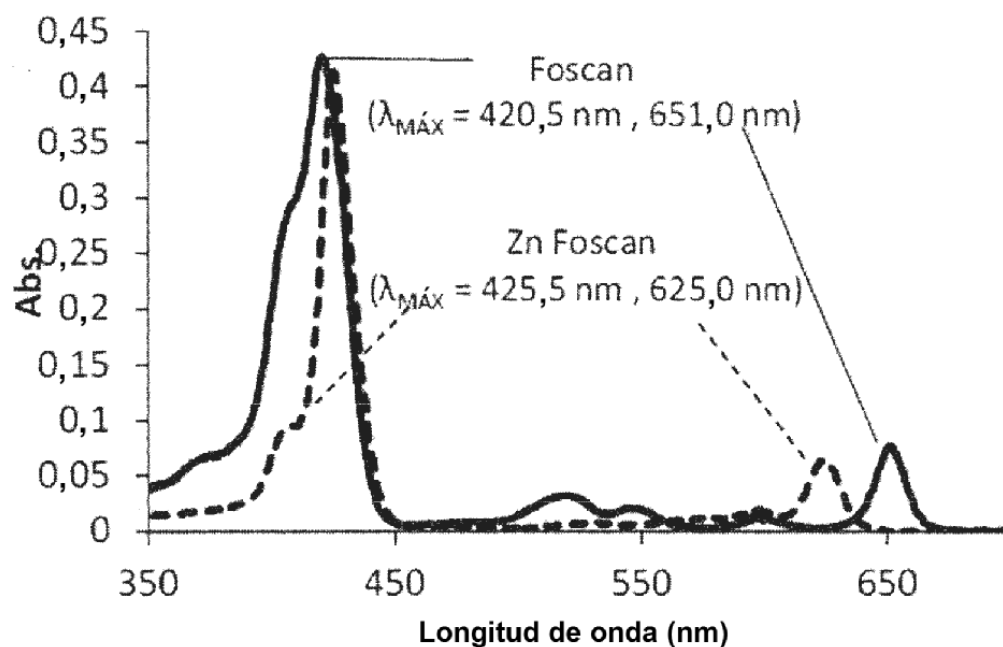


Figura 7. Características espectroscópicas de micelas de SMA que encapsulan rosa de bengala (RB) (micelas de SMA-RB)

[Figura 8]

(A)



(B)

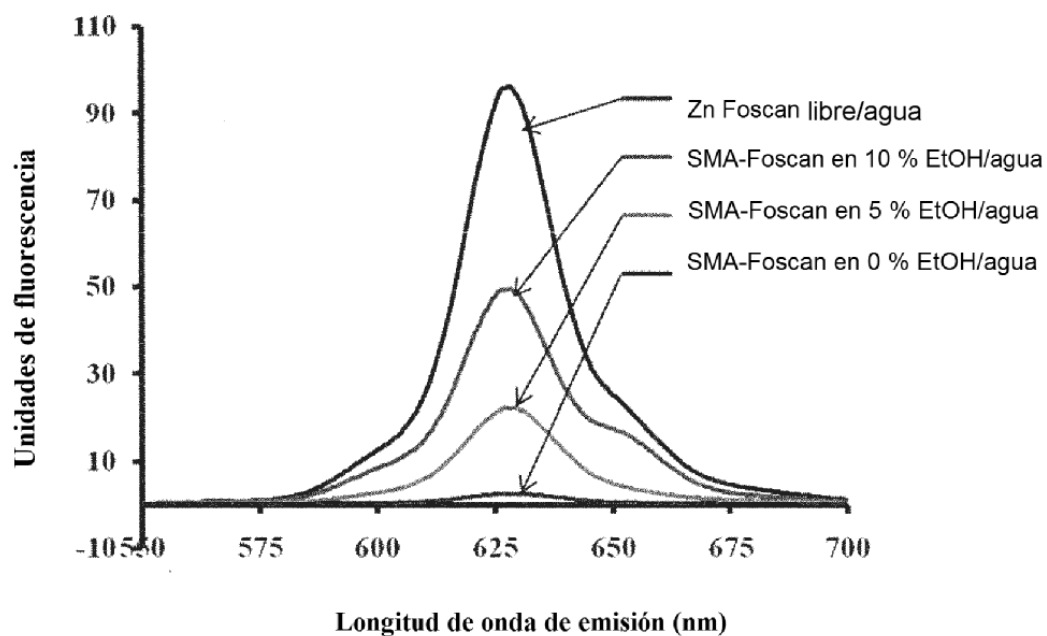


Figura 8. Características espectroscópicas de micelas de SMA que encapsulan Zn foscan (micelas de SMA-Zn foscan)

[Figura 9]

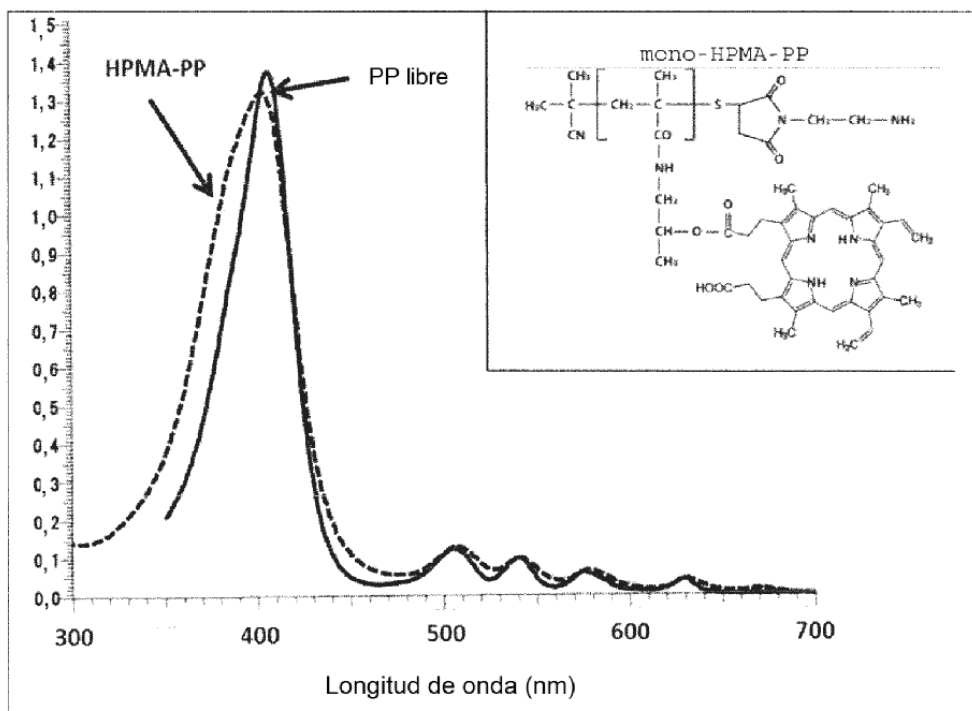


Figura 9a. Espectros de absorción de UV/visible de HPMA-PP y PP libre

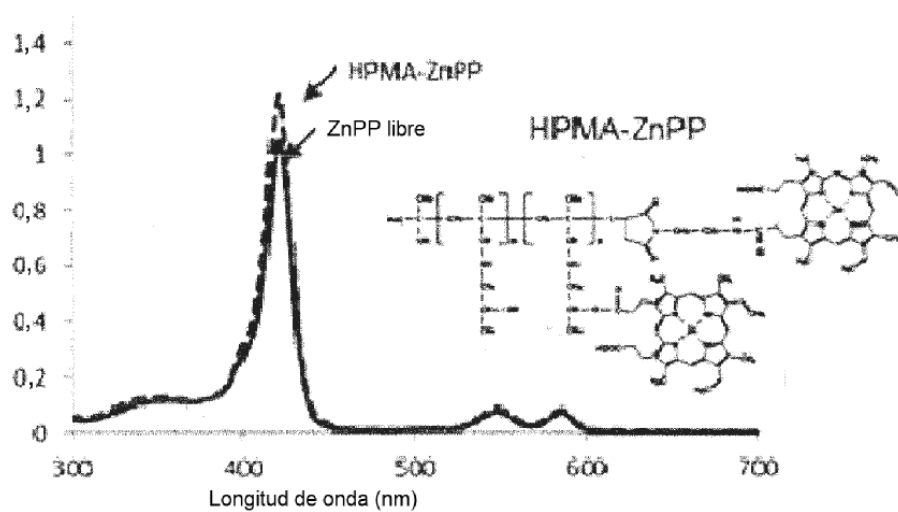
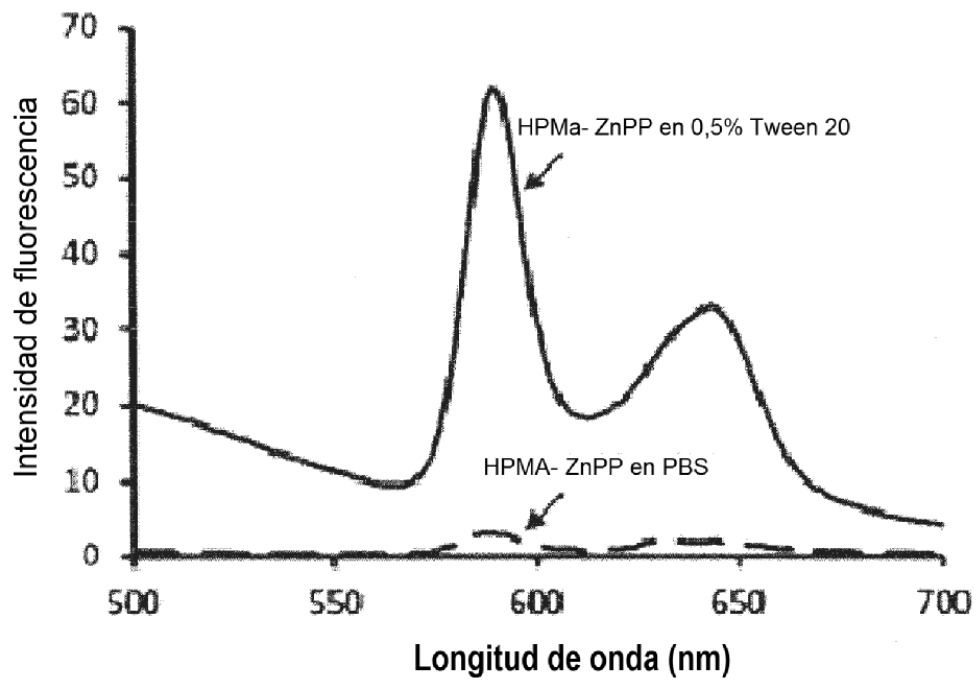
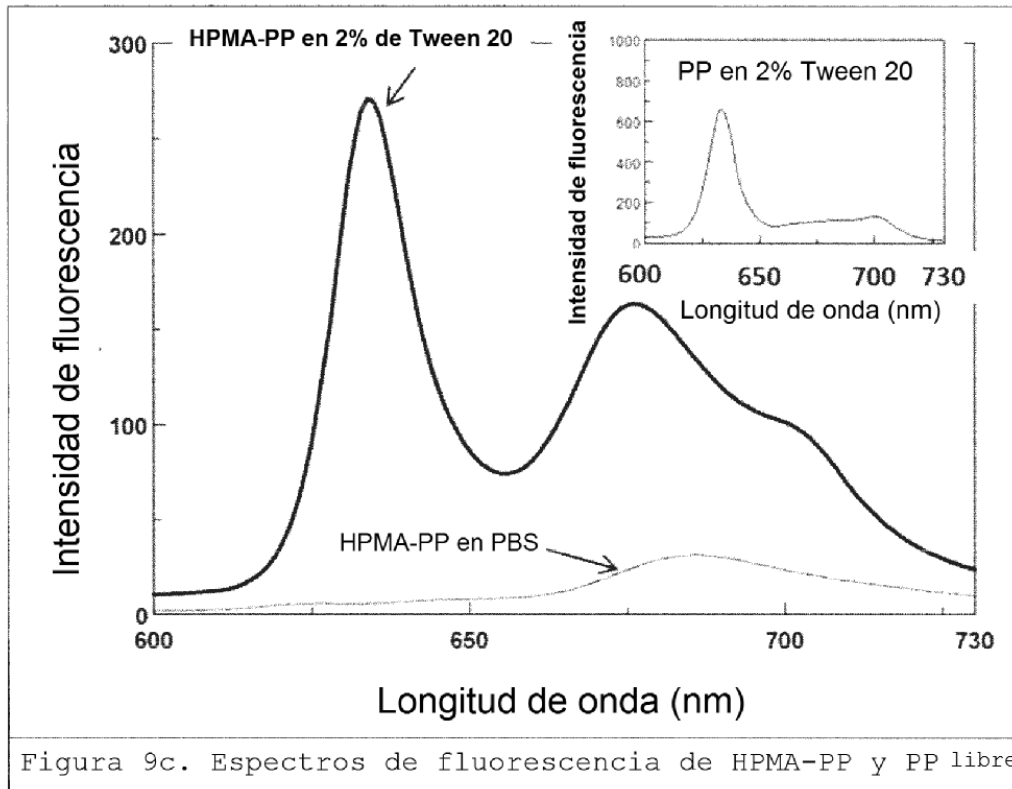


Figura 9b. Espectros de absorción UV/visible de HPMA-Zn PP y Zn PP libre



[Figura 10]

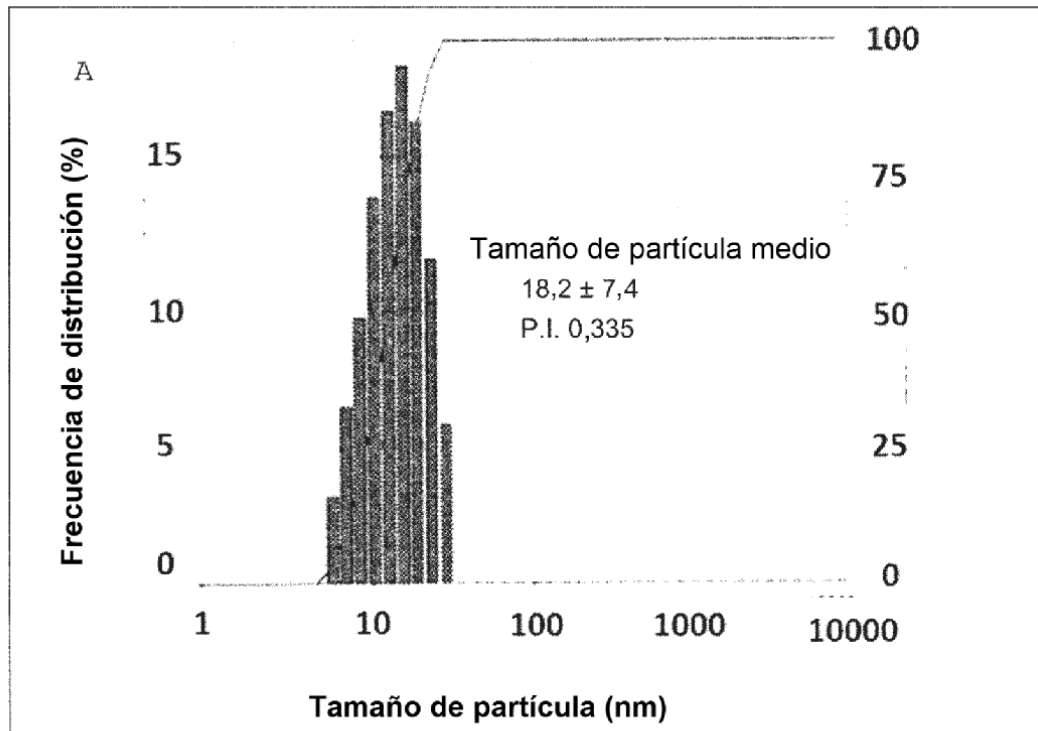


Figura 10-a. Análisis de tamaño de partícula de HPMA-PP.

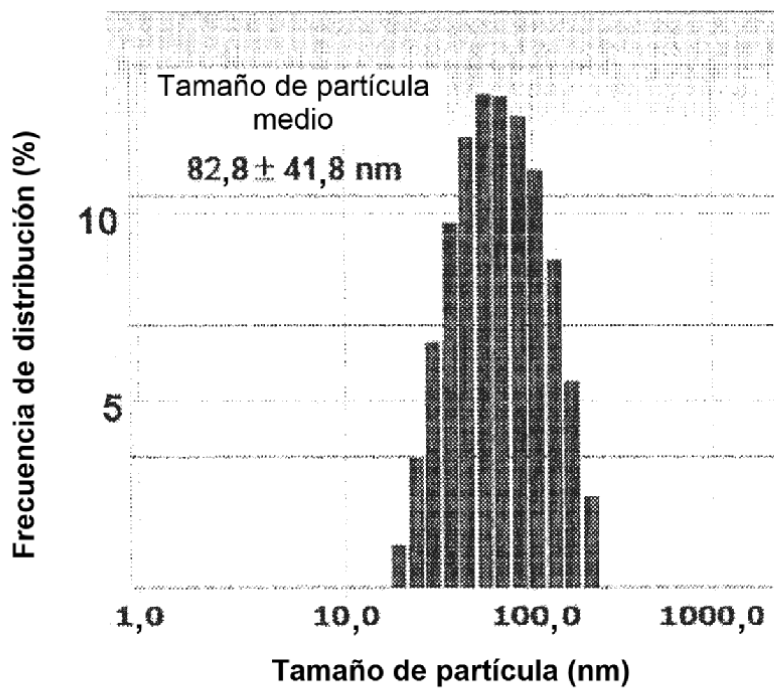


Figura 10-b. Análisis de tamaño de partícula de HPMA-Zn PP.

[Figura 11]

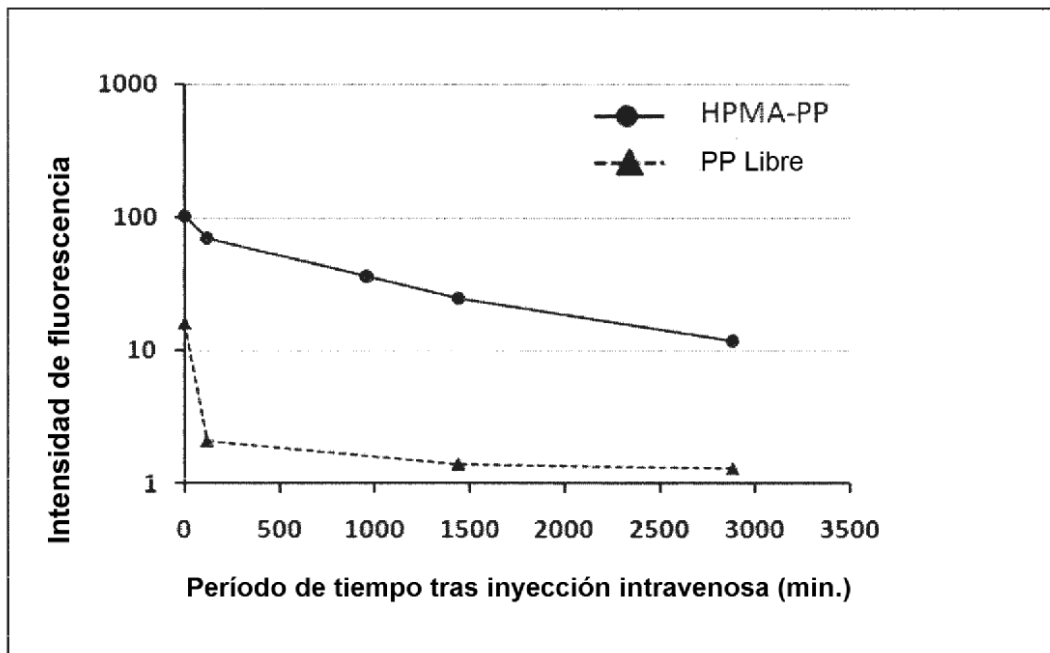


Figura 11-a. Cinética en la sangre de PP libre y HPMA-PP.

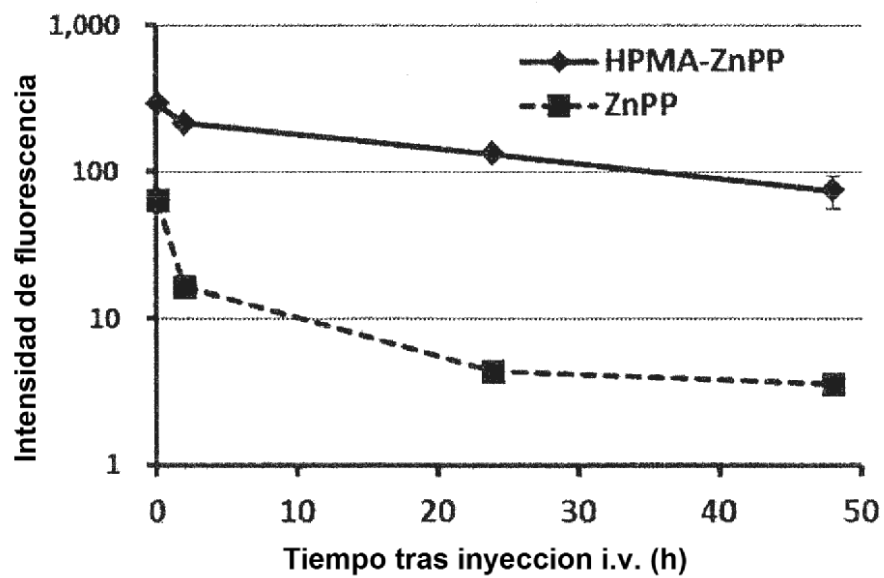


Figura 11-b. Cinética en sangre de ZnPP libre y HPMA-ZnPP

[Figura 12]

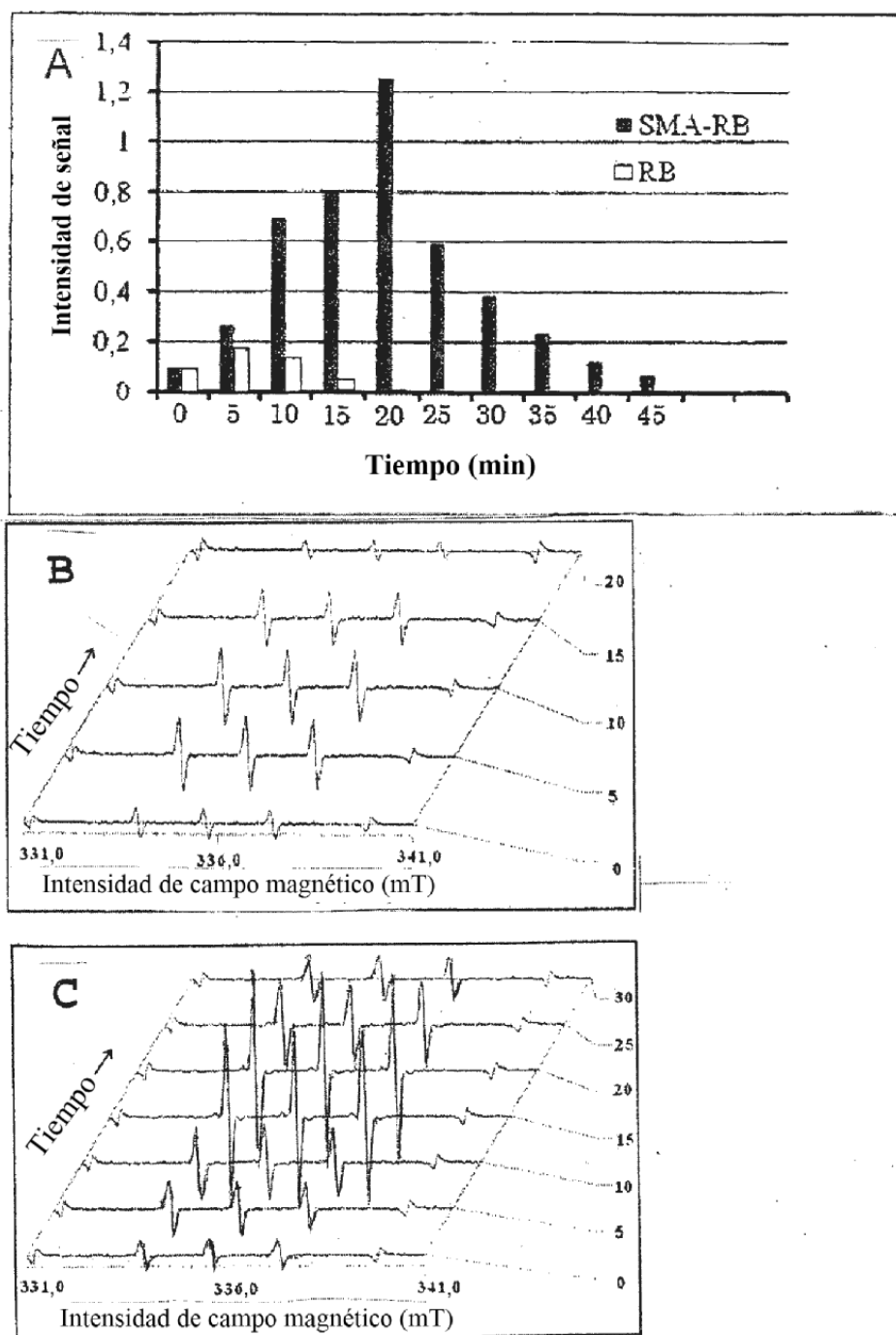


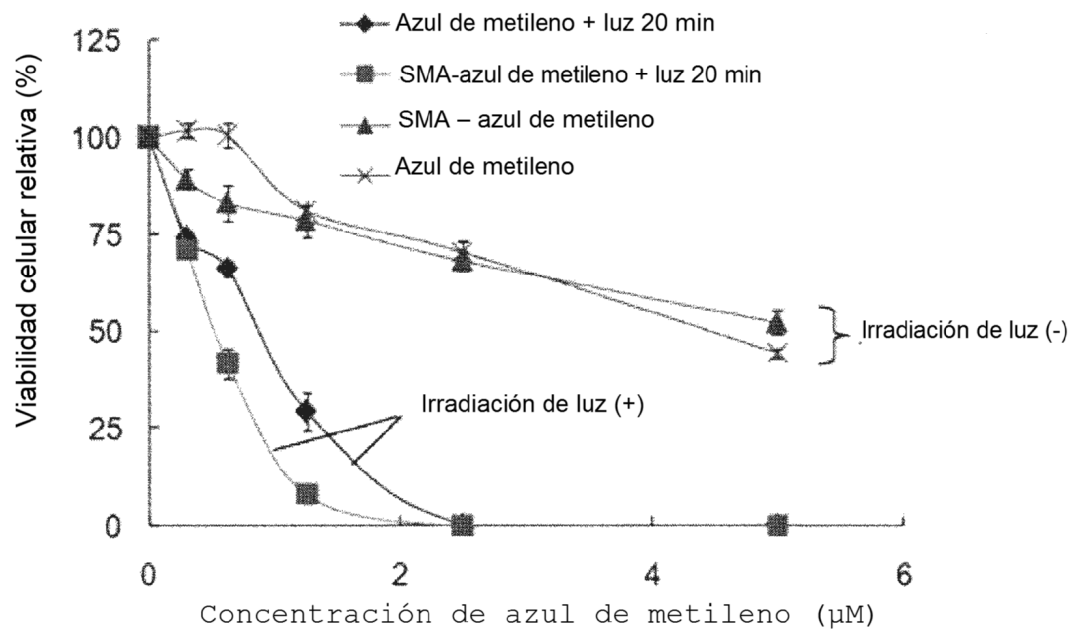
Figura 12. generación de oxígeno singlete tras irradiación de luz de RB libres y micelas de SMA-RB.

(A) Cambio según el tiempo de señal ESR tras irradiación de luz de RB libre y micelas de SMA-RB, ambos a 33,0 μM .

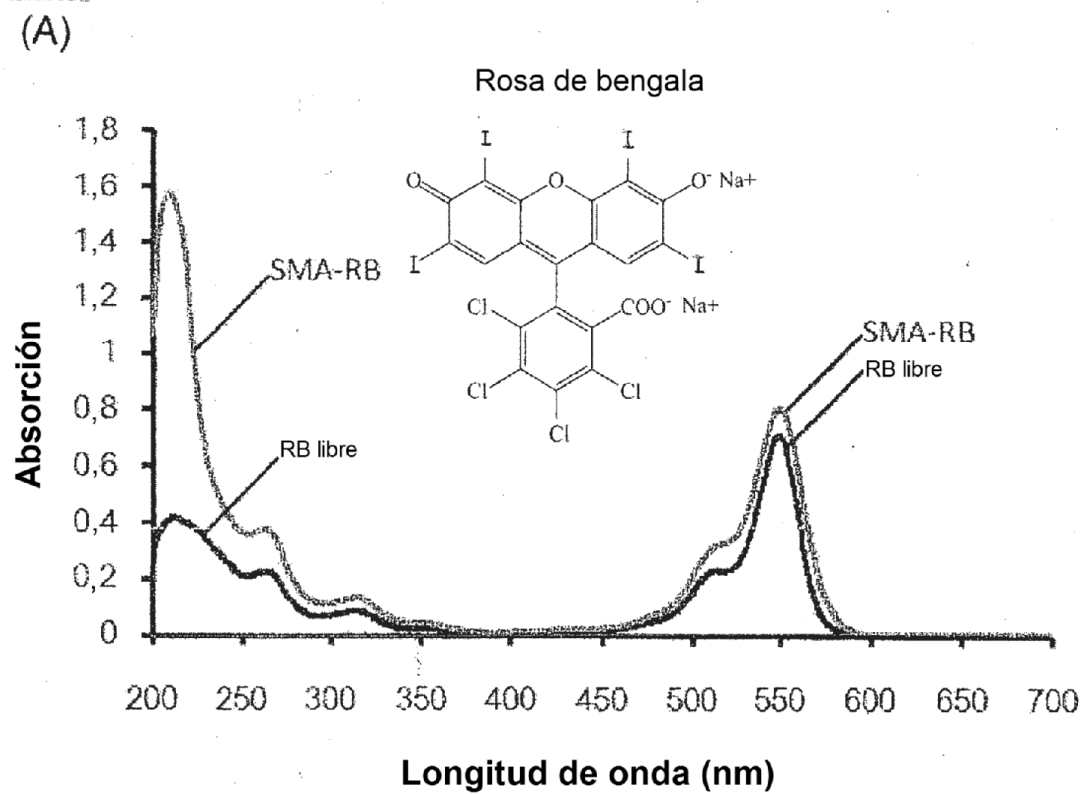
(B) Espectros ESR de RB

(C) Espectros ESR de micelas SMA-RB

[Figura 13]



[Figura 7(A)]



[Figura 9b]

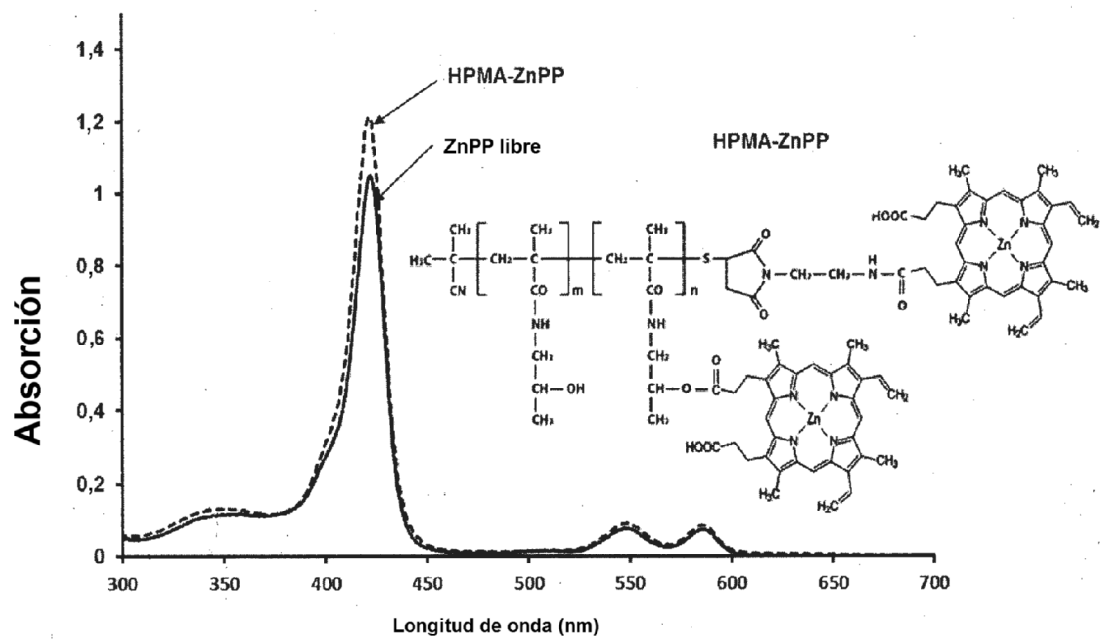


Figura 9b. Espectros de absorción UV/visible de HPMA-Zn PP y Zn PP libre