

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 554**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/473** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2016 PCT/EP2016/062557**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2016 E 16728275 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 3166606**

54 Título: **Conjugados fluorescentes**

30 Prioridad:

**03.06.2015 EP 15170617**

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

**26.09.2018**

73 Titular/es:

**SURGIMAB S.A.S. (100.0%)  
10 Parc Club du Millénaire 1025 Avenue Henri  
Becquerel  
34000 Montpellier, FR**

72 Inventor/es:

**CAILLER, FRANÇOISE y  
FRAMERY, BÉRÉNICE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 683 554 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

Conjugados fluorescentes

**Campo**

5 La presente invención se refiere al campo de la investigación biomédica y en particular a los compuestos y métodos útiles para diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico *in vitro* o *in vivo* de tumores.

**Antecedentes**

10 El cáncer es actualmente la causa de aproximadamente el 13% de las muertes en el mundo. A pesar de décadas de intensa investigación, el cáncer continúa siendo la segunda causa principal de muerte en los países altamente desarrollados, con aproximadamente el 25% de las muertes. Para muchos tipos de cáncer, la cirugía (a menudo en combinación con quimioterapia, radioterapia o hipertermia) es el pilar de la intervención terapéutica.

15 Un cáncer también se dice que es una neoplasia maligna, o un tumor maligno. Una neoplasia es un crecimiento anómalo de tejido. Las neoplasias se diferencian en neoplasias benignas, precancerosas o neoplasias *in situ*, y neoplasias malignas. Muchas, aunque no todas, las neoplasias también forman tumores, que son lesiones sólidas o llenas de líquidos que pueden diferenciarse anatómicamente del tejido no afectado. Al igual que las neoplasias, los tumores pueden ser benignos, precancerosos, o malignos. En el lenguaje común, así como en la descripción de la presente invención, sin embargo, el término "tumor" puede utilizarse como sinónimo de "tumor maligno".

20 El pronóstico vital de los pacientes con cáncer depende de la etapa de la enfermedad en que la misma es diagnosticada. Del veinte al treinta por ciento de los pacientes que sufren cánceres digestivos desarrollarán recurrencia locorregional como única recidiva. Los tumores ováricos epiteliales también muestran una evolución locorregional cuando alcanzan la etapa III. Varios años atrás se demostró que la resección quirúrgica completa es un factor muy importante para la mejora del pronóstico de los pacientes. Esta estrategia de citorreducción máxima forma parte de los protocolos terapéuticos que incluyen quimioterapia sistémica o intraperitoneal posiblemente asociada a hipertermia.

25 La planificación de una cirugía curativa es un parámetro importante para el futuro de los pacientes. La detección de todos los nódulos tumorales y sus diseminaciones es un punto importante que tiene influencia sobre el pronóstico posquirúrgico. La diferenciación entre tejidos tumorales y normales no siempre es fácil, especialmente cuando los pacientes han recibido tratamiento neoadyuvante. Los cirujanos se guían entonces solo por sus sentidos visual y táctil, y por su experiencia. No se dispone por ahora de ninguna técnica intraoperatoria que los ayude a visualizar el alcance del tumor.

30 Se ha sugerido que la cirugía de resección del cáncer puede mejorarse mediante el uso de fotodetección *in situ*. La fotodetección se basa en la exposición de los tejidos potencialmente afectados con un compuesto que tiene afinidad por un tumor y que se consigue visualizar ópticamente a una longitud de onda de luz seleccionada.

35 La fotodetección de tumores se desarrolló originalmente en los años 80 con el uso de derivados de la hematoporfirina, tal como fotofrina. Las principales limitaciones del fotodiagnóstico con estas moléculas son la escasa selectividad de las mismas por los tejidos cancerosos y su capacidad para reaccionar químicamente e inducir alta fotosensibilización o necrosis. Esta última limitación es, en realidad, una ventaja en el tratamiento fotodinámico, para el que también se proponen estos compuestos.

40 Folli et al. utilizaron un conjugado de un anticuerpo contra el antígeno carcinoembrionario (CEA) con fluoresceína para visualizar los tumores en los pacientes con carcinoma colorrectal (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, págs. 7973-7977, 1992). La inmunofotodetección de las lesiones del carcinoma de colon LS174T con un conjugado del mAb anti-CEA 35A7 e indocianina (Cy5) quedó demostrada en un modelo de ratón por Gutowsky et al. (Clin. Cancer Res., vol. 7, pp. 1142-1148, 2001).

45 Sin embargo, la utilidad clínica de estos conjugados es algo escasa. Los conjugados de anticuerpos con fluoresceína poseen una longitud de onda de excitación y de emisión bastante bajas, lo que da lugar a poca penetración de tejido y un grado sustancial de autofluorescencia inespecífica de los tejidos no cancerosos inducidos por el rayo láser utilizado para excitar el componente coloreado. La toxicología de los conjugados con Cy5 es desconocida y no ha sido bien comprobada en la bibliografía.

50 La presente invención aborda estos y otros problemas y desventajas asociados a la fotodetección de tumores. Uno de los objetos de la invención es dar a conocer conjugados mejorados que resulten útiles para la fotodetección de tumores malignos o precancerosos que son clínicamente viables, que superan una o varias desventajas de la técnica anterior, y que tienen una o varias de las siguientes propiedades: un alto grado de especificidad de tumores, una alta sensibilidad de tal manera que permita la detección de lesiones tumorales muy pequeñas, buena tolerancia clínica, alta estabilidad, poca interferencia con otros tintes, y buena capacidad de manufacturación.

Otro objeto de la invención es dar a conocer mejores métodos de diagnóstico para tumores *in vitro* y usos diagnósticos para tumores *in vivo*, mediante el uso de dichos conjugados. *In vivo*, tales usos diagnósticos pueden ser parte de tratamientos novedosos, tal como métodos de resección tumoral mejorados.

Otro objeto de la invención es dar a conocer métodos para preparar dichos conjugados.

- 5 Otros objetos de la invención resultarán claros sobre la base de la siguiente descripción de la invención y las reivindicaciones de patente.

### Compendio de la invención

10 En breve, la invención da a conocer un conjugado fluorescente que comprende un resto de fluorocromo F acoplado a un resto selectivo T, en donde el resto F tiene la fórmula (I) tal como se define más adelante, en donde Y, para cada caso y de forma independiente, es seleccionado entre  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{SO}_3\text{M}$ , en donde M es un catión monovalente; x, z e y son independientemente seleccionados de un entero de 1 a 8; y en donde el resto T tiene afinidad por un marcador tumoral. En una realización, el resto de fluorocromo F puede tener la fórmula (II) tal como se define a continuación.

15 El marcador tumoral por el que el resto selectivo T tiene afinidad puede ser un antígeno tumoral, tal como un antígeno expresado o sobreexpresado por ciertas células tumorales. Un ejemplo de dicho antígeno es el antígeno carcinoembrionario (CEA). El resto selectivo T por sí mismo puede ser un ligando no peptídico, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión que comprende por lo menos una región variable de un anticuerpo. En una realización, el resto selectivo T es un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano.

20 En otro aspecto, la invención da a conocer una composición que comprende dicho conjugado, opcionalmente, en combinación con otros ingredientes activos o inactivos. Por ejemplo, la composición puede ser estéril y comprender ingredientes inactivos, tal como agua para inyección, componentes amortiguadores, uno o varios estabilizantes tal como aminoácidos, accesorios de liofilización tal como mono-, di- u oligosacáridos, agentes de isotonicidad y similares. La composición puede también comprender una pequeña cantidad del resto selectivo T en forma no conjugada.

25 En otro aspecto, la invención da a conocer un método para preparar el conjugado. El método comprende las etapas de (a) dar a conocer un fluorocromo que tiene la fórmula (III) tal como se define más adelante, en donde Y es seleccionado para cada caso y de forma independiente entre  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{SO}_3\text{M}$ , en donde M es un catión monovalente; x, z e y son independientemente seleccionados de un entero de 1 a 8, y Z se selecciona entre un contraión, hidrógeno, succinimidilo, sulfosuccinimidilo, y nitrofenilo; (b) dar a conocer un agente selectivo que tiene afinidad por un marcador tumoral; y (c) acoplar el fluorocromo con el agente selectivo. En una realización, el fluorocromo tiene la fórmula (IV) tal como se define más adelante.

35 Además, la invención da a conocer usos clínicos y no clínicos del conjugado y de la composición que comprende el conjugado. El uso *in vitro* incluye el uso para detectar una célula tumoral o células tumorales en una muestra, o para diagnosticar y/o vigilar un tumor *in vitro*. Clínicamente, el conjugado y/o la composición que comprende el conjugado pueden utilizarse para detectar focos de un tumor que expresa el marcador tumoral o para determinar la ubicación de un tumor que expresa al marcador tumoral en un paciente. Por ejemplo, pueden utilizarse para detectar células tumorales o tejido tumoral en un margen de resección en un paciente que es sometido o que ha sido sometido a cirugía de resección. En una realización, una composición que comprende el conjugado se administra a un paciente que tiene un tumor que expresa el marcador tumoral por el cual el resto selectivo T tiene afinidad, por ejemplo, por inyección intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, o perfusión, o por inhalación o administración tópica, por ejemplo, como un pulverizador; comenzar la cirugía de resección tumoral en el paciente en menos de aproximadamente las 72 horas posteriores, e iluminar un tejido en un sitio de resección del paciente que es sometido a cirugía de resección con luz de longitud de onda de aproximadamente 660 a 700 nm. De esta forma, la localización del tumor, que incluye la localización de nódulos o lesiones muy pequeñas que serían de otro modo invisibles al ojo humano, se visualizarán para que guíen al cirujano en la resección completa del tejido tumoral y/o la verificación de que la resección ha sido completa.

### Breve descripción de los dibujos

50 En la figura 1 se muestra la fluorescencia de los micronódulos tumorales *in situ* (columna A) y ressecados (columna B) en un modelo de ratón de carcinomatosis peritoneal LS-174T, visualizado a 700 nm después de la administración de 20  $\mu\text{g}$  del conjugado fluorescente del ejemplo 3.

55 En la figura 2A se muestran imágenes de tumores en un modelo de ratón de tumor subcutáneo de cáncer colorrectal humano (HT-29) que sobreexpresa el CEA, tomadas 48 horas después de la administración de 30  $\mu\text{g}$  de los conjugados fluorescentes (A: conjugado fluorescente del ejemplo 3; B: conjugado de control). Las columnas de izquierda a derecha muestran las imágenes tomadas con luz blanca, fluorescencia (visualización a 700 nm) y en superposición.

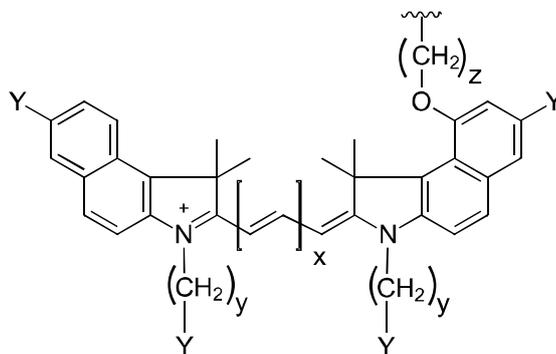
En la figura 2B se muestran imágenes de los tumores en un modelo de ratón de tumor ortotópico de cáncer colorrectal humano (HT-29) que sobreexpresa el CEA, tomadas 48 horas después de la administración de 30  $\mu\text{g}$  del conjugado fluorescente del ejemplo 3 (A: antes de incisión, B: después de incisión, C: después de la exposición del tumor). Las columnas de izquierda a derecha muestran las imágenes tomadas con luz blanca, fluorescencia (visualización a 700 nm) y en superposición.

En la figura 3 se muestran imágenes tomadas durante cirugía de un tumor pancreático primario en un paciente, 48 horas después de la administración de 5 mg del conjugado fluorescente del ejemplo 3 (A está bajo luz blanca, y B es la superposición de imagen con fluorescencia). La línea discontinua representa el margen de resección propuesto en función solamente de la visualización y de la palpación, mientras que la línea continua presenta el margen de resección propuesto en función de la visualización de fluorescencia. La línea punteada representa un diagrama aproximado del tumor tal como se muestra mediante la fluorescencia.

En la figura 4 se muestran imágenes de una metástasis peritoneal de un paciente con cáncer pancreático, 48 horas después de administración de 5 mg del conjugado fluorescente del ejemplo 3. Las imágenes de la fila A se obtuvieron intraoperatoriamente *in vivo* y las imágenes de la fila B son *ex vivo* después de la resección (columna izquierda bajo luz blanca, y columna derecha con fluorescencia como una imagen de superposición).

### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención da a conocer un conjugado fluorescente que comprende un resto de fluorocromo F acoplado a un resto selectivo T, en donde el resto F tiene la fórmula (I):



en donde Y se selecciona independientemente y para cada caso entre  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{SO}_3\text{M}$ ; M es un catión monovalente; x, z e y son independientemente seleccionados de un entero de 1 a 8; y en donde el resto T tiene afinidad por un marcador tumoral.

Los ejemplos para cationes monovalentes incluyen, aunque sin limitarse a ello, Na, K o amonio. En una de las realizaciones preferidas, Y es seleccionado entre  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{SO}_3\text{Na}$ .

El resto F de fluorocromo, que puede también denominarse un tinte o marcación fluorescente, o un resto de fluoróforo, del conjugado fluorescente de la invención absorbe la energía electromagnética en un intervalo de longitudes de onda preferiblemente en el espectro ultravioleta, visible o infrarrojo, y emite en un intervalo de longitudes de onda generalmente más largas, preferiblemente en el margen visible o del infrarrojo cercano. Tal como se entiende en la presente memoria, el término longitud de onda de excitación (expresado en nm) se refiere al pico, es decir, longitud de onda de absorción máxima o específica del fluorocromo, o la del conjugado fluorescente que comprende el resto de fluorocromo acoplado al resto selectivo T. El término longitud de onda de emisión (expresada en nm) se refiere al pico, es decir a la longitud de onda de emisión máxima o específica del fluorocromo o la del conjugado fluorescente que comprende el resto de fluorocromo acoplado a un resto selectivo de la invención.

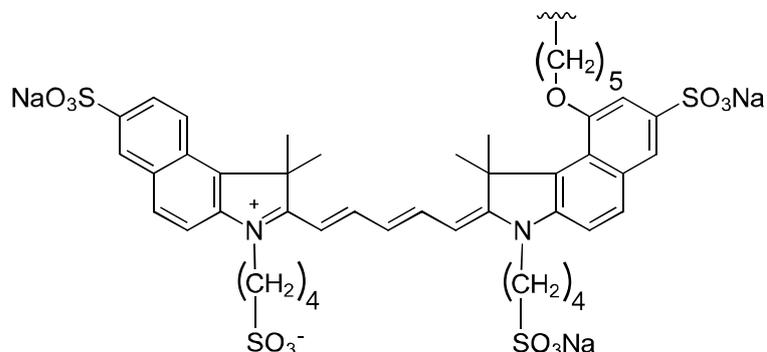
El resto de fluorocromo F es un derivado de cianina de la fórmula (I) tal como se describe más arriba y preferiblemente emite en el espectro visible lejano o infrarrojo cercano (NIR) con un intervalo de longitud de onda de emisión con un máximo entre 650 y 750 nm. Cuando se acopla al resto selectivo T, el conjugado resultante también emite preferiblemente en un intervalo de emisión con un máximo entre 650 y 750 nm.

Los inventores han encontrado que estos restos de fluorocromo tienen características fluorescentes particularmente favorables tales como desactivación, rendimiento cuántico, y en particular robustez con respecto al fotoblanqueo, lo que les permite utilizarlas en forma fiable junto con restos selectivos que son activos contra antígenos

Con respecto a Y, el experto en la técnica apreciará que, dependiendo del medio químico del conjugado, los grupos  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3\text{M}$  y/o  $\text{SO}_3\text{Na}$  pueden también convertirse dinámicamente el uno en el otro. Por ejemplo, cuando se disuelve en un medio acuoso, y dependiendo del pH y de la disponibilidad de otros cationes, un grupo representado por Y y seleccionado entre  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3\text{M}$  y/o  $\text{SO}_3\text{Na}$  puede también protonarse en  $\text{SO}_3\text{H}$ , o puede convertirse en otra

forma de sal tal como de  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $\text{SO}_3\text{K}$  o viceversa. De acuerdo con esto, la presente invención cubre tales formas alternativas del compuesto de la fórmula (I).

Los conjugados particularmente preferidos son los que comprenden un resto de fluorocromo F de la fórmula (II):



- 5 En los conjugados fluorescentes, el resto de fluorocromo F está acoplado a un resto selectivo T; preferiblemente, está covalentemente unido, es decir, conjugado al resto selectivo T, por medio de un enlace covalente tal como un enlace de amida o éster.

Tal como se menciona en el contexto de la fórmula (I), la fórmula (II) debería también interpretarse con respecto a los grupos representados por Y de manera que se incluyan las formas de ácido sulfónico alternativas tales como  $\text{SO}_3\text{H}$  o  $\text{SO}_3\text{K}$  que se generan *in situ* en equilibrio químico, dependiendo de, por ejemplo, la composición y/o el valor de pH de un medio acuoso en donde puede estar disuelto el conjugado. Más aún, debería entenderse que cada uno de los cuatro grupos de ácido sulfónico en la fórmula (II) pueden estar en la forma de la sal de Na o sal interna y que la fórmula (II) tal como se muestra representa solamente una de las diferentes posibilidades de representar el compuesto.

15 Los restos selectivos T de los conjugados fluorescentes tienen afinidad por los marcadores tumorales y pueden unirse o asociarse a un marcador tumoral. Un marcador tumoral debe entenderse como un producto o molécula producido por o presente en un tumor, o producido por mecanismos celulares normales del paciente en respuesta a la presencia de un tumor. Tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que un significado diferente resulte obvio a partir del contexto particular, un tumor significa una neoplasia, que es un grupo o masa de células o tejido que surge a partir del crecimiento de células anormal o descontrolado. En particular, el marcador tumoral lo produce un tumor que es canceroso o maligno.

El marcador tumoral puede estar presente, por ejemplo, en forma de una proteína, una glucoproteína, un receptor, una hormona, una enzima, un antígeno, o un oncogén o un producto de los mismos. El marcador tumoral puede estar sobreexpresado por las células tumorales en comparación con las células normales, o puede ser una sustancia específica del tumor que se produce únicamente en las células tumorales. Los marcadores tumorales particularmente preferidos contra los cuales puede actuar selectivamente o ser dirigido el resto selectivo T son los que son proteínas o receptores de la superficie celular que están presentes en la superficie de la célula tumoral y/o los que se expresan particularmente en las células epiteliales o en los tumores sólidos tal como carcinomas o sarcomas.

En una realización preferida de la invención, el marcador tumoral es un antígeno tumoral. Un antígeno tumoral es una molécula o un producto que es específico de, o se asocia a, las células tumorales (por ejemplo, sobreexpresado en las células tumorales), que pueden inducir o estimular una reacción del sistema inmunitario tal como la producción de anticuerpos y la respuesta celular de linfocitos T y/o linfocitos B. El antígeno tumoral puede representar o comprender una proteína o un lípido. Puede estar glucosilado (por ejemplo, una glucoproteína), y puede poseer uno o varios epítopos, es decir, regiones o dominios a los que un anticuerpo, linfocito B o linfocito T puede preferiblemente unirse o por los que tiene una afinidad particular.

35 Los ejemplos de antígenos tumorales incluyen antígenos derivados o generados de proteínas oncovíricas, antígenos oncofetales que son normalmente producidos en mayor cantidad solamente durante el desarrollo fetal, antígenos que se sobreexpresan o acumulan en la célula tumoral con respecto a una célula normal, o antígenos que son mutantes o se alteran tras la traducción. Preferiblemente, el marcador tumoral es un antígeno tumoral seleccionado entre antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2).

En una realización preferida de la invención, el antígeno tumoral es el antígeno carcinoembrionario (CEA). El CEA es una glucoproteína oncofetal con un peso molecular de 180-200 kDa que se expresa en las células epiteliales. El CEA se expresa en gran cantidad sobre la superficie celular, particularmente en los tumores malignos del colon y recto (sobreexpresado en el 95% de los cánceres colorrectales), así como también en los tumores malignos de estómago, intestino delgado, páncreas, hígado, mama, ovario, cuello de útero, vejiga, vesícula y pulmón. El CEA no suele estar localizado y puede expresarse por toda la superficie celular, así como en la luz intraglandular y la intracelular. El CEA

comprende cinco epítomos principales clasificados como GOLD-1 a GOLD-5, tal como se define en Hammarström et al. (Cancer Res 1989 (49) 4852-4858), al cual un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o proteína de fusión anti-CEA pueden tener especificidad de unión.

5 En una de las realizaciones preferidas, el resto selectivo T del conjugado fluorescente de la invención se dirige y se une a un tumor que expresa el CEA que puede estar localizado en uno o varios tejidos u órganos de un paciente seleccionados entre colon, recto, estómago, intestino delgado, páncreas, hígado, mama, ovario, cuello uterino, vejiga, vesícula, pulmón y esófago.

10 En otra realización preferida, el resto selectivo T del conjugado fluorescente puede unirse a un marcador tumoral que es un receptor. El receptor puede ser específico de célula tumoral o puede estar sobreexpresado y presente en mayor cantidad en las células tumorales. El resto selectivo T puede actuar como un ligando con respecto a tales receptores y puede ser una pequeña molécula no peptídica, es decir, una entidad química o compuesto que no incorpora ni comprende ninguna secuencia de aminoácidos.

15 En una realización preferida, el conjugado fluorescente de la invención comprende un fluorocromo de fórmula (I) o (II) y un resto selectivo T seleccionado entre un ligando no peptídico, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que comprende por lo menos una región variable de un anticuerpo. Preferiblemente, cualquier resto selectivo es capaz de unirse específicamente a un antígeno tumoral tal como CEA, HER2 o EGFR. En una realización específica, el conjugado fluorescente comprende un fluorocromo de la fórmula (I) o (II) y un resto selectivo T seleccionado entre un ligando no peptídico, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una proteína de fusión que comprende por lo menos una región variable de un anticuerpo, cuyo resto selectivo se une específicamente al CEA.

20 En una realización particular, el resto selectivo T es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión que comprende por lo menos una región variable de un anticuerpo. En este caso, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o la por lo menos una región variable de un anticuerpo de una proteína de fusión puede proceder de o pertenecer a cualquiera de los isotipos o clases de inmunoglobulina IgG, IgA, IgD, o IgM. Un anticuerpo completo es típicamente una glucoproteína en forma de Y que comprende un dominio Fc (fragmento cristizable) y un dominio Fab (fragmento de unión al antígeno). Estos se construyen a partir de una pareja de estructuras polipeptídicas de la cadena pesada (H) y de la cadena ligera (L) interconectadas por enlaces disulfuro para formar la estructura con forma de Y. Cada cadena comprende una región variable (V) y una región constante (C). La cadena pesada comprende una región de cadena variable (V<sub>H</sub>) y diferentes regiones constantes (abreviadas C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> etc.); mientras que la cadena ligera solamente comprende una región de cadena variable (V<sub>L</sub>) y una región constante (C<sub>L</sub>). Las regiones variables participan en el reconocimiento y la especificidad de unión del anticuerpo a un epítipo concreto del antígeno, y forman los dominios Fab de unión al antígeno.

25

30

Los fragmentos de anticuerpo se refieren a cualquier región, cadena o dominio de un anticuerpo, o cualquier construcción, forma estabilizada o conjugado de la misma, que es capaz de interactuar y unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos de dominios de unión al antígeno (Fab, o Fab'), construcciones Fab, fragmentos variables de cadena simple (scFv), anticuerpos con un solo dominio tales como VHH, minicuerpos, diacuerpos etc. La proteína de fusión se refiere a una construcción que comprende un fragmento de anticuerpo fusionado con otra proteína bioactiva o polipéptido.

35

En una realización preferida, el resto selectivo T del conjugado fluorescente de la invención es un anticuerpo monoclonal (mAb). Esto puede producirse con los métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales quiméricos son particularmente preferidos. Estos son anticuerpos monoclonales híbridos que comprenden dominios o regiones de cadenas pesada o ligera procedentes de más de una especie, tal como de anticuerpos humanos y murinos. Opcionalmente, el resto selectivo T del conjugado fluorescente puede ser un anticuerpo humanizado (que generalmente comprende de forma predominante por lo menos el 85-95% de secuencias procedentes de humanos) o un anticuerpo humano procedente exclusivamente de secuencia de anticuerpo de línea germinal de humano.

40

45 Preferiblemente, cualquiera de tales restos selectivos T es capaz de unirse específicamente al CEA como antígeno tumoral.

En una realización, el resto selectivo T del conjugado fluorescente que comprende un resto de fluorocromo F de la fórmula (I) es un anticuerpo monoclonal quimérico con especificidades de unión por uno o más de los epítomos del CEA, por ejemplo, los epítomos GOLD-1, GOLD-2, GOLD-3, GOLD-4, o GOLD-5. En una realización específica, el resto selectivo T tiene afinidad y/o especificidad por el epítipo GOLD-2. En otra realización, el resto de fluorocromo F de tales conjugados es de la fórmula (II) tal como se describe más arriba.

50

En una realización particularmente preferida, la invención da a conocer un conjugado fluorescente que comprende un resto de fluorocromo F acoplado a un resto selectivo T, en donde el resto F tiene la fórmula (II), y en donde el resto T es mAb quimérico dirigido contra el epítipo GOLD-2 del CEA, que comprende cadenas pesadas del alotipo G1m3 y cadenas ligeras del alotipo km3, en donde cada cadena pesada y cada cadena ligera comprende por lo menos un dominio variable de IgG1 de ratón y por lo menos un dominio constante humano. Este anticuerpo monoclonal quimérico tiene especificidad de unión, tal como se determina con pruebas de unión/inhibición competitiva conocidas en la técnica, por el epítipo GOLD-2 de CEA.

55

En particular, el conjugado fluorescente puede estar acoplado a un mAb quimérico dirigido contra el CEA que se expresa y prepara a partir de las siguientes secuencias de nucleótidos:

(A) Cadena pesada (SEQ ID n.º: 1):

GGTACCGCCGCCACCATGGACTCCAGACTGAACCTGGTGTTCCTGGTGCTGATCCTGAAG  
GGCGTGCAGTGCACGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGC  
TCCAGAAAGCTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTACCTTCTCCAACCTTCGGCATGCACTGG  
ATCCGGCAGGCCCTGAGAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCTATATCTCCGGCGGCTCCTCC  
ACCATCTACTTCGCCGACACCCTGAAGGGACGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCCCAAG  
AACACCCTGTTTCTGCAGATGACCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCATCTACTACTGC  
GCCAGAGACTACTACATCAACAATACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTGGCACCACC  
GTGACAGTGTCATCTGCTAGC

5 (B) Cadena ligera (SEQ ID n.º: 2):

GTCGACGCCGCCACCATGGAATTTTCAGACCCAGGTGTTTCGTGTTTCGTGCTGCTGTGGCTG  
TCTGGCGTGGACGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCAGAAATTCATGTCCACCTCCGTG  
GGCGACCGGGTGTCCATCACATGCAAGGCCTCTCAGAACGTGCGGAGCGCCGTGGCCTGG  
TATCAGCAGACACCTGGCCAGAGCCCCAAGGCCCTGATCTACCTGGCCTCCAACAGATAC  
ACCGGCGTGCCCGATCGGTTACCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATC  
TCCAACGTGCAGTCCGAGGACCTGGCCGACTACTTCTGTCTGCAACACTGGAACTACCCC  
CTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGTACG

La secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (A) anterior incluye en los extremos 5' y 3', respectivamente, las secuencias para los sitios de restricción KpnI y NheI. La secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera (B) incluye en el extremo 5' y 3' de la secuencia, respectivamente, las secuencias para los sitios de restricción Sall y BsiWI.

10

La secuencia de aminoácidos de las regiones variables de este mAb corresponde a la siguiente secuencia:

(A) Cadena pesada (SEQ ID n.º: 3):

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met His Trp

Ile Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser

Thr Ile Tyr Phe Ala Asp Thr Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys

Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

Ala Arg Asp Tyr Tyr Ile Asn Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr

Val Thr Val Ser Ser

(B) Cadena ligera (SEQ ID n.º: 4):

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val

Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Ser Ala Val Ala Trp

Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Tyr

Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

5 En una realización preferida de la invención, el conjugado fluorescente puede comprender un resto F que tiene la fórmula (II) acoplado a un resto selectivo T, en donde T es un mAb quimérico dirigido contra el CEA que comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID n.º 4 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID n.º 3.

El conjugado fluorescente de la invención puede comprender más de un resto fluorescente F conjugado con un resto selectivo T, tal como desde 1 a aproximadamente 10 restos F por resto selectivo T. Preferiblemente, el número de restos de fluorocromo F acoplados a un resto selectivo T se selecciona de 1 a 4. En otras palabras, en una molécula de dicho conjugado preferido, n restos F están acoplados a un resto T, y n es un entero seleccionado de 1 a 4.

10 Mientras que cada molécula de conjugado se caracteriza porque n es un entero, el compuesto que comprende numerosas moléculas de conjugado puede tener un grado de conjugación, o un número promedio de restos F por resto T, que no tiene que ser un entero, pero que es preferiblemente cualquier valor en el margen de aproximadamente 1 a aproximadamente 4.

15 En este contexto, el resto selectivo T se selecciona preferiblemente entre un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y una proteína de fusión que comprende por lo menos una región variable de un anticuerpo, y uno a cuatro restos de fluorocromo de la fórmula (I) conjugados con ella. En una realización de la invención, el resto selectivo T es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CEA acoplado a n restos de fluorocromo F de la fórmula (II), en donde n está dentro del margen de 1 a 4.

20 Otro aspecto de la invención, se cubre una composición que comprende el conjugado fluorescente tal como se describe más arriba.

25 En una realización, la composición comprende una mezcla de conjugados fluorescentes diferentes que difieren solo o principalmente en su grado de conjugación. En otra realización específica, la composición comprende una mezcla de por lo menos 3 o 4 conjugados, todos los cuales comprenden un resto de fluorocromo F que tiene la fórmula (II) acoplada a un mAb quimérico que tiene afinidad por el epítipo GOLD-2 del CEA, y en donde por lo menos 3 o 4 conjugados difieren entre sí en que el número de restos de fluorocromo F acoplados a un resto selectivo T es 1, 2, 3, respectivamente; o 1, 2, 3, y 4, respectivamente.

30 La composición puede además comprender un compuesto que representa el resto selectivo T en forma no conjugada (o teóricamente, un conjugado con un grado de sustitución de cero). Por ejemplo, en combinación con la realización descrita previamente, dicha composición comprende el mAb quimérico no conjugado que tiene afinidad por el epítipo GOLD-2 del CEA junto con por lo menos tres o cuatro conjugados del mismo mAb acoplado con 1, 2, 3, y opcionalmente 4 o más restos de fluorocromo F de acuerdo con la fórmula (II), respectivamente. Las poblaciones de conjugados de esta mezcla pueden determinarse mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF).

35 El grado promedio de conjugación de los conjugados en la composición es preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3. El grado de conjugación es la relación molar de fluorocromo por anticuerpo que puede determinarse espectrofotométricamente. Así, la cifra debería entenderse de modo que refleje el grado promedio de conjugación de los conjugados y cualquier anticuerpo no conjugado presente en la composición. En otra realización, el grado promedio de sustitución es de aproximadamente 1 a aproximadamente 2. Los inventores han encontrado que mientras que un mayor grado de sustitución puede proporcionar una visualización mejorada, la afinidad por el marcador tumoral que tiene el resto selectivo se reduce con un mayor número de restos de fluorocromo conjugados  
40 con el mismo. Se determinó que funciona mejor un grado de sustitución de aproximadamente 0,5 a aproximadamente

3, en particular para las composiciones que comprenden conjugados de un mAb quimérico que tiene afinidad por el epítipo GOLD-2 del CEA, con un fluorocromo de acuerdo con la fórmula (II) ya que durante la cirugía permite una visualización excelente de los nódulos, incluso los pequeños, de un tumor que expresa el CEA.

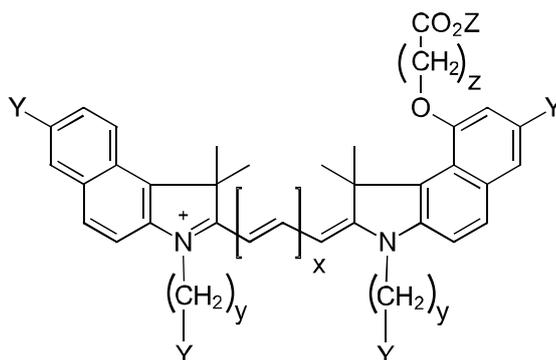
5 La composición de la invención puede además comprender excipientes tales como amortiguadores, estabilizantes, crioprotectores y agentes de isotonicidad, agentes de ajuste de pH. Los excipientes particularmente preferidos son los aminoácidos básicos tal como L-arginina y sales de la misma, sales tal como citrato, sales de fosfato de sodio o potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, glúcidos tales como trehalosa, manitol, maltosa, sacarosa o dextrano, o un tensoactivo no iónico tal como un polisorbato o un poloxámero. El pH de la composición está preferiblemente entre 5,2 y 7,2. Preferiblemente, la composición se preparaba en las condiciones estériles conocidas en la técnica, y está estéril.

10 En una realización particular, la composición que comprende cualquiera de los conjugados fluorescentes definidos más arriba es estéril y además comprende un amortiguador acuoso y L-arginina, y/o comprende un compuesto que comprende un resto T que no está acoplado al resto F. En otra realización adicional, la composición que comprende cualquiera de los anteriores conjugados fluorescentes es estéril y comprende un amortiguador acuoso ajustado a un pH de aproximadamente 6,0, hidrocloreto de L-arginina, y un polisorbato, preferiblemente polisorbato 20. También puede incluirse opcionalmente en estas composiciones un glúcido tal como trehalosa, manitol, maltosa o sacarosa.

15 En otra realización particular, la concentración del conjugado fluorescente en la composición, en función del contenido del resto selectivo, por ejemplo el mAb anti-CEA (según se determina por métodos de espectrofotometría o HPLC conocidos en la técnica) está entre 1 mg/mL y 10 mg/mL.

20 Otro aspecto más de la invención da a conocer un método para la preparación de un conjugado fluorescente que comprende las etapas de:

(a) dar a conocer un fluorocromo que tiene la fórmula (III):



25 en donde Y se selecciona independientemente y para cada caso entre SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>3</sub>M, en donde M es un catión monovalente; x, z e y son independientemente seleccionados de un entero de 1 a 8, y Z se selecciona entre un contraión, hidrógeno, succinimidilo, sulfosuccinimidilo, y nitrofenilo; (b) dar a conocer un agente selectivo que tiene afinidad por un marcador tumoral; y (c) acoplar el fluorocromo con el agente selectivo.

Los ejemplos para cationes monovalentes incluyen, sin limitación, Na, K o amonio. En una de las realizaciones preferidas, Y se selecciona entre SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>3</sub>Na.

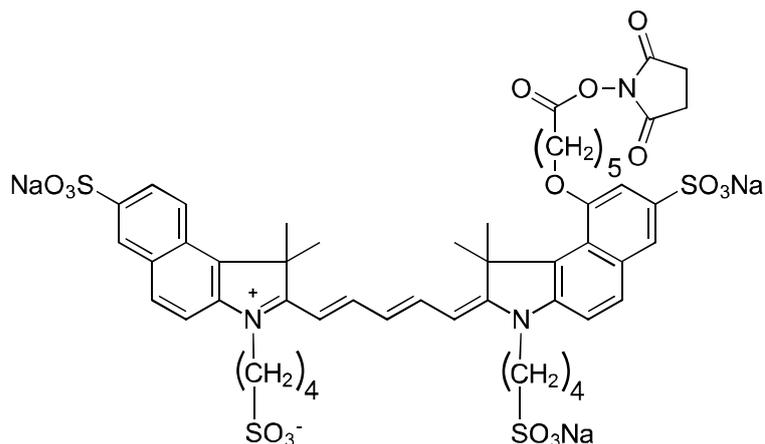
30 Los conjugados fluorescentes de la invención que comprenden un resto de fluorocromo F acoplado a un resto selectivo T, en donde el resto F tiene la fórmula (I) y en donde el resto selectivo T tiene afinidad por un marcador tumoral pueden obtenerse mediante dichos métodos de preparación.

35 Las mismas opciones y preferencias con respecto al resto selectivo T y al resto de fluorocromo F tal como se describe en el contexto del conjugado mismo en cualquiera de los párrafos anteriores también se aplican al agente selectivo y al fluorocromo a ser utilizado en el método. De acuerdo con esto, el agente selectivo es preferiblemente un compuesto que comprende el resto T del conjugado, y el fluorocromo utilizado en el método es preferiblemente un compuesto que comprende, o produce, el resto de fluorocromo F del conjugado. El agente selectivo tiene afinidad preferiblemente por un antígeno tumoral, tal como el antígeno carcinoembrionario (CEA). La afinidad por el CEA puede ser por cualquiera de sus epítipos conocidos, tal como el epítipo GOLD-2. En una realización particularmente preferida, el agente selectivo es un anticuerpo monoclonal quimérico que tiene afinidad por el CEA.

40 El anticuerpo monoclonal quimérico (mAb) que tiene afinidad por el CEA se puede producir por medio de expresión a partir de las células CHO que han sido transfectadas con un vector de expresión que codifica el mAb quimérico. Preferiblemente, el vector de expresión comprende secuencias de nucleótidos que codifican los dominios constantes humanos de anticuerpos y los dominios variables murinos de anticuerpos anti-CEA, preferiblemente dominios variables con la secuencia que se describe más arriba.

Los fluorocromos útiles para preparar los conjugados pueden prepararse en analogía con el esquema de reacción del diagrama la y los métodos descritos en la patente de los Estados Unidos US 8.034.626. Por ejemplo, los fluorocromos pueden sintetizarse a partir de la condensación de dos derivados de indolenina que comprenden las sustituciones de sulfonato y (alquil)oxi necesarias, en donde uno de los derivados de indolenina está en forma de un derivado de acetanilido. En una realización, un intermedio de indolenina puede prepararse a partir de un precursor aminoaromático, a través de las etapas de diazotación/reducción seguidas por las etapas de sulfonación, hidroxilación, ciclación de Fischer con una cetona para la indolenina, carboxilalquilación del sustituyente hidroxilo y cuaternización con una sulfona.

En otra realización, el fluorocromo es un compuesto de la fórmula (IV):



Los fluorocromos de la invención pueden estar activados, preferiblemente como un éster activo (por ejemplo, éster de succinimidilo) para la conjugación con un resto selectivo T. En una realización, el fluorocromo de la fórmula (I) o (II) se acopla al resto selectivo T por medio de enlaces amida, éster, tioéster, disulfuro o carbamato, mediante el uso de los métodos de acoplamiento covalente conocidos en la técnica. En otra realización de la invención, cuando el resto selectivo T es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o secuencia peptídica, el fluorocromo está preferiblemente conjugado a través de los grupos amino libres del resto selectivo T mediante un enlace amida.

Otro aspecto de la invención da a conocer el uso *in vitro* de los conjugados fluorescentes que comprenden un resto de fluorocromo F acoplado a un resto selectivo T que tiene afinidad por un marcador tumoral, en donde el resto F tiene la fórmula (I) o (II), o para el uso *in vitro* de una composición que comprende dichos conjugados fluorescentes, para la detección de una célula tumoral en una muestra, o para diagnosticar y/o vigilar un tumor.

En particular, los conjugados fluorescentes pueden utilizarse para la detección de células tumorales y tumores que expresan un antígeno tumoral tal como el CEA. En tales casos, el resto selectivo T es preferiblemente seleccionado entre un ligando no peptídico, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y una proteína de fusión que comprende por lo menos una región variable de un anticuerpo, tal como se define en cualquiera de las preferencias y opciones previamente descritas. El conjugado fluorescente puede utilizarse para la detección de una célula tumoral o puede usarse para diagnosticar o ayudar al diagnóstico de una afección cancerosa mediante pruebas *in vitro* de una muestra obtenida de un paciente a partir de un líquido corporal, tal como suero sanguíneo, o de una biopsia de tejido. Preferiblemente, el tumor es un tumor sólido, tal como se obtiene o extrae de colon, recto, estómago, intestino, colédoco, páncreas, esófago, ovario, mama, próstata, hígado o pulmón. Además, los conjugados fluorescentes pueden ser útiles para vigilar la presencia o progresión de un tumor, por ejemplo, para la valoración de células tumorales o tejido tumoral residuales después de cirugía de resección y/o quimioterapia.

En otro aspecto adicional, la invención da a conocer el uso del conjugado y/o la composición que comprende el conjugado tal como se describe en la presente memoria como un medicamento. Tal como se utiliza en la presente memoria, un medicamento significa un material o producto que es administrado con algún fin médico, tal como para diagnóstico o tratamiento, que incluye el tratamiento profiláctico de una enfermedad o afección de un paciente humano o de un animal. En particular, la invención da a conocer el uso del conjugado y/o la composición que comprende el conjugado tal como se describe en la presente memoria como un medicamento o agente para diagnóstico. El uso comprende la administración única o repetida del conjugado, o de la composición, al paciente que lo necesita. En una realización, el paciente que necesita el conjugado o la composición es un paciente que ha desarrollado un cáncer, o que se encuentra en riesgo de desarrollar un cáncer.

La invención da a conocer además el uso de conjugados fluorescentes y/o composiciones de los mismos en la detección de los focos de un tumor que expresa el marcador tumoral o para determinar la ubicación de un tumor que expresa el marcador tumoral en un paciente. El uso puede ser particularmente ventajoso en los pacientes afectados por un cáncer caracterizado por una progresión de la enfermedad tal como recidiva, metástasis o diseminación. Dicha progresión del cáncer puede acabar en una distribución más amplia de las células tumorales o de las masas de tejido.

En particular, los conjugados fluorescentes y las composiciones pueden utilizarse para detectar focos o para determinar la ubicación de un tumor que expresa el marcador tumoral o antígeno tumoral, es decir, el marcador tumoral por el cual tiene afinidad el resto T, preferiblemente en la superficie celular. Tal como se entiende en la presente memoria, el término foco significa el grupo o aglomeración de células o tejido que define un tumor o una lesión que puede desarrollarse en un tumor y distinguirlo del tejido normal circundante.

En una realización preferida, el tumor expresa el CEA. En otra realización preferida, el paciente tiene cáncer colorrectal o digestivo. En la manifestación avanzada de tales cánceres, el paciente puede tener carcinomatosis peritoneal, en la que se producen metástasis generalizadas de tumores cancerosos en el revestimiento de la cavidad peritoneal. En una realización particular de la invención, el conjugado fluorescente que comprende un resto de fluorocromo de la fórmula (I) o (II) y un resto selectivo T que es un anticuerpo monoclonal quimérico se utiliza para la detección de focos de un tumor que expresa el CEA o para determinar la ubicación de un tumor que expresa el CEA en un paciente.

Durante la resección quirúrgica de tejido tumoral, el cirujano se basa en la apariencia visual y palpación para discriminar entre el tejido tumoral y el tejido normal. La resección quirúrgica es la eliminación quirúrgica, ya sea por completo o de forma parcial, del tejido tumoral presente en el tejido, estructura u órgano de un paciente. El tejido tumoral canceroso y maligno puede a menudo estar presente en nódulos pequeños o lesiones (por ejemplo, de tamaño submilimétrico) que no son visibles a simple vista. La resección tumoral completa es a menudo crítica para el pronóstico de un paciente y como tal, es importante que un cirujano sea capaz de identificar correctamente, distinguir los límites y márgenes de tejido tumoral maligno del de tejido sano y reseca dichos tejidos tumorales, así como evitar la eliminación o daño innecesarios de tejido o estructuras sanas durante la retirada quirúrgica de un tumor y/o tratamiento quirúrgico citorreductor de un paciente.

El conjugado fluorescente que está descrito más arriba y/o la composición que comprende tal conjugado han resultado particularmente útiles para la detección de células tumorales o tejido tumoral en un margen de resección de un paciente sometido, o que se ha sometido, a cirugía de resección de un tumor que expresa el marcador tumoral. Tal como se entiende en la presente memoria, el término margen de resección se refiere a un margen o borde de tejido que rodea el tejido tumoral. El margen de tejido que rodea al tumor resecado debería normalmente ser tejido no canceroso que se extirpa junto con el tumor para garantizar la suficiente eliminación de todo tejido tumoral maligno, aunque, tal como se describe más arriba, puede ser difícil determinar la extensión del margen y/o la extensión del tumor hacia el tejido normal. Opcionalmente, el margen de resección puede también entenderse como el margen de resección deseado, que puede determinarse o modificarse en función del uso del método de la invención.

El método para detectar células tumorales o tejido tumoral en un margen de resección, o cerca de él, en un paciente sometido, o que se ha sometido, a cirugía de resección de un tumor que expresa un marcador tumoral, preferiblemente en donde el marcador tumoral es un antígeno tumoral, mediante el uso de los conjugados fluorescentes de la invención o composiciones de los mismos es útil para ayudar a los cirujanos durante la cirugía y tras ella, por ejemplo, cirugía citorreductora, de manera que se garantiza que se ha retirado todo el tejido tumoral y que se pueden obtener márgenes limpios (o negativos), es decir, márgenes en donde no se detectan células tumorales. En una realización preferida, la cirugía de resección es de un tumor que expresa o sobreexpresa el CEA.

El conjugado fluorescente o composición de la invención y tal como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, puede utilizarse para la detección de células tumorales o tejido tumoral, tal como la detección del foco de un tumor y/o la determinación de su ubicación, así como en un margen de resección de un tumor de un paciente durante o con posterioridad a la resección quirúrgica de un paciente, en donde el paciente tiene cáncer colorrectal, gástrico, biliar, pancreático, esofágico, ovárico, mamario, de próstata, hígado o pulmón. La célula o tejido tumoral a detectar o a localizarse puede estar en forma de carcinoma o sarcoma que expresa el CEA. Preferiblemente, los conjugados fluorescentes se utilizan para la detección de nódulos o lesiones tumorales en el orden de tamaño submilimétrico, por ejemplo, en los pacientes que sufren carcinomatosis peritoneal.

En una realización particular del uso del conjugado fluorescente o composición de la invención para detectar o para localizar células tumorales o tejido tumoral, o para detectar los márgenes de resección de un tumor durante o con posterioridad a la cirugía de resección, el tumor es un tumor digestivo maligno y el conjugado fluorescente comprende un resto de fluorocromo F de la fórmula (I), o preferiblemente de la fórmula (II), acoplado a un resto selectivo T que es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el epítipo GOLD-2 del CEA, que comprende cadenas pesadas del alotipo G1m3 y cadenas ligeras del alotipo km3, en donde cada cadena pesada y cada cadena ligera comprende por lo menos un dominio variable de IgG1 de ratón y por lo menos un dominio constante humano. El tumor digestivo puede hacer referencia a un tumor localizado en cualquier parte del tubo digestivo, por ejemplo en el esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto, así como los órganos asociados a la digestión tal como páncreas, hígado y vesícula biliar, y puede encontrarse en el rango de tamaño submilimétrico. Particularmente preferidos para este uso son los conjugados en donde dicho anticuerpo monoclonal quimérico comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID n.º 4 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID n.º 3.

En otra realización particular del uso de los conjugados fluorescentes de la invención para detectar o localizar células tumorales o tejido tumoral, o para detectar los márgenes de resección de un tumor durante o después de la cirugía de resección, el tumor es un tumor mamario (maligno) y el conjugado fluorescente utilizado comprende un resto de fluorocromo F de la fórmula (I), o preferiblemente de la fórmula (II) acoplado a un resto selectivo T que es un anticuerpo

5 monoclonal quimérico dirigido contra el epítipo GOLD-2 del CEA, que comprende cadenas pesadas del alotipo G1m3 y cadenas ligeras del alotipo km3, en donde cada cadena pesada y cada cadena ligera comprende por lo menos un dominio variable de IgG1 de ratón y por lo menos un dominio constante humano. Particularmente preferidos para dicho uso son los conjugados en donde dicho anticuerpo monoclonal quimérico comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID n.º 4 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID n.º 3. El tumor mamario tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a un tumor localizado en cualquier tejido asociado a las mamas o tejido mamario, que incluye tejido glandular o ductal y puede también incluir nódulos linfáticos regionales, tal como los que se encuentran en la axila. Dichos tumores pueden estar en el orden submilimétrico de tamaños.

10 En otro aspecto, el uso de los conjugados fluorescentes o composiciones de la invención tal como para la detección de focos de tumores y la determinación de su ubicación, o para la detección de células tumorales o tejido tumoral en un margen de resección en un paciente sometido o que se ha sometido a cirugía de resección de un tumor, comprende las etapas de:

(a) administrar el conjugado o composición a un paciente que padece un tumor;

(b) comenzar la cirugía de resección tumoral en dicho paciente;

15 (c) iluminar un tejido en un sitio de resección del paciente que se somete a cirugía de resección con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 660 a 700 nm,

en donde la etapa (b) se realiza dentro de un período de no más de aproximadamente 96 o 72 horas después de la etapa (a).

20 Como otra alternativa, todos los usos diagnósticos y/o terapéuticos del conjugado o composición que se describen en la presente memoria pueden también expresarse como usos del conjugado o composición en la fabricación de un medicamento o agente de diagnóstico (útil) para los usos de diagnóstico y/o terapéuticos especificados.

25 En la etapa (a) del tratamiento de pacientes que padecen un tumor, los conjugados fluorescentes o composiciones de los mismos pueden administrarse mediante métodos de inyección o perfusión conocidos en la técnica. En particular, los conjugados o composiciones pueden administrarse por inyección o perfusión intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Como alternativa, los conjugados fluorescentes o composiciones de los mismos pueden administrarse por inhalación o por vía tópica. En este contexto, la administración tópica incluye la administración directa en la piel o en una membrana mucosa externa o interna. La inhalación puede ser útil para el tratamiento de pacientes que tienen un tumor en el aparato respiratorio, por ejemplo, en el pulmón. Cuando se administran por vía tópica, los conjugados fluorescentes o composiciones de los mismos se administran preferiblemente en forma de pulverización.

30 El conjugado se administra preferiblemente al paciente en una dosis de 0,1 a 50 mg o en una dosis de 5 mg a 100 mg. En este contexto, la dosis significa la cantidad del conjugado y, si estuviera presente, del anticuerpo no conjugado que se administra antes de, por ejemplo, un procedimiento quirúrgico o de diagnóstico. La dosis puede opcionalmente dividirse y administrarse en intervalos. En el caso de la administración por inyección a un paciente con cáncer colorrectal, gástrico, biliar, pancreático, esofágico, ovárico, mamario, de próstata, hígado o pulmón y que se somete a cirugía de resección, la dosis está preferiblemente en el orden de aproximadamente 0,2 a 15 mg, tal como de 0,5 a 10 mg o de 5 a 15 mg. Preferiblemente, la dosis administrada es por lo menos de 5 mg. Estos intervalos de dosis se aplican particularmente a los conjugados y composiciones que tienen el grado preferido de sustitución tal como se describe más arriba.

40 Preferiblemente, la etapa (b) se realiza dentro de un período de no más de aproximadamente 96 horas después de la etapa (a). En otras realizaciones, la etapa (b) se realiza dentro de un período de no más de 72 horas, o no más de 48 horas, o no más de 36 horas, o no más de 24 horas, o no más de 12 horas después de completada la etapa (a).

45 En la etapa (c) del tratamiento, el tejido en el sitio de resección del paciente que se somete a cirugía de resección se ilumina con una longitud de onda dentro de la región infrarroja cercana. Los dispositivos ópticos para iluminación utilizados en la etapa (c) actúan selectivamente de manera preferible a la longitud de onda de excitación de los conjugados fluorescentes, preferiblemente a una longitud de onda entre 660 y 700 nm. En una realización del método, la etapa (c) se realiza por iluminación del tejido en un sitio de resección del paciente que se somete a cirugía de resección a una longitud de onda de excitación de 680 nm.

50 En una realización particularmente preferida del tratamiento de un paciente que tiene un tumor, el tumor es un tumor digestivo maligno, y el conjugado fluorescente comprende un resto de fluorocromo F de la fórmula (I), o preferiblemente de la fórmula (II) acoplado a un resto selectivo T que es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el epítipo GOLD-2 del CEA, que comprende cadenas pesadas del alotipo G1m3 y cadenas ligeras del alotipo km3, en donde cada cadena pesada y cada cadena ligera comprende por lo menos un dominio variable de IgG1 de ratón y por lo menos un dominio constante humano.

55 En otro aspecto adicional de la invención, el conjugado fluorescente tal como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores puede también comprender o incorporar un isótopo radioactivo, un radiomarcador o un radiotrazador. El conjugado fluorescente radiomarcado puede, por ejemplo, obtenerse mediante la radiomarcación

directa del conjugado, o por aplicación del radiomarcador al resto selectivo T antes de la conjugación. Los conjugados fluorescentes radiomarcados y las composiciones de los mismos pueden utilizarse como medicamentos en las aplicaciones terapéuticas y/o diagnósticas. En una realización, el sujeto al cual se le administra el conjugado radiomarcado o la composición del mismo es un sujeto que ha desarrollado un cáncer o que se encuentra en riesgo de desarrollar un cáncer.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Preparación del anticuerpo monoclonal quimérico anti-CEA

Diseño de genes y síntesis

Las secuencias de nucleótidos (A) y (B) que vienen a continuación, que codifican los dominios variables V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> murinos nativos, respectivamente, se obtuvieron de un hibridoma de anticuerpo anti-CEA murino, y se sintetizaron *de novo* y se clonan en vectores de expresión Tandem pVVS hospedadores. Estas secuencias incorporan un número de modificaciones de nucleótidos (sin cambiar la secuencia nativa de la proteína) que garantizan la clonación optimizada y la expresión optimizada en las células CHO. Los sitios de restricción KpnI y NheI están insertados respectivamente en los extremos 5' y 3' de la secuencia que codifica el dominio V<sub>H</sub>. En forma similar, dos secuencias correspondientes a los sitios de restricción Sall y BsiWI se insertaron, respectivamente, en los extremos 5' y 3' de la secuencia que codifica el dominio V<sub>L</sub>.

(A) Cadena pesada (SEQ ID n.º 1):

**GGTACCGCCGCCACCATGGACTCCAGACTGAACCTGGTGTTCCTGGTGCTGATCCTGAAGG  
GCGTGCAGTGCAGCGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTC  
CAGAAAGCTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACCTTCGGCATGCACTGGATCC  
GGCAGGCCCTGAGAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTATATCTCCGGCGGCTCCTCC  
ACCATCTACTTCGCCGACACCCTGAAGGGACGGTTCACCATCTCCGGGACAACCCCAAG  
AACACCCTGTTTCTGCAGATGACCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCATCTACTACTGC  
GCCAGAGACTACTACATCAACAACACTACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTGGCACCACC  
GTGACAGTGTCATCTGCTAGC**

(B) Cadena ligera (SEQ ID n.º 2):

**GTCGACGCCGCCACCATGGAATTTTCAGACCCAGGTGTTTCGTGTTTCGTGCTGCTGTGGCTG  
TCTGGCGTGGACGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCAGAAATTCATGTCCACCTCCGTG  
GGCGACCGGGTGTCCATCACATGCAAGGCCTCTCAGAACGTGCGGAGCGCCGTGGCCTGG  
TATCAGCAGACACCTGGCCAGAGCCCCAAGGCCCTGATCTACCTGGCCTCCAACAGATAC  
ACCGGCGTGCCCGATCGGTTACCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTCACCCTGACCATC  
TCCAACGTGCAGTCCGAGGACCTGGCCGACTACTTCTGTCTGCAACACTGGAACACTACCC  
CTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAACCTGAAGCGTACG**

Síntesis de vector

El vector Tandem pVVS que se seleccionó para servir de vector hospedador de los genes de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se preparó mediante digestiones dobles secuenciales con Sall/BsiWI y KpnI/NheI. Este vector de expresión codifica las secuencias de los dominios constantes de alotipo de IgG1 humano G1m3 para la cadena pesada y de alotipo de IgG1 humano Km3. El vector además comprende los siguientes elementos funcionales: un promotor pCMV (para las cadenas pesada y ligera), un intrón quimérico entre el promotor y el codón de iniciación para traducción, el origen de replicación de pUC, un sitio de poliadenilación de BGH, el aislador HS4 TK poliA, un promotor SV40 y genes de resistencia a kanamicina/neomicina para la selección celular durante la amplificación de vector y después de la transfección. Después de la digestión, los fragmentos resultantes del esqueleto del vector se recuperaron mediante purificación en gel.

Los fragmentos de inserto que comprenden los insertos de genes de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> sintéticos que codifican los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> murinos nativos tal como se describe más arriba se extraen a partir de sus respectivos vectores de expresión Tandem PVVS que utilizan KpnI/NheI y Sall/BsiWI respectivamente, y se recuperan por purificación en gel.

Todos los fragmentos recuperados se agruparon y se ligaron para generar el vector final para transfección.

## Transfección/selección

Las células CHO transfectadas por el vector que se describe más arriba proceden de la línea de células CHO (libre de proteína) (referencia # 00102307, lote 02K/008) obtenido de la Colección Europea de Cultivos de Células (European Collection of Cell Cultures [ECACC]). Esta línea celular, originalmente adquirida por ECACC en 1985, es un subclon de la línea celular CHO parental procedente del tejido de ovario de hámster e inicialmente consolidada por Puck et al. (1958).

El banco derivado del vial de la ECACC se denominó Bk1998. Las células se adaptaron para crecer sin suero bovino fetal, y después se clonaron mediante diluciones limitantes. El subclon PF 3B9 fue seleccionado sobre la base de las propiedades de crecimiento y de la capacidad de transfección, y se colocó en el banco (banco de células Bk4164). El banco de células BK4164, utilizado para generar el sustrato celular para producción de anticuerpos del anticuerpo, se preparó a partir de un vial de Bk21146.

Las células CHO obtenidas a partir del subclón 3B9 se descongelaron originalmente en el medio para CHO ACF (sin componentes animales) EX-CELL® complementado con L-glutamina a 4 mM y se dejaron crecer a 37°C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% en agitación orbital. La transfección se realizó 2 días después del quinto pase. El vector de expresión tal como se prepara más arriba fue linealizado por digestión con la enzima de restricción SmaI. La transfección se realizó por triplicado con Nucleofection™ (Amaxa) con 10 µg de ADN y se incubó a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% sin agitación durante 3 días. Después de un período de recuperación de 3 días, la selección se inició mediante la adición de geneticina (0,5 g/L). Las células sometidas a las condiciones de Nucleofection™ sin ADN se utilizaron como control de selección del antibiótico.

La clonación por dilución límite se realizó después de que la viabilidad celular alcanzara por lo menos el 80% bajo presión de selección con geneticina. Para cada uno de los 3 grupos de transfección, se sembraron cuarenta placas de 96 pocillos a una densidad celular deseada de 0,5 células/pocillo. De estos grupos, se obtuvieron 475 clones a partir de una célula única. Después de aproximadamente 18 días de cultivo, la concentración de anticuerpos se evaluó mediante ELISA para seleccionar los 150 clones de mejor producción para escalado en placas de 24 pocillos. Después de que las células alcanzaron suficiente densidad, se transfirieron a placas de 6 pocillos. Se realizó una posterior selección en función de la cinética por lotes de 10 días y la producción de mAb se valoró mediante FastELISA para el escalado de frasco en agitación. La posterior selección basada en la cinética de alimentación por lotes y producción de mAb se valoró mediante HPLC con proteína A (escalado hasta biorreactores de 2 L) dio lugar a la selección de un clon líder para la producción de anticuerpos.

## Producción de anticuerpos

Las células del clon líder se descongelaron y se transfirieron al medio de revitalización (medio EX-CELL® ACF para CHO, L-glutamina a 4 mM). Se determinó la densidad de células viables y después de la centrifugación, los sedimentos celulares se resuspendieron en el medio a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mL después de la siembra en un frasco de 75 cm<sup>2</sup>. Las células se hicieron crecer a 37°C ± 1°C, con CO<sub>2</sub> al 8% ± 2% con oscilación orbital. A partir del día 2, el cultivo se escaló en frascos en agitación de mayor capacidad en el medio EX-CELL® ACF para CHO, con L-glutamina a 4 mM, a 37°C ± 1°C, con CO<sub>2</sub> al 8% ± 2% con oscilación orbital. La viabilidad, densidad y crecimiento celulares se valoraron en cada pase y la ausencia de contaminantes se verificó por inspección al microscopio. El día 17, después de 7 pases, se reunió el contenido de los frascos en agitación. Las células se cuentan y se utilizan para sembrar dos biorreactores de 15 L a una densidad de  $0,5 \times 10^6$  células viables/mL en un volumen de 7 L. Las células se hicieron crecer en un cultivo de alimentación por lotes en el medio EX-CELL® ACF para CHO, con L-glutamina a 5 mM, plurónico al 0,2%, a 37°C con pH y regulación de oxígeno durante 20 días. Se agregó BalanCD™ CHO Feed 3, glucosa y L-glutamina en la cantidad necesaria. La densidad, viabilidad y pH celulares se evaluaron diariamente; también se tomaron muestras diariamente desde el día 6 para determinar la concentración de glucosa y desde el día 10 para valorar la concentración de anticuerpos (HPLC con proteína A).

El aclaramiento se realiza el día 20 al hacer pasar la suspensión celular desde cada biorreactor a través de tres filtros de profundidad en paralelo y después directamente a través de un filtro de 0,2 µm. Se reúne lo recogido a granel clarificado y se le analiza el contenido de anticuerpos mediante HPLC con proteína A, la identidad de la proteína recombinante por análisis de transferencia Western, la carga biológica, la contaminación de micoplasmas y espiroplasma. La recolección a granel se distribuye en botellas para PET de 2 L y se conserva entre -70°C y -90°C.

El posterior procesamiento de la recolección a granel se realiza de la siguiente manera: la recolección a granel clarificada se descongela durante 24 horas a 15-25°C, y se agrupan el contenido de diferentes botellas y se homogeniza mediante agitación magnética. La recolección a granel agrupada es primero purificada en una columna de cromatografía por afinidad con proteína A equilibrada con un amortiguador de fosfato de sodio a 50 mM, NaCl a 300 mM, pH 7,0. Después de los lavados con el amortiguador de equilibrado y después con un amortiguador de fosfato de sodio a 25 mM, pH 7,0, el anticuerpo utilizando se eluye con un amortiguador de acetato de sodio a 25 mM y pH 3,5. Se recolecta el pico de anticuerpo (basándose en la absorbancia del eluyente a 280 nm) y el eluido de anticuerpo se mantiene a 15-25°C antes de la etapa de ajuste de pH.

El pH del eluido de anticuerpo se ajusta a pH 3,8 con ácido cítrico a 0,2 M y se incuba durante 60-65 min a 15-25°C mientras se agita. Después de la neutralización a pH 6,5 con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,5 M, se filtra la solución por un filtro de 0,2 µm, se recolecta y se conserva a 2-8°C.

5 La solución de anticuerpo inactivada por pH se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico con una resina de ligando sulfonato. El pH de la solución se ajusta a 5,0 con ácido cítrico a 0,2 M y se carga sobre una columna previamente equilibrada con amortiguador de acetato de sodio a 25 mM, pH 5,0. Después de los lavados con amortiguador de equilibrado, el anticuerpo se eluye con amortiguador de acetato de sodio a 25 mM, NaCl a 195,2 mM, pH 5,0. La recolección se basa en la absorbancia a 280 nm.

10 La solución de anticuerpo resultante se purifica adicionalmente por cromatografía de intercambio aniónico con membranas de intercambio iónico de amonio cuaternario equilibradas en amortiguador de fosfato de sodio a 24 mM, NaCl a 53,4 mM, pH 7,0. El pH del eluido de la cromatografía de intercambio catiónico se ajusta a pH 7,0 con amortiguador de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,5 M y se diluye con un amortiguador de fosfato de sodio a 25 mM, pH 7,0, para alcanzar una conductividad final de 11 mS/cm. La solución se carga en las membranas y el anticuerpo se recoge en el flujo continuo basándose en la absorbancia a 280 nm. La solución recolectada se filtra por un filtro de 0,2 µm en un vial para PET de uso único y estéril, y se conserva a 2-8°C.

15 La solución de anticuerpo se concentra después por ultrafiltración y se diafiltra contra un amortiguador de Tris-HCl a 10 mM, pH 7,2, con membranas de corte a 30 kDa. Se recolecta la fracción retenida de la filtración y se conserva a 15-25°C.

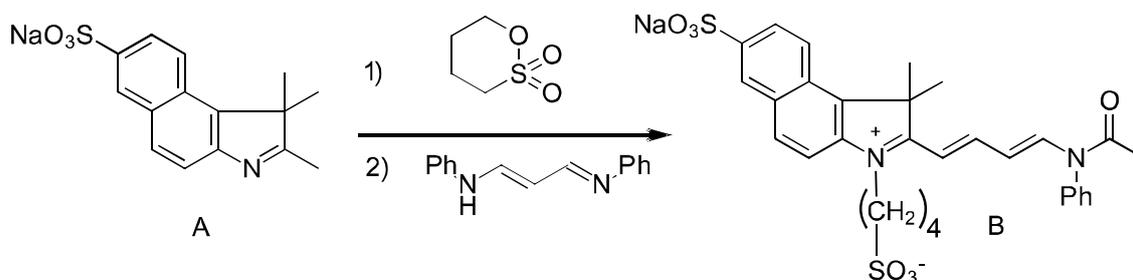
20 La fracción retenida se diluye después hasta 1 mg/mL con un amortiguador de Tris-HCl a 10 mM, pH 7,2, y se hace pasar a través de un filtro de 0,2 µm, seguido por nanofiltración (membrana Planova 15 N) previamente equilibrada con el mismo amortiguador. El filtrado se conserva a 15-25°C. En una etapa final, la solución resultante de anticuerpo a granel purificado se filtra a través de un filtro de 0,2 µm, se distribuye en botellas de PET estériles y se conserva entre -70 y -90°C.

25 Se toman las muestras para la determinación de la concentración de anticuerpo mediante HPLC con proteína A durante cada una de las etapas de purificación.

El producto de anticuerpo resultante se caracterizó por los métodos conocidos en la técnica, tal como UPLC-UV-MS. El peso molecular del anticuerpo es de 148,6 kDa según se determina por espectrometría de masas MALDI-TOF.

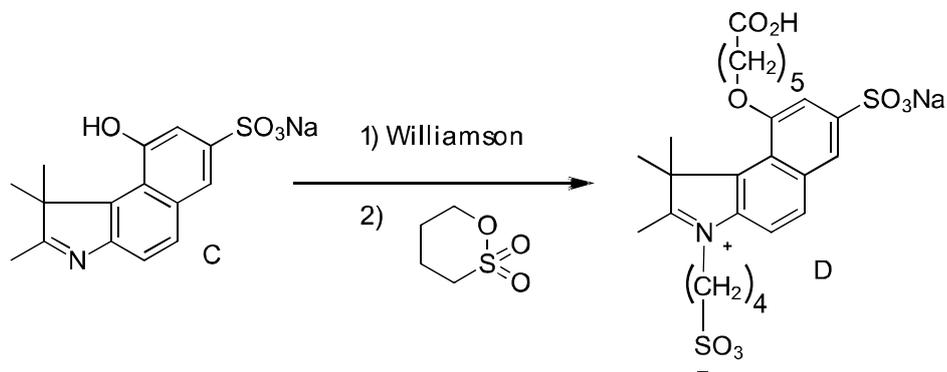
Ejemplo 2: Preparación de fluorocromo de la fórmula (IV)

Intermedio de acetanilida (B):



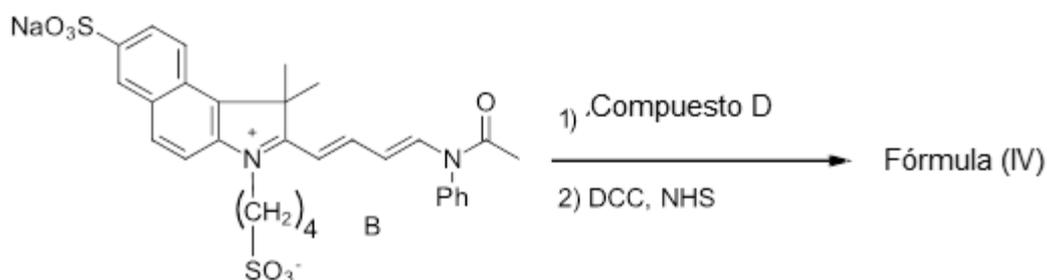
30 Se hace reaccionar la indolenina A sulfonada con sulfona de 1,4-butano. El intermedio resultante se hace reaccionar con β-anilinoacroleína para proporcionar el intermedio de acetanilida B.

Compuesto intermedio (D):



- 5 El intermedio D se prepara mediante la condensación de Williamson para formar un derivado carboxialquiloxi del precursor de indolenina C seguido por la cuaternización con sulfona de 1,4-butano. La indolenina C se obtiene por diazotación/reducción de un precursor aromático aminado seguido por la formación de sulfonato, hidroxilación y ciclación de Fischer con cetona.

Fluorocromo de la fórmula (IV):



- 10 El compuesto B es condensado con el compuesto indólico D. El compuesto de dicarbocianina resultante se activó con *N*-hidroxisuccinimido (NHS) para proporcionar el fluorocromo de la fórmula (IV).

Ejemplo 3: Conjugación del fluorocromo con el mAb quimérico anti-CEA

- 15 El anticuerpo purificado del ejemplo 1 se descongela durante aproximadamente 24 horas a 15-25°C. Ultrafiltración/diafiltración con membranas de corte en 30 kDa para realizar un intercambio de amortiguador (fosfato de sodio a 0,1 M/carbonato, pH 9,3). El fluorocromo (fórmula (IV) del ejemplo 2) se disuelve en DMF a una concentración de 2,25 mg/mL mediante agitación durante una noche a 15-25°C. Se agrega la DMF a la solución del anticuerpo (diluida a una concentración final de 1 mg/mL con el amortiguador de fosfato de sodio a 0,1 M/carbonato, pH 9,3) hasta una concentración final del 10% v/v. La solución de fluorocromo se añade entonces a la solución de anticuerpos a un flujo de 20 mL/min en un exceso molar de 4,5. La mezcla de reacción resultante se incuba en oscilación orbital a temperatura ambiente durante aproximadamente 45 min.

- 20 Se realiza una segunda etapa de ultrafiltración/diafiltración (membranas de corte a 30 kDa) primero con PBS-135mM L-arginina complementada con DMF al 10% (v/v), seguido por el amortiguador de la formulación PBS-135mM L-arginina para retirar la DMF. La fracción retenida se diluye después a una concentración final (tal como se determina por análisis espectrofotométrico) de 1,0-1,1 mg/mL con el amortiguador de la formulación y se filtra (0,2 µm).

- 25 Con el conjugado fluorescente resultante se rellenan botellas para PET de 0,5 L cerradas con tapas de polietileno de alta densidad, se inserta en bolsas de plástico de color ámbar y se conservan a -20°C ± 5°C.

La relación molar de fluorocromo/anticuerpo se determina por espectrofotometría. Se observa una relación de conjugación promedio de 1,5-1,6.

- 30 La conjugación del fluorocromo con el anticuerpo se puede realizar, como alternativa, con DMSO como el solvente de conjugación. La adición del fluorocromo en un exceso molar de 4 al anticuerpo (a una concentración en solución de 1 mg/mL) con una concentración de reacción final del 10% v/v de DMSO, y un tiempo de reacción entre 5 y 120 min, proporcionó un conjugado con una relación de conjugación promedio de 1,5-1,6, según se determina por espectrofotometría. No se observó ninguna diferencia significativa con respecto a las mediciones de intensidad de emisión de fluorescencia, fotoblanqueo y rendimiento cuántico obtenidas para estos conjugados fluorescentes

preparados en DMSO en comparación con los conjugados preparados en concentraciones y condiciones análogas en DMF.

Ejemplo 4: Formulación

5 El amortiguador utilizado para la formulación del conjugado fluorescente preparado de acuerdo con el ejemplo 3 puede adaptarse según sea necesario para los usos y los métodos dentro del contexto de la invención. Por ejemplo, el conjugado fluorescente se puede formular preferiblemente en un amortiguador que comprende  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 10 mM (VWR ProLabo),  $\text{Na}_3\text{Citrato}$  a 10 mM/ácido cítrico (Fluka), arginina-HCl a 300 mM (Sigma), Tween 20 al 0,02% (p/v) (Merck), en donde el pH se ajusta a 6,0.

Ejemplo 5: Caracterización del conjugado

10 Estudios de fluorescencia

La desactivación, el fotoblanqueo y el rendimiento cuántico fluorescente del fluorocromo de la fórmula (IV) y de un conjugado fluorescente según se prepara de acuerdo con el ejemplo 3 se determinaron a la longitud de onda de excitación de 680 nm (proporcionada por el dispositivo óptico Fluobeam700), la longitud de onda relevante para uso clínico.

15 Las muestras del fluorocromo de la fórmula (IV) en DMF y las muestras del conjugado fluorescente del ejemplo 3 en PBS 135 mM-arginina se prepararon a diferentes concentraciones que oscilaban de 0,05 a 500  $\mu\text{M}$ .

La intensidad máxima de fluorescencia y la concentración máxima del fluorocromo antes de la detección de la desactivación o extinción (es decir, la autoinhibición de la fluorescencia emitida por el propio fluorocromo a una cierta concentración) se determinaron con un fluorímetro.

20 Los valores de fluorescencia se obtuvieron después de la sustracción de los valores de fluorescencia de fondo de los amortiguadores. Para el conjugado fluorescente, la intensidad máxima de fluorescencia se midió que era de 70 UA (unidades arbitrarias), con una concentración máxima de 5  $\mu\text{M}$  antes de que se observe la desactivación. Para el fluorocromo, la intensidad máxima de fluorescencia se midió que era de 120 UA y a una concentración máxima de 10  $\mu\text{M}$ .

25 El rendimiento cuántico como una medida para la eficacia de la conversión de luz absorbida en luz emitida se calculó para las muestras a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  en la longitud de onda clínica de 680 nm. Para el fluorocromo sin conjugar de la fórmula (IV), se determinó un rendimiento cuántico de 0,26, mientras que para el fluorocromo conjugado se observó un rendimiento cuántico de 0,15, lo que suponía una reducción de solamente el 43%.

30 En términos de uso clínico, en particular durante las cirugías de resección de tumores, el fluorocromo del conjugado fluorescente debería mantener un nivel estable y adecuado de intensidad de fluorescencia durante un tiempo tan prolongado como fuera posible.

35 El fotoblanqueo o pérdida de actividad fluorescente también se evaluó a la longitud de onda clínica de excitación de 680 nm para las muestras del fluorocromo y del conjugado, así como un fluorocromo de carbocianina comercialmente disponible, Alexa Fluor® 680, que es un tinte que emite en el rojo lejano cuya longitud de onda máxima de absorción y de emisión son similares (absorción máxima a 679 nm y emisión máxima a 702 nm) a las del fluorocromo de la fórmula (IV). El fotoblanqueo se evaluó también para un conjugado preparado de forma análoga al método de conjugación descrito en el ejemplo 3 del mAb quimérico anti-CEA del ejemplo 1 y Alexa Fluor® 680 (se obtuvo una relación promedio de fluorocromo por anticuerpo de aproximadamente 1,46). Las muestras de estos conjugados se prepararon en PBS a 1 $\times$ .

40 Las muestras se prepararon a concentraciones de 5  $\mu\text{M}$  y se expusieron a luz a 680 nm. La intensidad de fluorescencia emitida se midió a intervalos de 0 h, 30 min y 1, 1,5 y 2 h de exposición a la luz.

Tabla 1: Emisión de fluorescencia con el tiempo ( $\lambda_{\text{ex}} = 680 \text{ nm}$ )

Tiempo de exposición (h)	0	0,5	1	1,5	2
Fluorocromo (fórmula IV)	100,00	79,73	83,29	73,74	66,3
Conjugado del ejemplo 3	100,00	69,59	35,75	25,43	15,14
Alexa-Fluor 680	100,00	52,13	16,22	5,74	2,01
Conjugado Alexa-Fluor 680	100,00	9,04	2,27	0,98	0,62

45 Después de 30 minutos de exposición continua a la longitud de onda clínica de 680 nm, la fluorescencia del conjugado fluorescente es de aproximadamente el 70%, mientras que la fluorescencia emitida del tinte comercial conjugado al mismo anticuerpo es solamente de aproximadamente el 9%. Después de 1 hora, la intensidad de fluorescencia del

tinte comercial, así como de su conjugado, es casi nula, mientras que aún se mantiene la fluorescencia del conjugado fluorescente y del fluorocromo no conjugado.

#### *Reactividad cruzada de tejidos*

5 Un estudio de la reactividad cruzada de tejido debida al conjugado fluorescente preparado como en el ejemplo 3 con el uso del conjugado marcado con biotina se llevó a cabo en un panel de 42 frotis de sangre y tejidos humanos congelados de tres individuos no relacionados mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas convencionales. La tinción específica con el conjugado de anticuerpos se halló limitada al tubo digestivo y a otros pocos tejidos, en componentes epiteliales, principalmente en el borde celular apical o en el lado luminal, lo que se ha descrito en la bibliografía que expresa el CEA, y que confirma la unión del anticuerpo solamente a la diana.

#### 10 *Afinidad por el antígeno.*

También se determinó la afinidad del conjugado fluorescente según se prepara en el ejemplo 3 por el antígeno carcinoembrionario destinatario mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un dispositivo BIACORE 3000. El antígeno carcinoembrionario se acopló a un chip CM5 a través de los grupos tiol (*Surface Thiol Coupling GE healthcare*; Instrucción 22-0618-10AB). Las tasas de asociación y disociación se midieron con 6 15 concentraciones de flujo diferentes (de 50 nM a 1,5 nM) del anticuerpo monoclonal quimérico del ejemplo 1, del anticuerpo monoclonal m511 (el anticuerpo murino original en el cual se basan las regiones variables del anticuerpo monoclonal quimérico del ejemplo 1) y del conjugado fluorescente. La adquisición de datos y los cálculos de parámetros se realizaron con el programa informático Bia y los programas de evaluación Bia. La afinidad del anticuerpo monoclonal quimérico del ejemplo 1 por el CEA ( $3,27 \times 10^{-11}$  nM) permaneció muy cercana a la del anticuerpo 511 20 murino parental ( $3,82 \times 10^{-11}$  nM) y no se modificó después de su marcación con el fluorocromo coloreado en el infrarrojo cercano (la  $K_D$  del conjugado fluorescente de ejemplo 3 se midió como  $3,21 \times 10^{-11}$  nM).

#### Ejemplo 6: Estudios *in vivo*.

La eficacia del conjugado fluorescente del ejemplo 3 se valoró *in vivo* en cuatro modelos de ratón diferentes que expresaban el CEA humano.

25 La distribución por los tejidos del conjugado fluorescente se determinó por mediciones de radioactividad con el uso de un tomógrafo computarizado por emisión monofotónica (SPECT) en un modelo de ratón de carcinomatosis peritoneal LS-174T que se implantó de acuerdo con los protocolos establecidos. Los ratones atímicos NMRI inmunodeprimidos se sometieron a trasplante de células LS-174T mediante la inyección intraperitoneal con células LS-174T que 30 sobreexpresaban el CEA. Los ratones recibieron la inyección por vía intravenosa diez días más tarde con 30 y 50  $\mu$ g de conjugado fluorescente radiomarcado con  $^{125}$ I (que se preparó por incubación del conjugado fluorescente con un reactante de yodación radiomarcador). La visualización de los ratones 48 horas después del tratamiento con 50  $\mu$ g del conjugado (realizado en una cámara Nano-SPECT-CT [Bioscan®]) reveló que la radioactividad estaba esencialmente limitada a los nódulos tumorales presentes en la cavidad peritoneal de los ratones. Este resultado se correspondía con las mediciones de biodistribución de la radioactividad en los diferentes órganos obtenidos después del sacrificio 35 de los animales.

Los estudios de visualización de fluorescencia *in vivo* también se realizaron por inyección del conjugado fluorescente no radiomarcado en los ratones atímicos NMRI inmunodeprimidos con carcinomatosis peritoneal desarrollada después de las inyecciones intraperitoneales de células tumorales humanas LS-174T que sobreexpresan el CEA. Después de 40 12 días de desarrollo de la carcinomatosis, los animales recibieron 20 o 30  $\mu$ g de conjugado fluorescente por vía intravenosa. Después de 48 horas, los animales fueron sacrificados y la fluorescencia se visualizó con una sonda óptima a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 680 nm y 700 nm, respectivamente. En ambas dosis, la distribución de fluorescencia estuvo claramente limitada a los tumores peritoneales, lo que permitió ver con claridad los micronódulos en la cavidad peritoneal, incluida el área del páncreas (figura 1, columna A, tumores *in situ* visualizados a 700 nm). Los nódulos de menos de 1 mm y con un peso de menos de 1 mg (de 0,2 a 1,7 mg) fueron 45 identificables y fluorescentes (figura 1, columna B, que muestra cada uno de los tumores resecados de los mismos animales que se muestran en la columna A, visualizados a 700 nm). La inyección del conjugado fluorescente en los animales sanos y un conjugado fluorescente irrelevante (con un anticuerpo PX, es decir, anticuerpo monoclonal de IgG1 purificado del mieloma de ratón MOPC21 [ref. Köhler et al., Eur J Immunol 1976 (6) 292]) como controles no indujo ninguna tinción específica.

50 Notablemente, el conjugado fluorescente permite la visualización de nódulos tumorales que sobreexpresan el CEA, independientemente de la ubicación de los nódulos tumorales, con lo que se imitan así las condiciones clínicas.

Se utilizó un modelo basado en un modelo de ratón ortotópico de cáncer colorrectal humano que expresa el CEA de humano (Tseng et al., *Vis. Exp.* 2007 (10) 484). Las células HT29 que sobreexpresan el CEA se inyectaron por vía 55 subcutánea en 4 sitios del lomo de ratonas hembra de seis semanas de edad inmunodeprimidas CD1-FOxn1<sup>nu</sup> para inducir el desarrollo subcutáneo del tumor de colon humano. Se retiraron entonces los pequeños fragmentos de tumor (aproximadamente de 3 mm de diámetro) y se trasplantaron en la pared cecal de los animales para inducir el desarrollo de tumores ortotópicos. La pared cecal fue levemente dañada para inducir una reacción inmunitaria y facilitar la

infiltración de las células tumorales. Después del desarrollo de estos tumores, 30 µg del conjugado fluorescente de acuerdo con la invención (o de un conjugado fluorescente con un anticuerpo PX irrelevante, como control) se inyectaron por vía intravenosa en el animal. La señal fluorescente en el infrarrojo cercano (700 nm) se midió a 0, 4, 24 y 48 horas de la inyección con el sistema de captura de imágenes PEARL (Li-Cor Biosciences) para los tumores subcutáneos o el sistema de captura de imágenes intraoperatorias FLARE (Curadel) para los tumores ortotópicos.

Como resultado, se observó con claridad la inmunofotodetección intraoperatoria a 700 nm de los tumores en ubicaciones tanto subcutáneas como ortotópicas (figura 2A y figura 2B, respectivamente). La fluorescencia de los tumores subcutáneos fue de un nivel tan alto que era visible a través de la piel de los animales (figura 2A, fila A) 48 horas después de la inyección de los anticuerpos. Las metástasis hepáticas de tumores humanos que sobreexpresan el CEA también se observaron con el conjugado fluorescente de la invención. Las células LS-174T o las células de adenocarcinoma de colon humano LoVo se inyectaron en el bazo de ratones atímicos Balb/c inmunodeprimidos tal como se describe en los protocolos publicados (ref. Tibbetts et al., Cancer 1993, (71), 315-21). Ambos tipos de células sobreexpresan el CEA e inducen el desarrollo de metástasis hepáticas, pero siguen diferentes patrones. Las células LoVo inducen la diseminación de muchas metástasis pequeñas por la superficie del hígado, mientras que las células LS-174T inducen la formación de tan solo unas pocas metástasis más grandes. Los ratones recibieron 30 µg del conjugado fluorescente 48 horas antes de la visualización de la fluorescencia a 700 nm. Como control, a los ratones se les inyectó un conjugado irrelevante basado en el anticuerpo PX. Se halló que los nódulos tumorales de un tamaño muy pequeño, por ejemplo, micrometástasis en la superficie del hígado, que no fueron detectables, es decir, visibles, a simple vista, podrían detectarse con fluorescencia en el ratón que tenía inyectado el conjugado fluorescente, lo que definió el contorno de estos tumores. Además, se demostró que se podían ver las metástasis hepáticas independientemente de la línea celular de los nódulos tumorales. No se detectaron tumores en el control.

Se realizó un estudio similar con un modelo para tumores pancreáticos. Se utilizaron en el estudio ratonas hembra inmunodeprimidas CD1-Foxn1<sup>tm</sup> atímicas de seis semanas de edad, y se anestesiaron con isoflurano durante la inoculación de tumor y los procedimientos de toma de imágenes. Los tumores pancreáticos ortotópicos se obtuvieron tal como se describe en Kim et al., Nat. Protoc., 2009, 4, 1670-80. El bazo y el páncreas de los animales fueron ambos externalizados lateralmente a través de una excisión lateral para dejar expuesto todo el páncreas. Se pasó una aguja fina paralela a la vasculatura dentro del páncreas a través de la cual se inyectaron 500.000 células BXP-3-luc2 (línea celular transfectada con luciferasa). El crecimiento de los tumores ortotópicos se vigiló semanalmente mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI), lo que se realizó mediante la inyección de 150 mg/kg de una solución de D-luciferina (SynChem, Inc.) en PBS por vía intraperitoneal en un volumen total de 50 µL, 10 minutos antes de la toma de imágenes con el sistema de captura de imágenes de espectro IVIS (Pekin Elmer Life Sciences). Una vez que los tumores ortotópicos fueron detectables por BLI, se inyectaron 30 µg del conjugado fluorescente por vía intravenosa a través de la vena de la cola de los animales. Los animales se sacrificaron 48 horas después de la inyección, y se examinaron al infrarrojo cercano a 700 nm. Se veían con claridad los tumores pancreáticos ortotópicos. No se vio nada en los ratones de control inyectados con conjugado inespecífico ni con el tinte de fluorocromo solamente.

Se calculó la relación de señal-ruido mediante las señales fluorescentes del NIR medidas con el sistema de captura de imagen de animales pequeños Pearl Impulse (LI-COR). Las imágenes se normalizaron y las regiones de interés se seleccionaron para análisis. La señal media específica del tumor se dividió por la señal media del tejido circundante para proporcionar las relaciones medias de señal-ruido. Se utilizó una ANOVA de doble cola de mediciones repetidas con la corrección Bonferroni para determinar las relaciones significativas de señal-ruido a partir de diferentes grupos en todos los puntos temporales. A diferencia del tinte de fluorocromo libre, o del conjugado de control irrelevante, que tuvieron valores de relación de señal-ruido cercanos a 1, la relación de señal-ruido para el conjugado fluorescente fue mayor que 3.

El análisis inmunohistoquímico de las resecciones de tumores subcutáneos BXP-3 teñidos con hematoxilina y eosina confirmó que el conjugado fluorescente estaba unido al tumor, a diferencia de los controles, en los que solamente aparecieron tinciones inespecíficas alrededor de las células tumorales.

En resumen, se halló que el conjugado fluorescente, tal como se preparó de acuerdo con el ejemplo 3, permitió la identificación *in vivo* de nódulos tumorales que sobreexpresan el CEA, independientemente de la ubicación de los tumores, y el origen (es decir, colorrectal frente a pancreático) del tumor, lo que confirmó la capacidad de actuación selectiva del conjugado fluorescente. Se observó un alto nivel de señal en relación al ruido, lo que permitió la detección de nódulos muy pequeños invisibles a simple vista.

Los estudios farmacológicos para determinar la seguridad y toxicidad de la administración intravenosa del conjugado fluorescente también demostraron que no hubo efectos adversos significativos sobre los sistemas nerviosos central y periférico en las ratas Wistar, ni tampoco sobre las funciones cardiovasculares y respiratorias en los perros Beagle, y que el conjugado se tolera bien hasta las concentraciones de dosis máxima verificadas de 40 mg/kg por día en las ratas (85 veces la dosis clínica pretendida) y 5 mg/kg (10 veces la dosis clínica pretendida) en los perros.

#### Ejemplo 7: Estudios clínicos

(a) Carcinomatosis peritoneal: Un estudio clínico para valorar la seguridad y el comportamiento de un conjugado del ejemplo 3 en 15 pacientes humanos con carcinomatosis peritoneal (tumores metastásicos) de origen digestivo.

Se administraron dosis del conjugado fluorescente del ejemplo 3 en el margen de 5 a 15 mg por inyección intravenosa. Los resultados preliminares muestran que no se observaron reacciones adversas en ninguna de estas dosis.

(b) Cánceres colorrectal y pancreático: Un estudio clínico para valorar la seguridad y el comportamiento del conjugado de anticuerpo fluorescente del ejemplo 3 en 30 pacientes humanos con cáncer de recto o de páncreas.

5 Se llevó a cabo un estudio con una dosis de 5 mg del conjugado fluorescente inyectado por vía intravenosa 48 horas antes de la cirugía. En los pacientes estudiados hasta ese momento no se notificó ningún efecto adverso durante las dosificaciones ni directamente después de las dosis mismas. En general, no se observaron cambios clínicamente significativos de los valores iniciales en los signos vitales.

10 Los resultados preliminares demuestran una localización muy clara de la fluorescencia en los sitios sospechados de tumor. Se realizó la visualización intraoperatoria con un sistema de captura de imágenes Artemis Open (Quest Medical Imaging) configurado con los parámetros adecuados para el conjugado fluorescente.

15 En un paciente con cáncer pancreático, el uso del conjugado fluorescente llevó a la identificación de células tumorales ubicadas en una región que normalmente se hubiera considerado un margen de resección libre de tumor alrededor del tumor primario localizado en el cuerpo del páncreas (es decir, lo que conlleva la retención de tejido tumoral), basándose únicamente en la inspección visual y la palpación (figura 3: el margen de resección propuesto según se determina únicamente por inspección visual y palpación está representado por la línea discontinua, que hubiera estado demasiado cerca del tejido tumoral, cuyo volumen está representado por la línea punteada. El margen de resección propuesto según se determina por fluorescencia está representado por las líneas continuas). Debido a la presencia de muchas metástasis peritoneales, solamente se realizó exploración y estadificación, es decir, solamente se resecaron las metástasis para biopsia y posterior análisis en la mesa de instrumental del quirófano. El conjugado fluorescente proporcionó una clara demarcación de los focos, así como los márgenes de las metástasis tanto *in vivo* como *ex vivo* en el tumor aislado tras la resección (figura 3, fila A: imagen de una metástasis *in vivo* a la luz blanca y con fluorescencia [imagen en superposición]; figura 3, fila B: imagen de la metástasis aislada *ex vivo* a la luz blanca y con fluorescencia [imagen en superposición]).

25 Se observaron resultados similares en otro paciente con cáncer pancreático después de la administración del conjugado fluorescente. Se observó que la fluorescencia delimitaba claramente el tumor sospechoso, que estaba localizado cerca de la cabeza del páncreas.

30 A un paciente al que se le diagnosticó metástasis colorrectal se le administró una dosis de 5 mg del conjugado fluorescente 48 horas antes de la resección. La dosis fue bien tolerada sin que se observaran acontecimientos adversos. Se detectó una clara señal fluorescente en el nódulo linfático parailíaco del lado izquierdo donde se sospechaba que estaba la metástasis, con delineación de la metástasis. Se realizó una resección satisfactoria.

35 A un paciente con carcinoma rectal localmente avanzado se le administró también una dosis de 5 mg del conjugado fluorescente. La dosis fue bien tolerada sin detección de acontecimientos adversos. Se realizó una resección anterior baja laparoscópica. El tejido de recto resecado fue visualizado en la mesa de instrumental del quirófano. Se observó una clara delineación del tejido tumoral en el tejido resecado.

#### Listado de secuencias

<110> SurgiMab S.A.S  
 <120> Conjugados fluorescentes  
 <130> SRG15P01PC  
 40 <150> EP15170617.3  
 <151> 03-06-2015  
 <160> 4  
 <170> BiSSAP 1.3.6  
 <210> 1  
 45 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Mus musculus con sitios de restricción KpnI y NheI  
 50 <400> 1

ES 2 683 554 T3

ggtaccgccg ccaccatgga ctccagactg aacctggtgt tcctggtgct gatcctgaag 60  
 ggcgtgcagt gcgacgtgca gctggtggaa tctggcggag gactggtgca gcctggcggc 120  
 tccagaaagc tgtcttgtgc cgcctccggc ttcaccttct ccaacttcgg catgcactgg 180  
 atccggcagg cccctgagaa gggcctggaa tgggtggcct atatctccgg cggtcctcc 240  
 accatctact tcgccgacac cctgaagggg cggttcacca tctcccggga caaccccaag 300  
 aacaccctgt ttctgcagat gacctccctg cggagcggag acaccgcat ctactactgc 360  
 gccagagact actacatcaa caactactgg tacttctgacg tgtggggcgc tggcaccacc 420  
 gtgacagtgt catctgctag c 441

<210> 2  
 <211> 402  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Mus musculus con sitios de restricción Sall y BsiWI  
 <400> 2

gtcgacgccg ccaccatgga atttcagacc caggtggtcg tgttcgtgct gctgtggctg 60  
 tctggcgtgg acggcgacat cgtgatgacc cagtcccaga aattcatgtc cacctccgtg 120  
 ggcgaccggg tgtccatcac atgcaaggcc tctcagaacg tgcggagcgc cgtggcctgg 180  
 tatcagcaga cacctggcca gagccccaag gccctgatct acctggcctc caacagatac 240  
 accggcgtgc ccgatcgggt caccggctct ggctctggca ccgacttcac cctgaccatc 300  
 tccaacgtgc agtccgagga cctggccgac tacttctgtc tgcaaacactg gaactacccc 360  
 10 ctgaccttcg gcggaggcac caagctggaa ctgaagcgta cg 402

<210> 3  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

15 <400> 3

Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Phe
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ala	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Tyr	Phe	Ala	Asp	Thr	Leu
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Ile	Asn	Asn	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115				120								

<210> 4

ES 2 683 554 T3

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

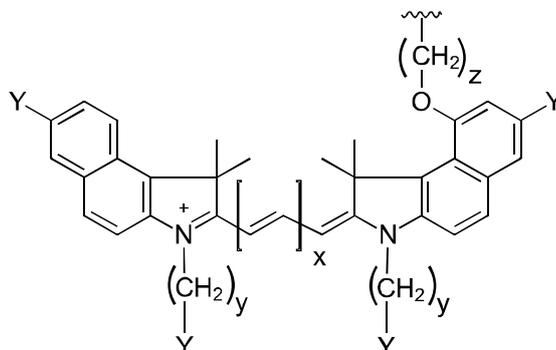
<400> 4

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Arg	Ser	Ala
			20					25					30		
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser
65					70					75					80
Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Leu	Gln	His	Trp	Asn	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys					
			100					105							

5

## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado fluorescente que comprende un resto de fluorocromo F acoplado a un resto selectivo T, en donde el resto F tiene la fórmula (I):



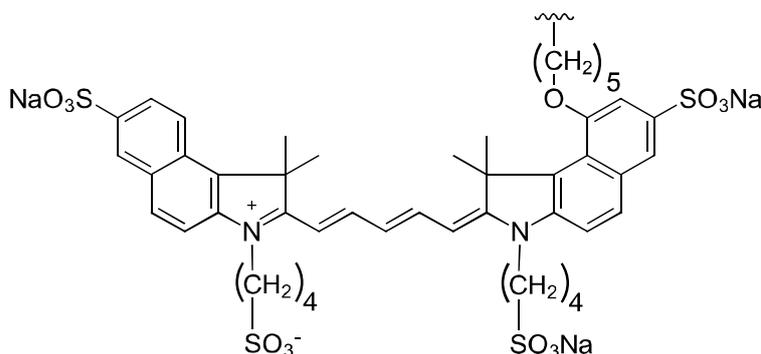
5 en donde

Y es seleccionado independientemente y para cada caso entre  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{SO}_3\text{M}$ , en donde M es un catión monovalente o Y se selecciona entre  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{SO}_3\text{Na}$ ;

x, z e y son independientemente seleccionados de un entero de 1 a 8;

y en donde el resto T tiene afinidad por un marcador tumoral.

10 2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el resto F tiene la fórmula (II):



3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el marcador tumoral es un antígeno tumoral, y en donde el antígeno tumoral es opcionalmente el antígeno carcinoembrionario (CEA).

15 4. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el resto T se selecciona entre un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y una proteína de fusión que comprende por lo menos una región variable de un anticuerpo; y en donde el anticuerpo es opcionalmente un anticuerpo monoclonal quimérico (mAb).

5. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el resto T es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une a uno o varios epítopos del antígeno CEA.

20 6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el resto F tiene la fórmula (II), y en donde el anticuerpo monoclonal quimérico está dirigido contra el epítipo GOLD-2 del CEA, comprende cadenas pesadas del alotipo G1m3 y cadenas ligeras del alotipo km3, en donde cada cadena pesada y cada cadena ligera comprende por lo menos un dominio variable de IgG1 de ratón y por lo menos un dominio constante humano.

7. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo monoclonal quimérico comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID n.º 4 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID n.º 3.

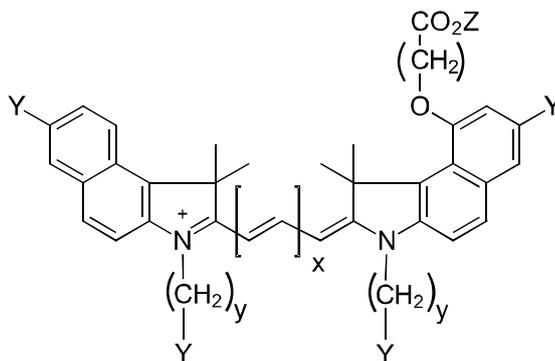
25 8. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde n restos F están acoplados a un resto T, y en donde n es un entero seleccionado de 1 a 4.

9. Una composición que comprende el conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde, opcionalmente

- (a) la composición está estéril y comprende un amortiguador acuoso y L-arginina;
- (b) la composición comprende un compuesto que comprende el resto T que no está acoplado al resto F, y/o
- (c) el grado medio de conjugación del conjugado en la composición es de aproximadamente 0,5 a 3.

10. Un método para la preparación de un conjugado fluorescente, que comprende las etapas de

- 5 (a) dar a conocer un fluorocromo que tiene la fórmula (III):



en donde Y es seleccionado independientemente para cada caso entre  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{SO}_3\text{M}$ , en donde M es un catión monovalente, o Y se selecciona entre  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{SO}_3\text{Na}$ ;

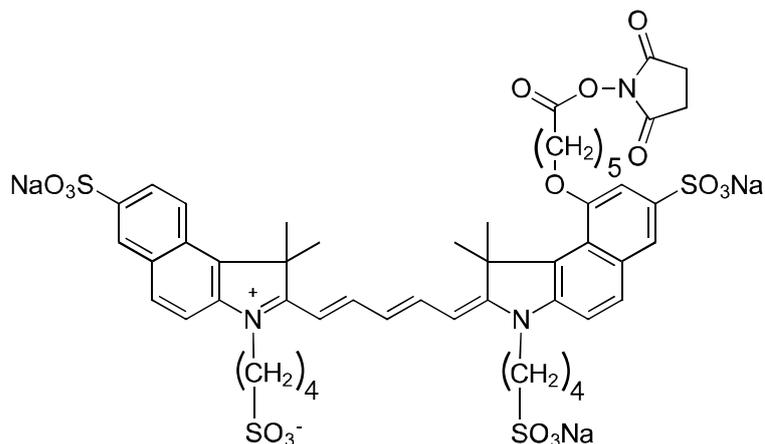
x, z e y son independientemente seleccionados de un entero de 1 a 8, y

- 10 Z se selecciona entre un contraión, hidrógeno, succinimidilo, sulfosuccinimidilo, y nitrofenilo,

(b) dar a conocer un agente selectivo que tiene afinidad por un marcador tumoral; y

(c) acoplar el fluorocromo con el agente selectivo.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el agente selectivo es un anticuerpo monoclonal quimérico que tiene afinidad por el CEA, y/o en donde el fluorocromo es un compuesto de la fórmula (IV):



- 15 12. El uso *in vitro* del conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de acuerdo con la reivindicación 9, para la detección de una célula tumoral en una muestra, o para diagnosticar y/o vigilar un tumor.

13. El conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de acuerdo con la reivindicación 9, para ser usados como un medicamento o un agente de diagnóstico.

- 20 14. El conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de acuerdo con la reivindicación 9, para ser usados en

(a) detectar focos de un tumor que expresa el marcador tumoral o para determinar la ubicación de un tumor que expresa el marcador tumoral en un paciente, y/o

(b) detectar células tumorales o tejido tumoral en un margen de resección en un paciente que está sometido, o que se ha sometido, a cirugía de resección de un tumor que expresa el marcador tumoral.

15. El conjugado o la composición para ser usado de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde el uso comprende las etapas de

5 (a) administrar el conjugado o composición a un paciente que padece un tumor;

(b) comenzar la cirugía de resección de tumor en dicho paciente;

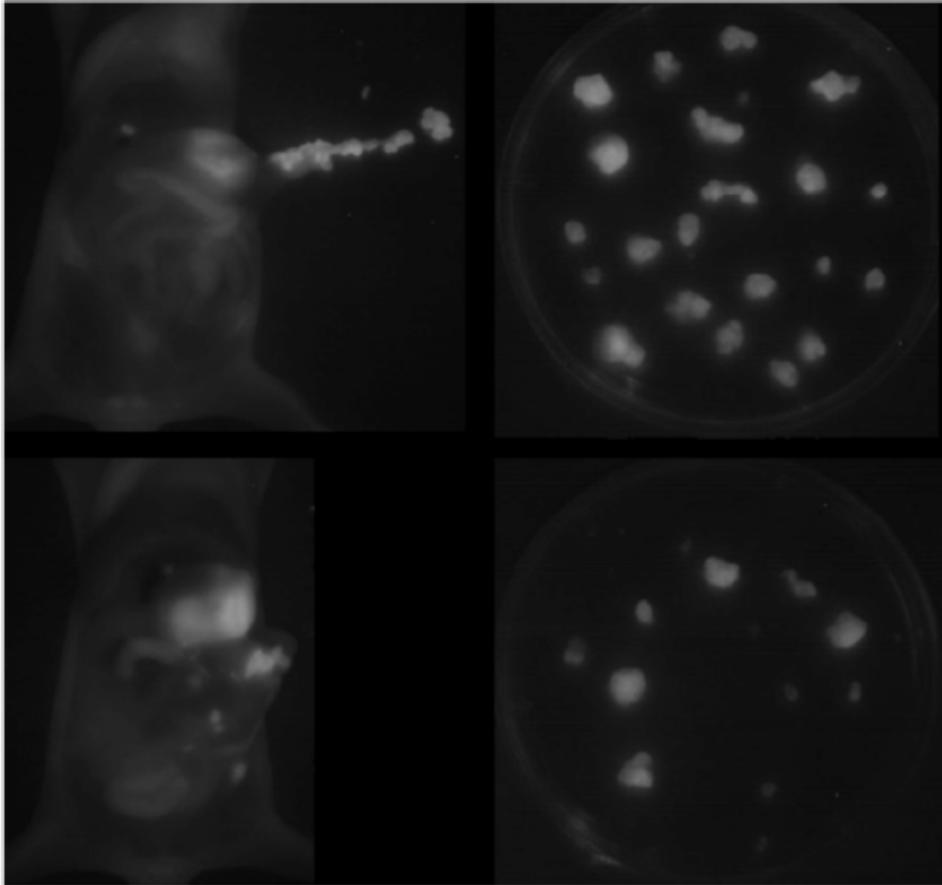
(c) iluminar un tejido en un sitio de resección del paciente que es sometido a la cirugía de resección con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 660 a 700 nm, en donde la etapa (b) se realiza en un plazo de tiempo de no más de aproximadamente 96 horas después de la etapa (a).

10 16. El conjugado o la composición para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15:

en donde el tumor es un cáncer colorrectal, gástrico, biliar, pancreático, esofágico, ovárico, mamario, de próstata, hígado o pulmón; o

en donde el tumor es un tumor digestivo maligno, y en donde el conjugado es el conjugado de acuerdo con la reivindicación 6 o 7; y

15 en donde el conjugado o la composición se administra opcionalmente por vía tópica, por inhalación, o por inyección intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, o perfusión.



A

B

Fig. 1

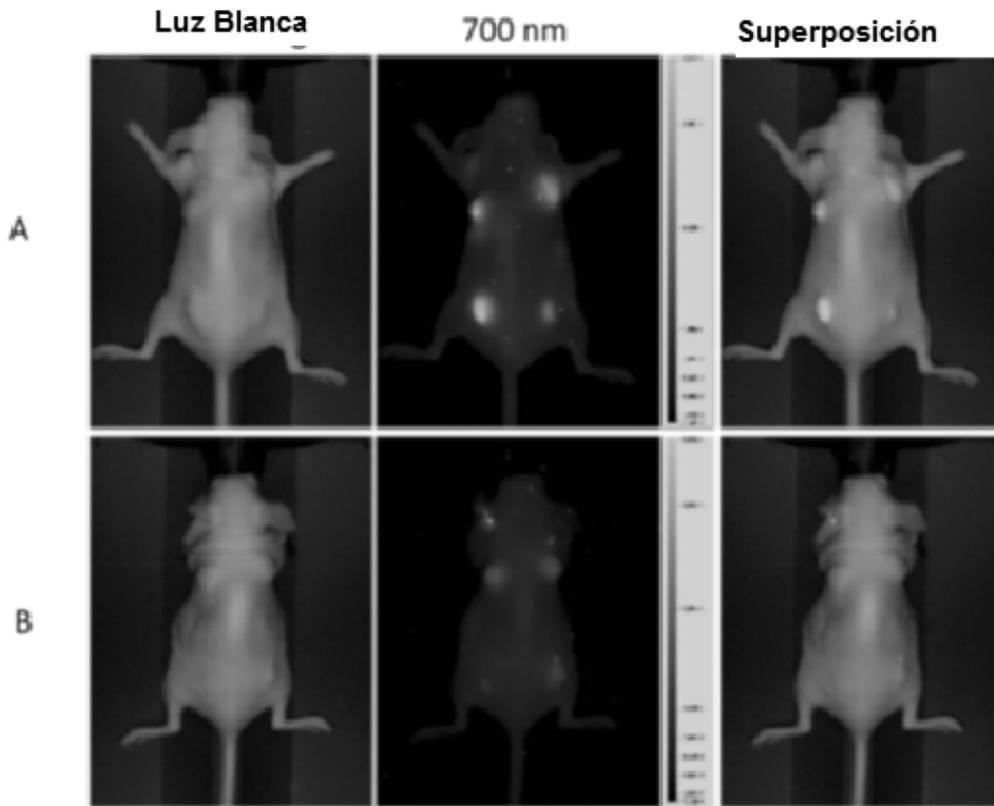


Fig. 2A

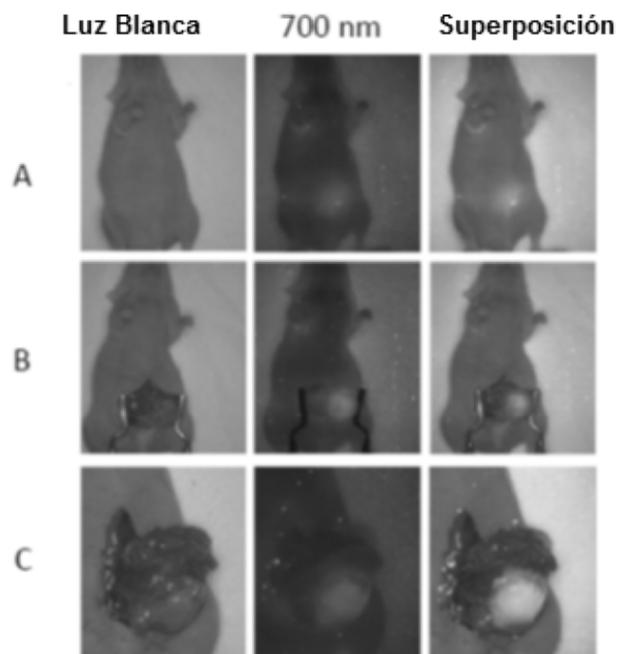


Fig. 2B

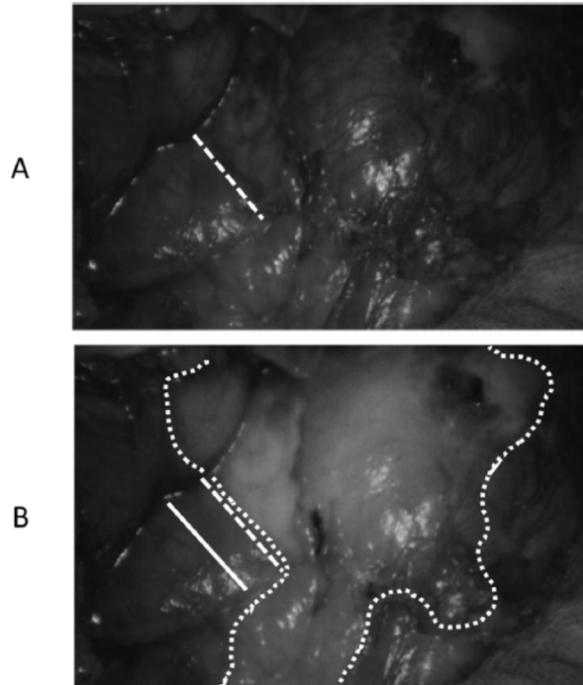


Fig. 3

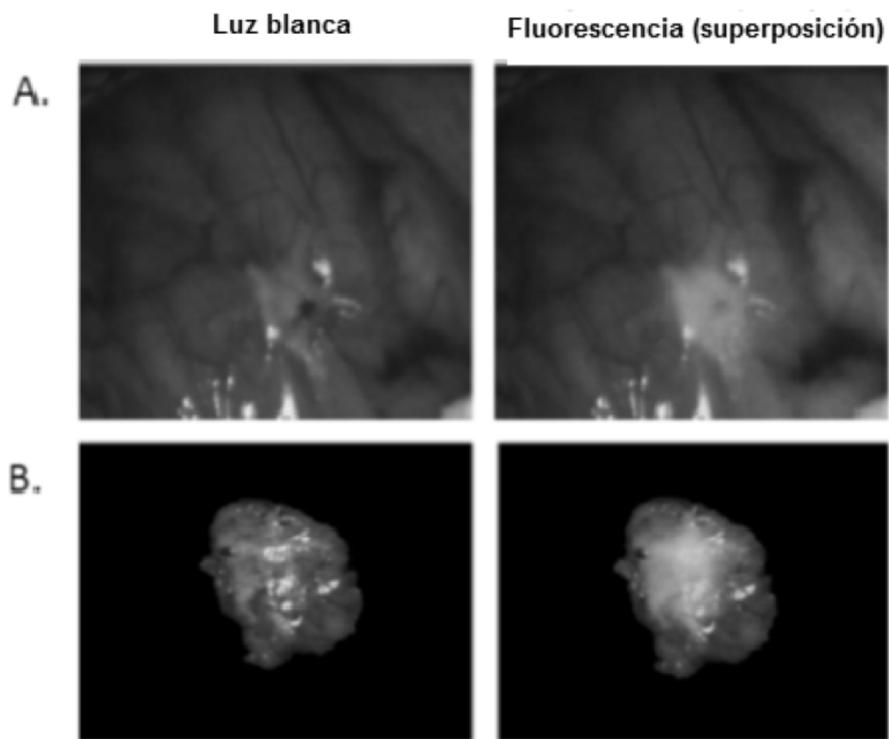


Fig. 4