

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 352**

51 Int. Cl.:

G01N 33/60 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2013 PCT/KR2013/011177**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14104605**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2013 E 13866879 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2940474**

54 Título: **Nueva composición de etiquetado de lesión cancerosa**

30 Prioridad:

26.12.2012 KR 20120153793

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

23.09.2019

73 Titular/es:

**NATIONAL CANCER CENTER (100.0%)
323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu
Goyang-si, Gyeonggi-do 410-769, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SEOK KI;
KANG, SE HUN;
KIM, SEOK WON y
JUNG, SO YOUN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 725 352 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

Nueva composición de etiquetado de lesión cancerosa

La presente invención se refiere a una nueva composición de etiquetado de una lesión cancerosa. Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición de etiquetado, para una lesión cancerosa, que incluye un complejo en el que la albúmina macroagregada (MAA) está unida a un pigmento para teñir tejidos vivos, isótopos radioactivos, o una combinación de los mismos, en la que el complejo está encapsulado dentro de gelatina o esponja de gelatina; un método para proporcionar información sobre un sitio de lesión cancerosa usando la composición de etiquetado de una lesión cancerosa (no reivindicada); un kit que incluye la composición de etiquetado de una lesión cancerosa para etiquetar una lesión cancerosa; y un complejo en el que un pigmento para teñir tejidos vivos se une al MAA incluido en la composición de etiquetado de una lesión cancerosa, en la que el complejo está encapsulado dentro de gelatina o esponja de gelatina.

Para la terapia anticancerosa, se ha desarrollado un método que usa diversos agentes anticancerosos, sin embargo, un método de operación quirúrgica para eliminar células cancerosas es el método usado con más frecuencia. Cuando se usa el método de la operación quirúrgica, la técnica para minimizar la extensión quirúrgica durante la cirugía es necesaria para la salud postoperatoria y el bienestar de los pacientes. En particular, para el cáncer de mama, una lesión extirpada durante la cirugía debe ser más pequeña para las mujeres coreanas que en otros países cuyo tamaño de las mamas sea pequeño, a fin de lograr el objetivo de la terapia de preservación mamaria. La extensión quirúrgica se determina como una lesión y las regiones del margen del borde alrededor de la lesión. En el caso de que un cirujano que realiza la operación no conozca con precisión la extensión y la región de una lesión, se debe requerir un gran tamaño de las regiones del margen del límite alrededor de la lesión. La razón es que, cuando la extensión de la cirugía se reduce ciegamente, un tumor puede permanecer en el lado inciso. Sin embargo, en la cirugía clínica real, hay pocos métodos para permitir que un cirujano operador identifique con precisión la lesión en tiempo real durante la cirugía. Aunque se ha desarrollado un método de diagnóstico muy preciso, el método de diagnóstico no se puede usar durante la cirugía. De este modo, durante la cirugía real, se usan principalmente la sensación táctil y la visión de un cirujano que realiza la operación. Sin embargo, en tal caso, es raro distinguir claramente la lesión. En particular, en el caso de que una lesión sea pequeña, es más difícil de distinguir. Para lograr un objetivo de la cirugía microinvasiva y la cirugía de preservación, se necesita una técnica para informar a un cirujano que realiza la operación sobre una lesión en tiempo real durante la cirugía.

En una cirugía típica para extirpar un tumor, en particular, la cirugía de cáncer de mama, el sitio de microlesión de un paciente se identifica antes de la cirugía por medio de ondas ultrasónicas, mamografía o imágenes de resonancia magnética. Luego, se marca el sitio identificado de una lesión y, posteriormente, se retira el tejido de la región etiquetada. Como método para etiquetar el sitio identificado de una lesión, se usan los siguientes métodos: un método para dibujar una imagen en la superficie de la piel, un método para usar un alambre y un método para inyectar un pigmento negro como el carbón. Aunque el método para dibujar una imagen en la piel usando un bolígrafo para etiquetar el sitio de una lesión se puede usar fácilmente, el método tiene un inconveniente de baja precisión, ya que, debido a una característica muy flexible del tejido mamario, una forma de mama durante la cirugía se modifica en gran medida de una forma en el punto del diagnóstico y, en el caso de una lesión en la mama profunda, una marca en la superficie de la piel es insuficiente. También, un inconveniente del método de insertar un alambre en una lesión de mama es una precisión menor que la esperada porque esencialmente se debe insertar un alambre verticalmente en la superficie de la piel, pero la inserción vertical del alambre puede afectar a una sonda ultrasónica, de modo que el alambre se inserta inevitablemente oblicuamente; y porque la ubicación del alambre se puede mover según el movimiento de la mama. Además, otro inconveniente del método es que el alambre insertado interfiere con la cirugía; y además se debe realizar un procedimiento para extirpar un sitio para insertar el alambre. Finalmente, el método de inyectar un pigmento tal como carbón vegetal es ventajoso porque el pigmento inyectado se une a una lesión, de manera que un sitio de la lesión puede ser etiquetado con precisión. Sin embargo, en el caso de una lesión en la mama profunda, existen inconvenientes porque un pigmento negro puede no identificarse en el exterior y una región quirúrgica puede estar contaminada por el pigmento. Estos inconvenientes también se convierten en una limitación en una operación quirúrgica para extirpar tejido canceroso al lado del cáncer de mama.

Para superar este problema, se han desarrollado técnicas para etiquetar una lesión cancerosa. Martino et al. (J. Endocrinol. Invest. 33: 339-342, 2010) usan albúmina humana macroagregada unida a tecnecio radioactivo para etiquetar el cáncer papilar de tiroides. El documento US 3,845,202 describe una composición de macroagregado apropiado como agente de exploración de pulmón. El complejo de marcaje comprende isótopo radioactivo (estaño 113, indio 113m) reticulado por glutaraldehído a gelatina o albúmina fisiológicamente aceptable para lograr la biocompatibilidad. Debido a la difusión in vivo del complejo de etiquetado, el tiempo de retención de la etiqueta en el sitio de la lesión cancerosa está restringido. Esto es problemático ya que el etiquetado ya puede difundirse y volverse inexacto durante la extirpación quirúrgica, por lo que no se puede identificar con precisión el rango de la lesión.

De este modo, a través de la técnica desarrollada hasta el momento, es difícil determinar con precisión la extensión de la cirugía para extirpar quirúrgicamente una lesión cancerosa. En consecuencia, cuando una lesión cancerosa se extirpa quirúrgicamente, una región escindida debe ser más grande de lo necesario, y también la inspección para identificar si la lesión se remueve normalmente o no debe ir acompañada después de la cirugía.

5 Por lo tanto, los presentes inventores han completado la presente invención demostrando que, cuando se quita quirúrgicamente una lesión cancerosa, un agente de etiquetado que incluye albúmina macroagregada, a la que se une un pigmento para teñir tejidos vivos, se adsorbe de manera eficaz a la lesión cancerosa. para que un sitio de la lesión pueda ser etiquetado con precisión; y que el pigmento se puede rastrear en tiempo real, de modo que se pueda identificar con precisión un intervalo de la lesión que se va a eliminar.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de etiquetado de una lesión cancerosa, que incluye un complejo en el que la albúmina macroagregada (MAA) está unida a un pigmento para teñir tejidos vivos, isótopos radiactivos, o una combinación de los mismos, en la que el complejo está encapsulado dentro de gelatina o esponja de gelatina.

10 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un método para proporcionar información sobre un sitio de una lesión cancerosa usando la composición de etiquetado de una lesión cancerosa.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un kit para etiquetar una lesión cancerosa, incluyendo el kit la composición de etiquetado de una lesión cancerosa.

15 Incluso otro objeto de la presente invención es proporcionar un complejo en el que un pigmento para teñir tejidos vivos se una a MAA incluido en la composición de etiquetado de una lesión cancerosa, en el que el complejo está encapsulado dentro de gelatina o esponja de gelatina.

Solución técnica

20 Para lograr el objetivo, la presente invención proporciona una composición de etiquetado de una lesión cancerosa, que incluye un complejo en el que la albúmina macroagregada (MAA) está unida a un pigmento para teñir tejidos vivos, isótopos radiactivos, o una combinación de los mismos, en la que el complejo es encapsulado dentro de gelatina o esponja de gelatina. Un cáncer que se va a etiquetar con la composición puede ser cualquier cáncer que incluya tejido en el que la MAA pueda penetrar y ser inmovilizado sobre él sin limitación. Sin embargo, el cáncer es preferiblemente un cáncer sólido que tiene tejido donde la MAA puede penetrar y ser inmovilizado sobre él. Los ejemplos pueden incluir cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de piel, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, tumor cerebral, tumor gastrointestinal, cáncer de hígado, sarcoma de tejidos blandos y linfoma, etc.

30 La expresión "albúmina macroagregada (MAA)" usada en este documento significa partículas proteicas que tienen un diámetro de 10 a 50 μm y se preparan calentando y coagulando albúmina de suero humano. Una estructura y propiedad física de MAA difiere de la albúmina de suero humano que tiene un diámetro inferior a 10 nm. Cuando se inyecta la MAA por vía intravenosa, la MAA puede permanecer en el capilar pulmonar, que es de 8 μm , causando así microémbolos. Mediante el uso de dicha propiedad, la MAA etiquetada con un isótopo radioactivo se ha usado para el escintigrama pulmonar (para el diagnóstico de trastornos en el flujo sanguíneo pulmonar, la derivación de derecha a izquierda o la presión venosa aumentada en el pulmón, tal como embolia pulmonar, coágulo de sangre pulmonar, enfermedad sin pulso, neumonía, y cáncer de pulmón), exploración venosa (para el diagnóstico in situ de la sangre venosa de los nervios centrales) o exploración venosa (para el diagnóstico de trastornos de la circulación sanguínea periférica tal como la enfermedad de Faza). La MAA de la presente invención se inyecta en un tejido de lesión cancerosa y se usa como mediador para unir un material de etiquetado al tejido de lesión cancerosa. La MAA de la presente invención se puede sintetizar usando HSA recombinante o HSA no autóloga. También, la MAA disponible en el mercado se puede comprar y usar. La MAA de la presente invención se inyecta en un tejido de lesión cancerosa y se usa como mediador para unir un material de etiquetado al tejido de lesión cancerosa, en el que el mediador adsorbe el material de etiquetado para evitar la difusión del material de etiquetado al tejido de lesión cancerosa.

45 La expresión "pigmento para teñir tejidos vivos" usada en este documento significa un material que se une a los tejidos vivos, etiquetando así el sitio de unión para permitir que el sitio etiquetado se identifique a simple vista o usando una herramienta de detección. Para los fines de la presente invención, como el pigmento para teñir tejidos vivos, un material de etiquetado que se puede unir al tejido canceroso y usarse para etiquetar un sitio donde se genera cáncer. Preferiblemente, un pigmento visible, o pigmento fluorescente, que genera fluorescencia en el sitio de unión y es detectable mediante el uso de un dispositivo tal como una cámara de fluorescencia, se puede usar solo o en combinación, pero no se limita al mismo.

50 La expresión "pigmento visible" usado en este documento significa un tipo de pigmento en el que un material de etiquetado que se une a tejidos vivos exhibe color de longitud de onda de luz visible, de manera que la región etiquetada se puede identificar a simple vista. El pigmento visible se puede inyectar en un sitio donde se genera un cáncer, de manera que, cuando el cáncer se extirpa quirúrgicamente, se puede identificar con precisión una lesión cancerosa a extirpar, y de este modo se puede aumentar la tasa de éxito de la cirugía del cáncer. Preferiblemente, como el material de etiquetado visible, rojo natural, azul nilo, marrón bismark, carmín de litio, azul tripano, verde janus, violeta de metilo, o-lamina, verde malaquita, safranina, eosina, rojo congo, eritrocina, nigrosina, hematoxilina azul de Alcán, azul de anilina y el verde claro se pueden usar solos o en combinación, pero no se limitan a estos, siempre y cuando se pueda lograr el propósito de identificar el tejido de la lesión cancerosa.

- La expresión "pigmento fluorescente" usada en este documento significa un compuesto orgánico que emite fluorescencia para permitir que la longitud de penetración de la luz sea máxima y para permitir que una señal de error debida a la humedad sea mínima después de que se forme un estado de excitación absorbiendo la luz que tiene una cierta longitud de onda. El pigmento fluorescente puede ser un pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano que es un compuesto orgánico que emite fluorescencia preferiblemente a una longitud de onda del infrarrojo cercano de 700 nm a 3000 nm, y preferiblemente de 750 nm a 900 nm. La fluorescencia en la longitud de onda del infrarrojo cercano generada a partir del pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano se puede capturar en forma de imagen o controlarse en tiempo real usando un dispositivo como una cámara fluorescente y una sonda de detección de fluorescencia (PCT/KR2011/009271). La absorción in vivo de la fluorescencia en la longitud de onda del infrarrojo cercano de la presente invención es relativamente más baja que la de la fluorescencia en otras longitudes de onda, de manera que el infrarrojo cercano generado en una porción relativamente profunda de un cuerpo puede detectarse ex vivo. El pigmento fluorescente en la longitud de onda del infrarrojo cercano se puede inyectar en un sitio donde se genera un cáncer para hacer que el sitio de la lesión cancerosa se identifique con precisión antes de la extirpación cuando el cáncer se extirpa quirúrgicamente, y de este modo puede aumentar la tasa de éxito de la cirugía de cáncer. En particular, a diferencia del pigmento visible, un sitio de una lesión se puede detectar ex vivo antes de identificar directamente la lesión a través de la escisión, de modo que se pueda lograr una cirugía rápida y precisa del cáncer. Como pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano, se usa preferiblemente el verde de indocianina. Sin embargo, siempre que sea aplicable al cuerpo humano, cualquier pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano se puede incluir en el alcance de la presente invención.
- Un complejo, en el que el pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano se une a MAA, es ventajoso porque la seguridad y la precisión de la señal fluorescente detectada son mejores que las de un complejo en el que el pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano se une a otros materiales que se sabe que se acumulan en un tumor. De este modo, una tasa de capacidad para detectar una microlesión es alta, y la precisión de la escisión de una lesión se puede mejorar.
- La expresión "verde de indocianina (ICG)" usada en este documento significa un tinte de imagen fluorescente de una región del infrarrojo cercano que se usa ampliamente en los campos biológico y médico. Dado que el ICG se degrada y luego se elimina o excreta en la orina y las heces aproximadamente una hora después de ser inyectado en un cuerpo humano, el ICG es ventajoso en la aplicación clínica como un tinte fluorescente aplicable al cuerpo humano. De hecho, los casos de aplicación de ICG al cuerpo humano han sido reportados en muchas revistas. Como ejemplo, se ha informado que, en clínica, ICG se usa de manera segura para 18 pacientes con cáncer de mama (véase, T. Kitai, et al., Breast Cancer, 12:211-215, 2005). También, la adsorción y la unión del pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano se pueden lograr mezclando el pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano con la MAA de la presente invención.
- Durante la preparación de un complejo en el que MAA está unida a ICG (ICG-MAA), se ha encontrado que una proporción de mezcla apropiado para preparar un complejo que muestra un alto nivel de una señal fluorescente en el infrarrojo cercano es 3.9 μM de ICG para 0.23 mg/ml de MAA, 6.5 μM de ICG a 2.3 mg/ml de MAA, y 6.5 μM de ICG a 11.5 mg/ml de MAA (Tabla 1 y Figura 4). Cuando se inyecta en un cuerpo, ya que las concentraciones varían debido a la difusión in vivo, la concentración exacta no se puede determinar en el punto de inyección. Sin embargo, se ha encontrado experimentalmente que el valor fluorescente más alto se muestra a 65 μM , que es una concentración 10 veces mayor. Además, como resultado de investigar si el complejo construido muestra estabilidad tanto en condiciones in vitro como in vivo, se puede encontrar que un nivel relativamente alto de intensidad de señal fluorescente y estabilidad se muestran tanto en condiciones in vivo como in vitro (Figuras 5 y 6).
- La expresión "isótopo radioactivo" usada en este documento significa un elemento que tiene el mismo número atómico pero diferente peso atómico, por esa razón capaz de emitir radioactividad, en la que el isótopo radioactivo también se usa generalmente como un importante agente de etiquetado para diagnosticar enfermedades usando una propiedad de la emisión de rayos gamma y otras partículas subatómicas para la desintegración radiactiva. El isótopo radioactivo se puede inyectar en un sitio generador de cáncer en un tejido profundo donde no se detecta la fluorescencia generada por el pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano, para que una lesión cancerosa se identifique con precisión antes de la escisión, cuando el cáncer se extirpa quirúrgicamente. y, de este modo, puede aumentar la tasa de éxito de la cirugía del cáncer. El isótopo radioactivo puede ser cualquier isótopo radioactivo que tenga la capacidad de marcar MAA capaz de unirse a una lesión cancerosa, pero no específicamente limitado a este. Preferiblemente, el isótopo radioactivo puede ser H-3, C-14, P-32, S-35, Cl-36, Cr-51, Co-57, Co-58, Cu-64, Fe-59, Y-90, I-124, I-125, Re-186, I-131, Tc- 99m, Mo-99, P-32, CR-51, Ca-45, y Ca-68, etc. Más preferiblemente, el isótopo radioactivo se puede usar médicamente 11-124, I-125, I-131, Cu-64, Tc-99m, Mo-99, CR- 51, Ca-45, y Ca-68, etc. Más preferiblemente, se puede usar Tc-99m. El cáncer puede ser cualquier cáncer que se pueda extirpar a través de la resección quirúrgica sin limitación. El cáncer puede ser la mayoría de los cánceres sólidos, tal como el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de piel, cáncer cervical, cáncer de pulmón, tumor cerebral, tumor gastrointestinal, cáncer de hígado, sarcoma de tejidos blandos y linfoma, pero no se limita a estos.
- La expresión "Tc-99m" usada en este documento es un isótopo radioactivo de tecnecio (Tc) que tiene una vida media corta de 6 horas, emite rayos gamma, por lo que se usa para obtener imágenes, muestra una dosis de

exposición muy pequeña y una velocidad de penetración de tejido excelente, y no causa una respuesta alérgica que se muestra en algunos pigmentos. De este modo, Tc-99 m es ampliamente usado en una investigación médica.

5 Cuando se hace reaccionar MAA a $[Tc-99m]TcO_4^-$, que es un isótopo radioactivo, se puede construir un complejo en el que el isótopo radioactivo se une a MAA con un rendimiento del 99% o más. Cuando el complejo se inyecta en un cuerpo, se puede identificar un sitio inyectado hasta 20 horas después de la inyección (Figura 3). Cuando la MAA reacciona secuencialmente con $[Tc-99m]TcO_4^-$, que es un isótopo radioactivo, e ICG, que es un pigmento del infrarrojo cercano, un complejo, al cual se unen el isótopo radioactivo y el pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano ($[Tc-99m] Tc-ICG-MAA$), se puede construir (Figura 10). Un sitio inyectado del complejo construido se puede identificar después de 20 horas de inyección en un cuerpo (Figura 11).

10 Para maximizar la aplicabilidad de un complejo en el que un pigmento para teñir un tejido vivo se une a MAA como un agente de etiquetado in vivo, se puede mejorar una propiedad física del complejo usando fibrina, que no está según la invención. A saber, el complejo se inyecta en una región de la lesión en un cuerpo para desempeñar un papel de etiquetado de la lesión para permitir que la región de la lesión se reconozca claramente durante la cirugía. Para que el complejo logre fácilmente el objetivo como agente de etiquetado descrito anteriormente, la difusión se debe evitar al máximo en el sitio de la lesión inyectado. Como una herramienta para lograr el objetivo, se puede usar fibrina, que no está según la invención (Figura 1, comparativa). La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra que, cuando la fibrina se añade a un complejo que incluye MAA e ICG, la retención del complejo en el tejido aumenta la retención in vivo. Como se muestra en la figura 1, la fibrina desempeña un papel en la unión de los complejos inyectados a la vez en un cuerpo y, de este modo, se puede evitar que los complejos inyectados en un cuerpo se difundan al máximo. Un complejo de ICG-MAA-fibrina, al que se une la fibrina de coagulación sanguínea, se construye mezclando y haciendo reaccionar la mezcla 1 y la mezcla 2 con el complejo construido (ICG-MAA) en el que la MAA está unida a ICG, en el que la mezcla 1 incluye trombina y aprotinina, y la mezcla 2 incluye fibrinógeno y $CaCl_2$. Se ha investigado si el complejo de fibrina ICG-MAA construido de este modo muestra estabilidad en condiciones tanto in vitro como in vivo y, como resultado, se ha encontrado que se muestran un nivel relativamente alto de intensidad y estabilidad de la señal fluorescente en el infrarrojo cercano tanto en condiciones in vitro como in vivo (Figuras 5 y 6, comparativas). También, dado que el grado de difusión con el transcurso del tiempo del complejo de ICG-MAA-fibrina es menor que el del complejo en el que MAA está unida a ICG (ICG-MAA) en condiciones in vitro e in vivo, se ha encontrado que el complejo de ICG-MAA-fibrina muestra una propiedad ventajosa como agente de etiquetado para una lesión cancerosa (Figuras 7, 8 y 9, comparativas).

30 Además, como se describió anteriormente, como otra herramienta para lograr un propósito de prevenir la difusión in vivo del complejo, se puede usar una esponja de gelatina, que está según la presente invención. Cuando se usa gelatina que tiene una excelente compatibilidad in vivo y puede formar fácilmente un gel a temperatura ambiente, se puede formar una construcción en la que el complejo está encapsulado en una forma agregada dentro de la gelatina. Al inyectar la construcción formada de este modo en un cuerpo, la difusión del complejo en el sitio de inyección puede ser inhibida al máximo por la gelatina. Sin embargo, la gelatina tiene una limitación, en la cual la gelatina se disuelve fácilmente en el ambiente vivo, y de este modo la construcción puede ser destruida. Para superar la limitación, se usa esponja de gelatina en lugar de gelatina, para que la limitación se pueda superar.

40 La esponja de gelatina es una construcción en la que se produce un enlace isopeptídico entre un grupo amina de una cadena lateral de lisina y un grupo carboxílico de una cadena lateral de glutamato o aspartato presente en la gelatina calentando una solución de gelatina a alta temperatura. La esponja de gelatina muestra una compatibilidad in vivo igual a la de la gelatina, mientras que tiene una solubilidad en agua relativamente baja y, de este modo, la esponja de gelatina no se disuelve fácilmente en un cuerpo. De este modo, cuando se forma una construcción en la que el complejo de la presente invención se encapsula en una forma agregada usando la esponja de gelatina e inyectando la construcción al cuerpo, ya que la esponja de gelatina no se disuelve en un cuerpo, la construcción inyectada no se destruye. De este modo, la difusión del complejo en el sitio inyectado se puede inhibir más eficazmente.

50 Según un ejemplo de la presente invención, la esponja de gelatina que incluye una estructura cruzada se prepara calentando la solución de gelatina durante 3 horas a 160 °C, y cada una de gelatina y esponja de gelatina se sumerge en agua destilada y se deja durante 24 horas. Como resultado, se ha encontrado que la gelatina se disuelve completamente en agua destilada, mientras que la esponja de gelatina no se disuelve en agua, lo que indica una mayor estabilidad (Figura 12).

55 Cuando se usa la esponja de gelatina descrita anteriormente, se puede preparar una construcción para incluir un pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano e isótopo radioactivo juntos. A saber, una construcción se puede construir para incluir un complejo en el que MAA está unida a un pigmento ICG fluorescente en el infrarrojo cercano (ICG-MAA), o un complejo en el que MAA está unida a un isótopo radioactivo $[Tc-99m]Tc$ y un pigmento ICG fluorescente en el infrarrojo cercano ($[Tc-99m] Tc-ICG-MAA$) en la esponja de gelatina. Además, se puede construir una construcción para incluir por separado un isótopo radioactivo y un complejo en el que MAA se une a un pigmento ICG fluorescente en el infrarrojo cercano (ICG-MAA) en la esponja de gelatina. Como tal, en el caso en el que el complejo y el isótopo radioactivo se incluyen por separado, se puede incluir una herramienta para inmovilizar efectivamente el isótopo radioactivo en la esponja de gelatina. Como herramienta de inmovilización, se puede usar una bobina de lámina de oro unida por isótopo radioactivo, pero no se limita específicamente a esta, siempre que la

- herramienta de inmovilización logre el propósito de inmovilizar el isótopo radioactivo (Figura 2). La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra una estructura y un método de inyección de un agente de etiquetado de tipo sólido construido mediante la adición de una bobina de lámina de oro unida por isótopo radioactivo, y gelatina al complejo, que incluye MAA e ICG. Como se muestra en la figura 2, el agente de etiquetado se puede construir usando un complejo al que un isótopo radioactivo no está unido (ICG-MAA) y añadiendo el isótopo radioactivo según sea necesario. Por lo tanto, al utilizar la esponja de gelatina, se puede mejorar la aplicabilidad del agente de etiquetado basado en MAA.
- Según un ejemplo de la presente invención, se construye un agente de etiquetado de tipo sólido que incluye una bobina de lámina de oro unida a isótopo radioactivo, ICG, MAA y esponja de gelatina, y se compara su estabilidad en condiciones in vitro e in vivo con la de un agente de etiquetado de tipo sólido de control que solo incluye ICG y esponja de gelatina. Como resultado, se ha encontrado que, en condiciones in vitro, el ICG en el agente de etiquetado de tipo sólido de control se difunde y, de este modo, se detecta una señal fluorescente en el infrarrojo cercano en el agua destilada per se después de 8 y 24 horas, mientras que una velocidad de difusión de ICG del agente de etiquetado de tipo sólido de la presente invención se encuentra en un nivel relativamente bajo (Figura 13). También, se ha encontrado que, en condiciones in vivo, no se detecta más señal fluorescente en el infrarrojo cercano para el agente de etiquetado de tipo sólido de control después de tres semanas, mientras que una señal fluorescente en el infrarrojo cercano aún se detecta para el agente de etiquetado de tipo sólido de la presente invención (Figura 14).
- Según otro aspecto que no está según la presente invención, se proporciona un método para proporcionar información sobre un sitio de una lesión cancerosa que incluye: (a) administrar la composición de etiquetado de una lesión cancerosa a una lesión cancerosa generada en un sujeto; y (b) identificar un sitio que genere una señal seleccionada del grupo que consiste en color, fluorescencia del infrarrojo cercano, radioactividad y combinación de los mismos del sujeto.
- La expresión "sujeto" usado en este documento significa un organismo vivo en el que se puede generar un cáncer para presentar así una lesión, y al que se le puede administrar el complejo o la composición de etiquetado de una lesión cancerosa de la presente invención.
- Cuando la composición de etiquetado de una lesión cancerosa proporcionada en la presente invención se administra al tejido de una lesión cancerosa de un cuerpo, la composición administrada se une a la lesión cancerosa y, de este modo, se puede etiquetar un sitio de la lesión a través del color, fluorescencia infrarroja, radiactividad o combinación de los mismos. Al detectar la etiqueta, es posible detectar el sitio y el tamaño de la lesión cancerosa en tiempo real durante la cirugía. Por lo tanto, se puede mejorar la precisión y evitar la pérdida excesiva de tejido normal durante la extirpación quirúrgica de una lesión cancerosa.
- Además, el complejo incluido en la composición de la presente invención puede permanecer en una lesión cancerosa en un cuerpo durante un largo período de tiempo en relación con un complejo en el que un pigmento para teñir un tejido vivo se une a otros materiales, y de este modo, la precisión de la escisión de la lesión cancerosa se puede verificar fácilmente durante un procedimiento quirúrgico, así como la escisión quirúrgica de la lesión cancerosa. Por ejemplo, a través de ultrasonido, se identifica un sitio de microlesión antes de la cirugía. Luego, el complejo de la presente invención se inyecta en la región de la lesión para hacer que la región de la lesión se identifique de manera estable y precisa durante la cirugía, que se realiza pocas horas después.
- Como otro aspecto más de la presente invención, la presente invención proporciona un kit que incluye la composición para etiquetar una lesión cancerosa y un complejo en el que un pigmento para teñir tejido vivo se une a MAA incluido en la composición, en el que el complejo está encapsulado dentro de gelatina o esponja de gelatina. El kit o complejo se puede usar para identificar un sitio y el tamaño del tejido de la lesión cancerosa en tiempo real durante la cirugía de extirpación del cáncer.
- La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra que, cuando la fibrina se añade a un complejo que incluye MAA e ICG, la retención in vivo del complejo en el tejido se ve aumentada por la fibrina añadida (comparativo).
- La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra una estructura y un método de inyección de un agente de etiquetado de tipo sólido construido mediante la adición de una bobina de lámina de oro unida por isótopo radioactivo, y gelatina al complejo, que incluye MAA y ICG.
- La figura 3 es una imagen gamma que muestra si [Tc-99m] Tc-MAA se cambia o no con el transcurso del tiempo en un ratón desnudo inyectado con [Tc-99m] Tc-MAA (comparativo).
- La figura 4 es un gráfico que muestra los cambios en la intensidad de la señal de la fluorescencia del infrarrojo cercano de los complejos ICG-MAA dependiendo de los cambios de concentración de ICG y MAA (comparativo).
- La figura 5 es un gráfico que muestra los cambios en la intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano de complejos de ICG-HSA, ICG-MAA, ICG-MAA-fibrina y ICG-glicol-quitosano con el transcurso del tiempo en condiciones in vitro (comparativo).

La figura 6 es un gráfico que muestra los cambios con el transcurso del tiempo en la intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano de los complejos ICG-HSA, ICG-MAA, ICG-MAA-fibrina y ICG-glicol-quitosan, que se inyectan en ratones desnudos (comparativo).

5 La figura 7 son imágenes que muestran una forma de cada complejo observado en la barriga de cerdo o pechuga de pollo inyectada con el complejo de ICG-MAA-fibrina o el complejo de ICG-MAA (comparativo).

La figura 8 es una imagen fluorescente que muestra los niveles de difusión del complejo de ICG-MAA-fibrina y el complejo de ICG-MAA inyectados en el tejido muscular con el transcurso del tiempo (comparativo).

La figura 9 es una imagen fluorescente que muestra los niveles de difusión del complejo de ICG-MAA-fibrina y el complejo de ICG-MAA inyectados en ratones desnudos con el transcurso del tiempo (comparativo).

10 La figura 10 es un gráfico que muestra una tasa de etiquetado de un complejo en el que MAA está unida a Tc-99m (comparativo).

La figura 11 es una imagen que muestra cambios en una señal fluorescente de cada agente de etiquetado en ratones con el transcurso del tiempo, en la que los ratones se administran respectivamente con [Tc-99m] Tc-ICG-MAA y [Tc-99m] Tc-ICG-HAS, que son agentes de etiquetado para una lesión cancerosa (comparativo).

15 La figura 12 es una imagen que muestra el resultado de comparar los niveles de difusión de gelatina y esponja de gelatina con el transcurso del tiempo (según la invención).

La figura 13 es una imagen que muestra los cambios en la intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano de un agente de etiquetado de tipo sólido y un ICG-Spongostán de control con el transcurso del tiempo, en el que el agente de etiquetado de tipo sólido incluye una bobina de lámina de oro unida por isótopo radioactivo ICG, MAA y esponja de gelatina (según la invención).

20 La figura 14 es una imagen que muestra la intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano del agente de etiquetado de tipo sólido, ICG-Spongostán y gelatina ICG, que se inyectan en ratones desnudos, con el transcurso del tiempo (según la invención).

En lo que sigue, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

25 **Ejemplo 1: construcción de albumina macroagregada (MAA)**

Se mezclaron 10 ml de albúmina de suero humano al 2% diluida en solución reguladora de acetato 0.1 M (pH 5.4) con 50 mg de cloruro de estaño y se agitó vigorosamente durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de agitación adicional durante 20 minutos a 70 °C para la reacción. Después de que la reacción se detuvo, el reactivo se enfrió. Luego, se añadieron 0.35 ml de 20% de albúmina de suero humano y el resultado se agitó nuevamente durante 10 minutos. El reactivo fue alícuota en un vial de vidrio (2 mg para cada uno, basado en MAA) y se liofilizó para preparar tiol MAA.

30 **Ejemplo 2: complejo de maa unida a isótopo radioactivo e investigación de la disponibilidad del mismo (comparativo)**

35 Se añadieron 2 ml de [Tc-99m] TcO₄-(10 mCi/ ml), que es un isótopo radioactivo, al tiol MAA construido en el ejemplo 1. La mezcla resultante se hizo reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente para construir un complejo de MAA unida a isótopos radiactivos ([Tc-99m] Tc-MAA). Para investigar si el isótopo radioactivo normalmente se une a MAA, el complejo se aplica en cromatografía instantánea de capa fina (ITLC) y se desarrolla usando acetona como solvente y, como un resultado, se ha encontrado que al menos el 99% de tiol MAA se une al isótopo radioactivo, formando así un complejo.

40 Además, para investigar si el complejo construido se puede usar como un agente de etiquetado in vivo, se realizó un experimento de la siguiente manera: el [Tc-99m]Tc-MAA 1 mCi/50 µl construido se inyectó en una nalga izquierda de un ratón desnudo. Se tomó una imagen gamma del ratón desnudo usando un dispositivo SPECT animal (Nano-SPECT, Bioscan) inmediatamente después de la inyección (0 h) y 20 horas después de la inyección (20 h) (Figura 3). La figura 3 es una imagen gamma que muestra si [Tc-99m] Tc-MAA se cambia o no con el transcurso del tiempo en el ratón desnudo inyectado con [Tc-99m] Tc-MAA. Como se muestra en la figura 3, se ha encontrado que, inmediatamente después de (0 h) y 20 horas después de (20 h) la inyección, [Tc-99m]Tc-MAA continuó permaneciendo persistentemente en la lesión inyectada.

45 **Ejemplo 3: preparación de agente de etiquetado basado en maa unida a indocianina verde (ICG) e investigación de la disponibilidad del mismo**

50 Como se esperaba que un complejo, en el que MAA se une al verde de indocianina (ICG) capaz de generar una señal fluorescente en el infrarrojo cercano, se pueda usar como agente de etiquetado que actúe de forma estable in vivo, el complejo se construyó y la disponibilidad del mismo se investigó como un agente de etiquetado in vivo.

Ejemplo 3-1: determinación de la proporción de mezcla de ICG y MAA

Para preparar un agente de etiquetado basado en MAA que presenta fluorescencia del infrarrojo cercano, el verde de indocianina que presenta fluorescencia del infrarrojo cercano se unió al MAA construido para construir un complejo (ICG-MAA).

- 5 Para determinar una proporción de mezcla de MAA e ICG que hace posible presentar la fluorescencia del infrarrojo cercano más fuerte, ICG de 1.3 a 1032 μM y MAA de 0 a 11.5 $\text{mg}/\text{m}\ell$ se hicieron reaccionar en diversas proporciones para construir el complejo de ICG-MAA respectivo. Luego, se midió la intensidad de la señal de fluorescencia del infrarrojo cercano generada por cada uno de los complejos ICG-MAA construidos (Tabla 1 y Figura 4). La figura 4 es un gráfico que muestra los cambios en la intensidad de la señal de la fluorescencia del infrarrojo cercano del complejo de ICG-MAA dependiendo de los cambios de concentración de ICG y MAA.
- 10

[Tabla 1]

Intensidad de la señal de fluorescencia en el infrarrojo cercano del complejo de ICG-MAA según el cambio de concentración de ICG y MAA				
ICG (μM)	MAA($\text{mg}/\text{m}\ell$)			
	0	0.23	2.3	11.5
1.3	18	42	238	530
3.9	120	52	424	931
6.5	212	38	456	979
9.0	289	32	444	942
12.9	363	27	342	915
25.8	466	12	255	563
38.7	425	8	162	366
51.6	399	7	101	280
64.5	374	13	75	244
77.4	332	16	55	182
103	289	23	39	94
258	139	30	16	60
516	71	13	2	20
774	39	6	2	9
1032	30	6	1	4

- 15 Como se muestra en la tabla 1 y la figura 4, cuando no se trató MAA, 25.8 μM de ICG mostró el valor más alto de intensidad de señal de fluorescencia del infrarrojo cercano. Cuando se trataron 0.23 $\text{mg}/\text{m}\ell$ de MAA, 3.9 μM de ICG mostraron el valor más alto de intensidad de señal de la fluorescencia del infrarrojo cercano. Cuando se trataron 2.3 $\text{mg}/\text{m}\ell$ de MAA, 6.5 μM de ICG mostraron el valor más alto de intensidad de señal de fluorescencia del infrarrojo cercano. Cuando se trataron 11.5 $\text{mg}/\text{m}\ell$ de MAA, 6.5 μM de ICG también mostraron el valor más alto de intensidad de señal de la fluorescencia del infrarrojo cercano.

Para la inyección in vivo, la concentración se cambió debido a la difusión in vivo, etc., de modo que la concentración exacta no se puede determinar en el punto de inyección. Sin embargo, se ha encontrado experimentalmente que 65 μM , que es 10 veces la concentración, mostró el mayor valor de fluorescencia.

Ejemplo 3-2: construcción del complejo unido a ICG (comparativo)

5 Usando el resultado obtenido de los ejemplos, se construyeron diversos complejos unidos a ICG.

En primer lugar, se añadieron 65 μM de ICG y se hicieron reaccionar con albúmina de suero humano (HSA), glicol quitosán o MAA para construir los complejos respectivos (ICG-HSA, ICG-MAA y ICG-glicol quitosán).

10 El ICG-MAA construido de este modo se mezcló y reaccionó con la mezcla 1 y la mezcla 2 para construir un complejo de ICG-MAA-fibrina al que se unía la fibrina de coagulación sanguínea, en la que la mezcla 1 incluye trobina y aprotinina y la mezcla 2 incluye fibrinógeno y CaCl_2 . Las velocidades de mezcla del fibrinógeno, la aprotinina, la trobina y el CaCl_2 fueron de 25 mg/ml, 500 KIU/ml, 250 UI/ml y 4 mg/ml, respectivamente.

Ejemplo 3-3: investigación de la estabilidad de la fluorescencia del infrarrojo cercano del complejo unido a ICG (comparativo)

15 Debido a la característica de uso, ya que una composición de etiquetado de tejido que tiene un período de tiempo más largo de emisión de fluorescencia es ventajosa en uso en una sala de operaciones cuando la composición se inyecta en un tejido vivo y etiqueta el sitio inyectado, se investigó la estabilidad in vitro o in vivo de la fluorescencia del infrarrojo cercano de 4 complejos construidos anteriormente.

Ejemplo 3-3-1: investigación de estabilidad in vitro (comparativo)

20 La intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano emitidas por cuatro complejos construidos en el ejemplo 3-2 en condiciones in vitro se midió durante 800 horas (Figura 5). La figura 5 es un gráfico que muestra los cambios en la intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano de los complejos de ICG-HSA, ICG-MAA, ICG-MAA-fibrina y ICG-glicol-quitosano con el transcurso del tiempo en condiciones in vitro. Como se muestra en la figura 5, se ha encontrado que los complejos que incluyen ICG-MAA mostraron un nivel relativamente alto de intensidad y estabilidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano. También, se puede encontrar que ICG-MAA-fibrina mostró un nivel relativamente alto de intensidad y estabilidad de una señal fluorescente en el infrarrojo cercano que ICG-MAA.

Ejemplo 3-3-2: investigación de estabilidad in vivo (comparativo)

30 Se inyectaron 50 μl de cuatro complejos construidos en el ejemplo 3-2, respectivamente, en el muslo de ratones desnudos. Luego, los cambios en las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano generadas en cada ratón desnudo se midieron usando el dispositivo Xenogen Lumina durante 3 semanas (Figura 6). La figura 6 es una imagen que muestra cambios con el transcurso del tiempo en la intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano de los complejos de ICG-HSA, ICG-MAA, ICG-MAA-fibrina y ICG-glicol quitosano inyectados en ratones desnudos. Como se muestra en la figura 6, los niveles altos de señales fluorescentes en el infrarrojo cercano se presentaron en los cuatro complejos inmediatamente después de la inyección. Sin embargo, después de una semana, las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano exhibidas en complejos de quitosán ICG-HSA e ICG-glicol se redujeron rápidamente. Después de tres semanas, casi no se detectó señal fluorescente en el infrarrojo cercano en los complejos de quitosán ICG-HSA e ICG-glicol. En contraste, se ha encontrado que las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano exhibidas en los complejos ICG-MAA e ICG-MAA-fibrina se mantuvieron en cierto nivel después de tres semanas.

40 A través del resultado de los ejemplos, se puede encontrar que los complejos que incluyen ICG-MAA mostraron un nivel relativamente alto de intensidad de señal y estabilidad in vitro e in vivo en el infrarrojo cercano. Se esperaba que, aunque se usaba el mismo pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano, se derivaban los diferentes resultados, ya que los complejos, que no incluyen ICG-MAA, se degradarían y absorberían en un cuerpo en un tiempo relativamente corto. En particular, se puede encontrar que ICG-MAA-fibrina mostró una propiedad muy ventajosa como agente de etiquetado para una lesión cancerosa al mostrar una alta estabilidad al mantener una forma debido a la fibrina de coagulación sanguínea añadida junto con MAA.

Ejemplo 3-4: comparación de la disponibilidad del complejo ICG-MAA-FIBRINA y el complejo icg-maa (comparativo)

50 Como se ha encontrado que el complejo de ICG-MAA-fibrina y el complejo de ICG-MAA, que incluyen ICG-MAA, mostraron una propiedad muy ventajosa como agente de etiquetado para una lesión cancerosa a través de los resultados del ejemplo 3-3, se compararon los efectos de cada complejo como agente de etiquetado para una lesión cancerosa.

Ejemplo 3-4-1: comparación de formas inyectadas en tejido (comparativo)

Cada complejo se inyectó en la pechuga de pollo, que es un tipo de tejido muscular, o barriga de cerdo, que es un tipo de tejido adiposo. Luego, el tejido inyectado se diseccionó en un espesor de 1 a 2 mm. Posteriormente, se compararon las formas de cada complejo observado en cada tejido diseccionado (Figura 7). La figura 7 son imágenes que muestran una forma de cada complejo observado en la barriga de cerdo o pechuga de pollo inyectada con el complejo de ICG-MAA-fibrina o el complejo de ICG-MAA. Como se muestra en la figura 7, se ha encontrado que surge un fenómeno en el que, cuando se inyectó el complejo de fibrina ICG-MAA, el complejo se coaguló inmediatamente en el tejido y mantuvo una forma ovalada, sin embargo, cuando se inyectó el complejo de ICG-MAA, el complejo fue difundido al tejido muscular junto con un grano de músculo, y el complejo se difundió en el tejido adiposo junto con una marca de aguja.

De este modo, se puede encontrar que, cuando ICG-MAA-fibrina, que se coagula con la fibrina de coagulación de la sangre, se inyecta en el tejido vivo, el complejo estaba menos difundido que el ICG-MAA incluso en tejido conectivo denso, y de este modo es posible etiquetar más delicadamente una lesión.

Ejemplo 3-4-2: comparación del nivel de difusión en el tejido con el transcurso del tiempo (comparativo)

Se esperaba que, cuando cada complejo inyectado en tejido vivo se difundiera en el tejido, una región que presentaba una señal fluorescente en el infrarrojo cercano se ensanchaba, de modo que se podría restringir el papel de etiquetar delicadamente una región de lesión.

Para investigar esto, se inyectaron el complejo de ICG-MAA-fibrina y el complejo de ICG-MAA en la pechuga de pollo, y se compararon los niveles de difusión de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano exhibidas por cada complejo en el punto de inyección y dos días después de la inyección (Figura 8). La figura 8 es una imagen fluorescente que muestra los niveles de difusión del complejo de ICG-MAA-fibrina y el complejo de ICG-MAA inyectados en el tejido muscular con el transcurso del tiempo. Como se muestra en la figura 8, se puede encontrar que la coagulación se produjo después de la inyección del complejo de ICG-MAA-fibrina, de manera que ICG-MAA se bloqueó en la fibrina y, de este modo, incluso después de que el tiempo haya pasado, el aumento en un tamaño de una región que presenta una señal fluorescente en el infrarrojo cercano causada por difusión no se produjo, sin embargo, una región de presentar una señal fluorescente en el infrarrojo cercano para el complejo de ICG-MAA se aumentó con el transcurso del tiempo.

Ejemplo 3-4-3: comparación del nivel de difusión en ratón con el transcurso de tiempo (comparativo)

Para investigar si los resultados de los ejemplos se pueden aplicar in vivo, se inyectó subcutáneamente a un ratón desnudo con el complejo de ICG-MAA-fibrina o el complejo de ICG-MAA. Luego, los niveles de difusión de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano exhibidas por cada complejo se midieron usando el dispositivo Xenogen Lumina en el punto de inyección y dos días después de la inyección (Figura 9). La figura 9 es una imagen que muestra los niveles de difusión del complejo de ICG-MAA-fibrina y el complejo de ICG-MAA inyectados en los ratones desnudos con el transcurso del tiempo. Como se muestra en la figura 9, similar al resultado de la figura 8, se puede encontrar que la coagulación se produjo después de la inyección del complejo de ICG-MAA-fibrina, de manera que el ICG-MAA se bloqueó en la fibrina y, de este modo, incluso después de que el tiempo haya pasado, el aumento en un tamaño de una región que presenta una señal fluorescente en el infrarrojo cercano causada por la difusión no se produjo, sin embargo, una región de exhibir una señal fluorescente en el infrarrojo cercano cercana para el complejo de ICG-MAA se incrementó con el transcurso del tiempo.

De este modo, se ha encontrado que el complejo de ICG-MAA-fibrina mostró un bajo nivel de difusión a lo largo del tiempo y también mostró la fluorescencia y la estabilidad in vivo más destacadas, exhibiendo así una propiedad ventajosa como un agente de etiquetado para una lesión cancerosa.

Ejemplo 4: preparación de [Tc-99m] Tc-ICG-MAA e investigación de efectos

Ejemplo 4-1: preparación de [Tc-99m] Tc-ICG-MAA

A la MAA construida en el ejemplo 1, se IE añadió [Tc-99m]TcO₄- 20 mCi/2mL. Luego, la mezcla resultante se hizo reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de detener la reacción, se añadieron 42 µg/µL de verde de indocianina (ICG), seguido de una reacción adicional durante 10 minutos a temperatura ambiente para preparar un complejo en el que MAA se etiquetó con un pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano, esto es, ICG y un isótopo radioactivo, esto es, Tc-99m.

Para investigar si el complejo construido estaba normalmente etiquetado con Tc-99m, el complejo se aplicó en cromatografía instantánea de capa fina (ITLC) y se desarrolló usando acetona como solvente (Figura 10). La figura 10 es un gráfico que muestra una tasa de etiquetado del complejo en el que MAA se unió a Tc-99m. Como se muestra en la figura 10, se puede encontrar que la tasa de etiquetado fue de al menos el 99%. Además, se midió una señal fluorescente en el infrarrojo cercano de ICG usando el dispositivo fluorescente Safire II (RFU 7,612).

De este modo, se ha encontrado que el complejo [Tc-99m] Tc-ICG-MAA se puede preparar usando MAA.

Ejemplo 4-2: investigación de efectos de [Tc- 99m] Tc-ICG-MAA (comparativo)

En términos de un nivel de dilución en tejidos vivos con el transcurso del tiempo, el complejo [Tc-99m] Tc-ICG-MAA se comparó con un agente de etiquetado típico para una lesión cancerosa para investigar si el complejo [Tc-99m]Tc-ICG-MAA se puede aplicar como agente de etiquetado para una lesión cancerosa.

5 Específicamente, se preparó un complejo ([Tc-99m] Tc-ICG-HSA), en el que la albúmina de suero humano se etiquetó con un pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano, esto es, ICG, y un isótopo radioactivo, esto es, Tc-99m, como un agente de etiquetado típico para una lesión cancerosa.

10 Se inyectó 1 mCi/50 μ l del complejo construido ([Tc-99m] Tc-ICG-HSA) en una nalga derecha de un ratón desnudo, y 1 mCi/50 μ l del complejo construido en el ejemplo 4-1 ([Tc-99m] Tc-ICG-MAA) se inyectó en una nalga izquierda del ratón desnudo. Luego, se tomó una imagen gamma del ratón desnudo usando un dispositivo SPECT animal (NanoSPECT, Bioscan) inmediatamente después de la inyección (0 h) y 20 horas después de la inyección (20 h) (Figura 11). La figura 11 es una imagen que muestra cambios en las señales fluorescentes con el transcurso del tiempo para cada agente de etiquetado en los ratones administrados respectivamente con [Tc-99m]Tc-ICG-MAA y [Tc-99m]Tc-ICG-HSA que son agentes de etiquetado para una lesión cancerosa. Como se muestra en la figura 11, se ha encontrado que, inmediatamente después de la inyección (0 h), ambos complejos permanecieron solo en la lesión inyectada, sin embargo, a las 20 horas después de la inyección (20 h), [Tc-99m]Tc-ICG-HSA se difundió en los tejidos adyacentes, de manera que la señal fluorescente se debilitó, mientras que [Tc-99m] Tc-ICG-MAA continuó permaneciendo persistentemente en la lesión inyectada.

Ejemplo 5: preparación del agente de etiquetado basado en MAA usando gelatina y la investigación de la disponibilidad del mismo

20 Dado que se ha esperado que un agente de etiquetado, que actúa in vivo de una manera más estable, se pueda construir usando una esponja de gelatina que muestre una alta compatibilidad in vivo durante la preparación de un complejo en el que MAA se une al verde de indocianina (ICG) capaz de generar una señal fluorescente en el infrarrojo cercano; y simultáneamente muestra estabilidad (lo que significa que el complejo no se degrada fácilmente in vivo), se construyó un complejo con la esponja de gelatina y se investigó su disponibilidad como agente de etiquetado in vivo.

Ejemplo 5-1: preparación de la bobina de la hoja de oro isotópica radiactiva

30 A una bobina con un material metálico (en un ensayo clínico) que puede verse fácilmente en imágenes de TC (rayos X) (por ejemplo, UltraClip), se añadieron 1.8 ml de HAuCl₄ 0.44 M, 3 g de CTAB, 2.5 g de butanol y 1.0 g de octano para dorar una superficie con el fin de obtener una bobina de lámina de oro. Se añadió [I-125]NaI 100 uCi a la bobina de lámina de oro, y la resultante se hizo reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación para construir una bobina de lámina de oro a la que se unía un isótopo radioactivo.

Ejemplo 5-2: preparación de la esponja de gelatina

35 Se añadieron 10 ml de agua destilada a 0.6 g de escamas de gelatina secas, y el resultante se calentó a 60 °C hasta que la gelatina se disolvió completamente para obtener una solución de gelatina. La solución de gelatina se dejó a 4 °C, durante una hora para preparar la gelatina. La gelatina preparada se calentó a 160 °C, durante 3 horas para preparar una esponja de gelatina que incluye una estructura cruzada. La estructura cruzada se formó produciendo un enlace isopeptídico haciendo reaccionar un grupo amina de una cadena lateral de lisina y un grupo carboxílico de una cadena lateral de glutamato o aspartato presente en la gelatina a alta temperatura.

40 Para investigar qué material entre la gelatina preparada y la esponja de gelatina muestra estabilidad in vivo, la gelatina y la esponja de gelatina se sumergieron en agua destilada y se dejaron durante 24 horas, como se midió la disolubilidad de la misma (Figura 12). La figura 12 es una imagen que muestra el resultado de comparar los niveles de disolución de la gelatina y la esponja de gelatina con el transcurso del tiempo. Como se muestra en la figura 12, se ha encontrado que la gelatina que no tiene reticulación formada en esta se disolvió completamente en agua dentro de un día, mientras que la esponja de gelatina que tiene una reticulación formada en esta no se disolvió en agua después de un día.

De este modo, se puede encontrar que la esponja de gelatina, en lugar de la gelatina, mostró estabilidad in vivo.

Ejemplo 5-3: preparación del agente de etiquetado de sólidos basado en MAA usando la esponja de gelatina y evaluación de la disponibilidad del mismo

50 Se construyó un agente de etiquetado de tipo sólido usando la MAA construida en el ejemplo 1, la bobina de lámina de oro unida al isótopo radioactivo construida en el ejemplo 5-1, la esponja de gelatina construida en el ejemplo 5-2, y el ICG, y sus características de una señal fluorescente en el infrarrojo cercano generada de este modo se midió.

Ejemplo 5-3-1: construcción de agente de etiquetado de tipo sólido

La MAA construido en el ejemplo 1 se mezcló con 6.5, 65 o 650 μ M de ICG. Luego, se añadió a la mezcla la bobina de lámina de oro unida al isótopo radioactivo construida en el ejemplo 5-1 para obtener una mezcla. Se añadió

gelatina a la mezcla y la mezcla resultante se calentó a 160 °C, durante 3 horas para preparar un agente de etiquetado de tipo sólido que incluye la bobina ICG de la hoja de oro unida al isótopo radioactivo, MAA y esponja de gelatina (Bobina de radio oro/EBICG- MAA-esponja de gelatina).

5 Cada uno de los agentes de etiquetado de tipo sólido construido se sumergió en agua destilada y se dejó durante un día, ya que la intensidad de la fluorescencia del infrarrojo cercano se midió inmediatamente después de la inmersión (0 horas) y 8 horas y 24 horas después de la inmersión, y en comparación con los del control (Figura 13). Como control, se preparó ICG-Spongostán y se usó mezclando Spongostán, que es una de las esponjas de gelatina disponibles convencionalmente, con 6.5, 65 o 650 μM de solución de ICG. La figura 13 es una imagen que muestra los cambios en la intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano del control ICG-Spongostán y el agente de etiquetado de tipo sólido que incluye la bobina de lámina de oro unida al isótopo radioactivo, ICG, MAA y esponja de gelatina con el transcurso del tiempo. Como se muestra en la figura 13, bajo la misma concentración de ICG, el agente de etiquetado de tipo sólido mostró un nivel relativamente alto de intensidad de una señal fluorescente en el infrarrojo cercano que el control. Después de 8 y 24 horas, se difundió ICG en el control, de modo que se detectó una señal fluorescente en el infrarrojo cercano en el agua destilada per se, mientras que la tasa de difusión de ICG del agente de etiquetado de tipo sólido se encontraba en un nivel bajo.

Además, los agentes de etiquetado de tipo sólido, que incluyen respectivamente diferentes concentraciones de ICG, se puede encontrar que el agente de etiquetado de tipo sólido que incluye 650 μM de ICG mostró el nivel más alto de intensidad de una señal fluorescente en el infrarrojo cercano.

20 **Ejemplo 5-3-2: comparación del nivel de difusión del ICG y la intensidad de la señal fluorescente del infrarrojo cercano en ratón con el transcurso del tiempo**

Se inyectaron subcutáneamente ICG-gelatina, ICG-Spongostán, y cada agente de etiquetado de tipo sólido construido por el método en los ejemplos usando ICG que tienen diferentes concentraciones entre sí (6.5, 65 o 650 μM) en ratones desnudos. Cada ratón desnudo se aplicó en el dispositivo Xenogen Lumina inmediatamente después de la inyección (0 h), o un día (1 día), una semana (1 semana) o tres semanas (3 semanas) después de la inyección para medir la intensidad de las señales de fluorescencia del infrarrojo cercano exhibidas en cada sitio de inyección (Figura 14). La figura 14 es una imagen que muestra la intensidad de las señales fluorescentes en el infrarrojo cercano del agente de etiquetado de tipo sólido, ICG-Spongostán y ICG-gelatina inyectados en los ratones desnudos con el transcurso del tiempo. Como se muestra en la figura 14, para el agente de etiquetado de tipo sólido de la presente invención, se detectó una señal fluorescente en el infrarrojo cercano después de 3 semanas, sin embargo, para ICG-Spongostán e ICG-gelatina, casi no se detectó señal fluorescente en el infrarrojo cercano después de 3 semanas. También, cuando se inyectó el agente de etiquetado de tipo sólido de la presente invención, se puede encontrar que se detectó un alto nivel de una señal fluorescente en el infrarrojo cercano en el caso donde se usó un alto nivel de concentración de ICG durante la preparación del agente de etiquetado de tipo sólido.

35 En resumen, se puede encontrar que el complejo de la presente invención tiene una propiedad ventajosa como agente de etiquetado, porque el complejo permanece en la lesión inyectada durante un largo período de tiempo, de modo que la tasa de detección de micro lesiones es alta; y también la precisión de la escisión de la lesión es excelente debido a la fuerte señal.

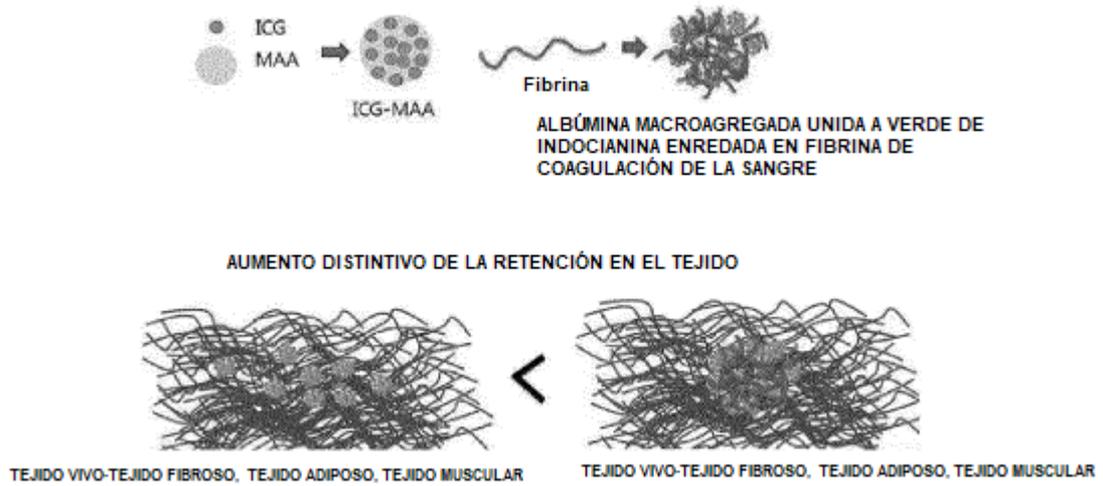
Aplicabilidad industrial

40 La composición de etiquetado de una lesión cancerosa de la presente invención se une a una lesión cancerosa para hacer que el tamaño y el sitio de la lesión cancerosa se detecten en tiempo real durante la cirugía, de modo que la tasa de éxito de una operación quirúrgica de una lesión cancerosa aumenta y se puede prevenir la pérdida excesiva de tejidos normales. Por lo tanto, la composición se puede aplicar ampliamente para una terapia eficaz contra el cáncer.

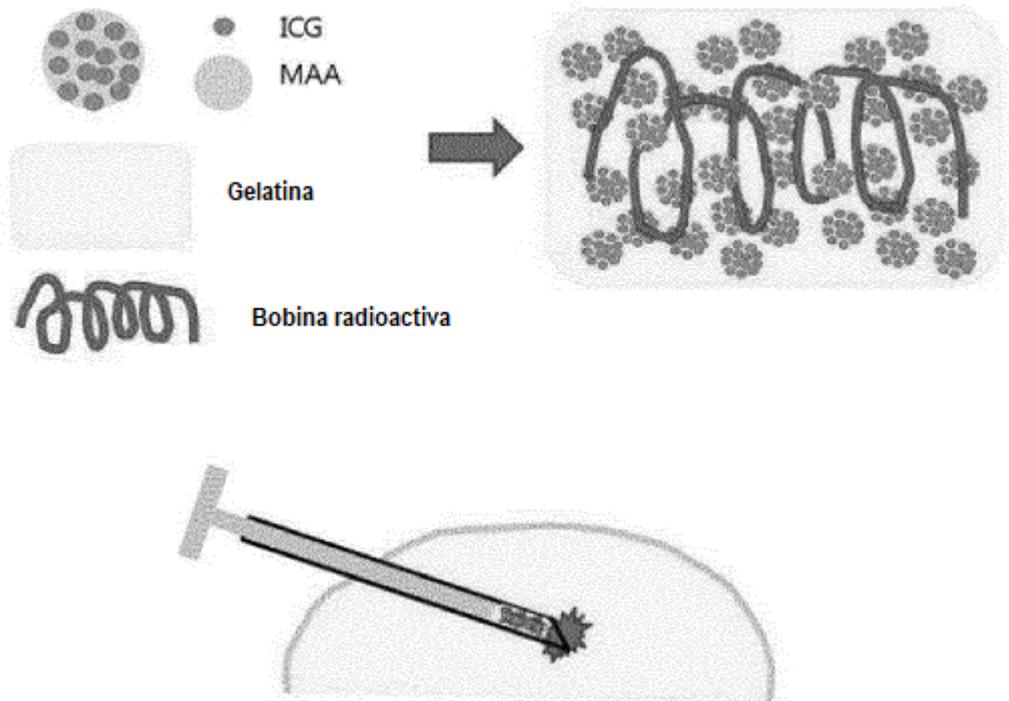
REIVINDICACIONES

1. Una composición de etiquetado de una lesión cancerosa, que comprende un complejo en la que la albúmina macroagregada (MAA) está unida a un pigmento para teñir tejidos vivos, isótopos radiactivos, o una combinación de los mismos, en la que el complejo está encapsulado dentro de gelatina o esponja de gelatina.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el pigmento para teñir tejidos vivos es un pigmento visible, o pigmento fluorescente.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que el pigmento visible se selecciona del grupo que consiste en rojo natural, azul nilo, marrón bismark, carmín de litio, azul tripano, verde janus, violeta de metilo, o-lamina, verde malaquita, safranina, eosina, rojo de congo, eritrocina, nigrosina, hematoxilina azul de Alcían, azul de anilina, verde claro y una combinación de los mismos.
- 10 4. La composición de la reivindicación 2, en la que el pigmento fluorescente es un pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que el pigmento fluorescente en el infrarrojo cercano es verde de indocianina (ICG).
- 15 6. La composición de la reivindicación 1, en la que el isótopo radioactivo se selecciona del grupo que consiste en H-3, C-14, P-32, S-35, Cl-36, Cr-51, Co-57, Co-58, Cu- 64, Fe-59, Y-90, I-124, I-125, Re-186, I-131, Tc- 99m, Mo-99, Ca-45, y Ca-68.
7. La composición de la reivindicación 1, en la que la esponja de gelatina es una construcción en la que se produce un enlace isopeptídico entre un grupo amina de una cadena lateral de lisina y un grupo carboxílico de una cadena lateral de glutamato o aspartato presente en la gelatina.
- 20 8. La composición de la reivindicación 1, en la que el cáncer es un cáncer sólido.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que el cáncer sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de piel, cáncer cervical, cáncer de pulmón, tumor cerebral, tumor gastrointestinal, cáncer de hígado, sarcoma de tejidos blandos, y linfoma.
- 25 10. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición se usa para identificar un sitio y tamaño del tejido de la lesión cancerosa en tiempo real durante la cirugía de extirpación del cáncer.
11. Un kit que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para etiquetar una lesión cancerosa.
- 30 12. El kit de la reivindicación 11, en el que el kit se usa para identificar un sitio y tamaño de tejido de lesión cancerosa en tiempo real durante la cirugía de extirpación del cáncer.
13. Un complejo en el que la MAA está unida a un pigmento para teñir tejidos vivos, en la que el complejo está encapsulado dentro de gelatina o esponja de gelatina.

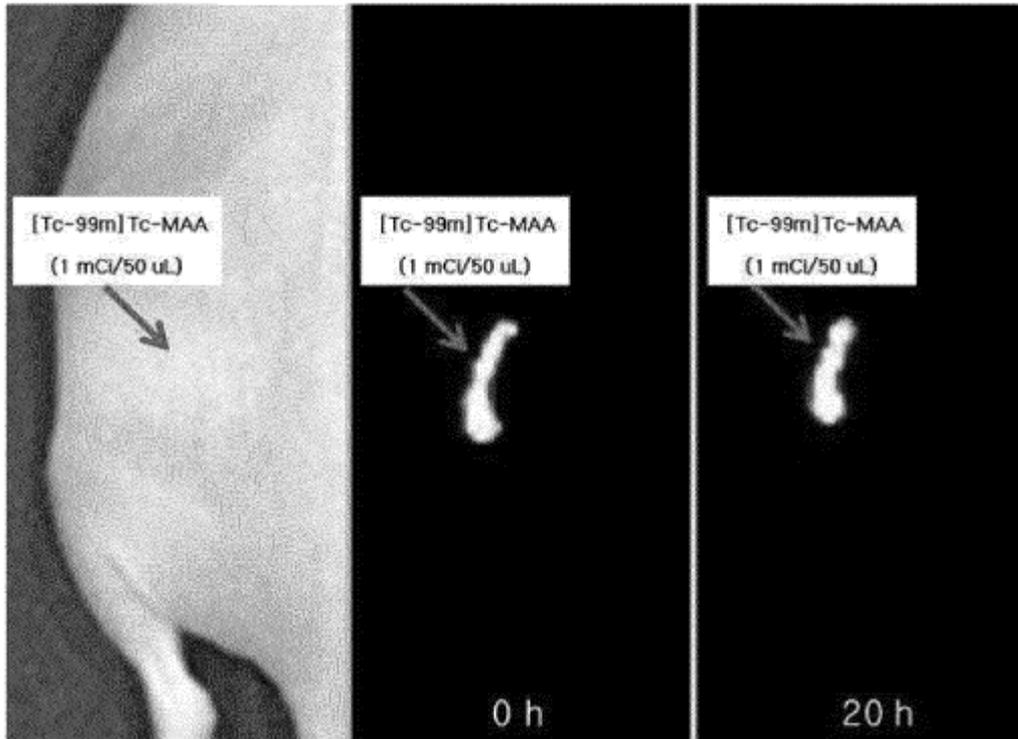
[Figura 1]



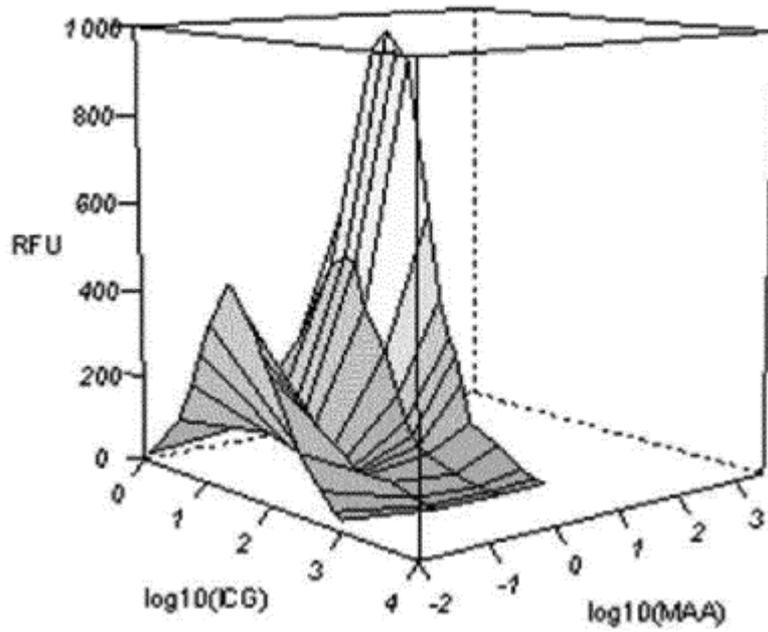
[Figura 2]



[Figura 3]

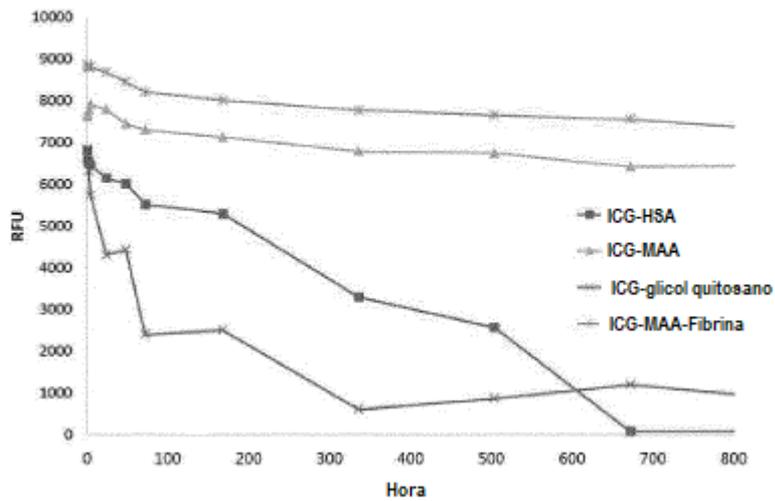


[Figura 4]

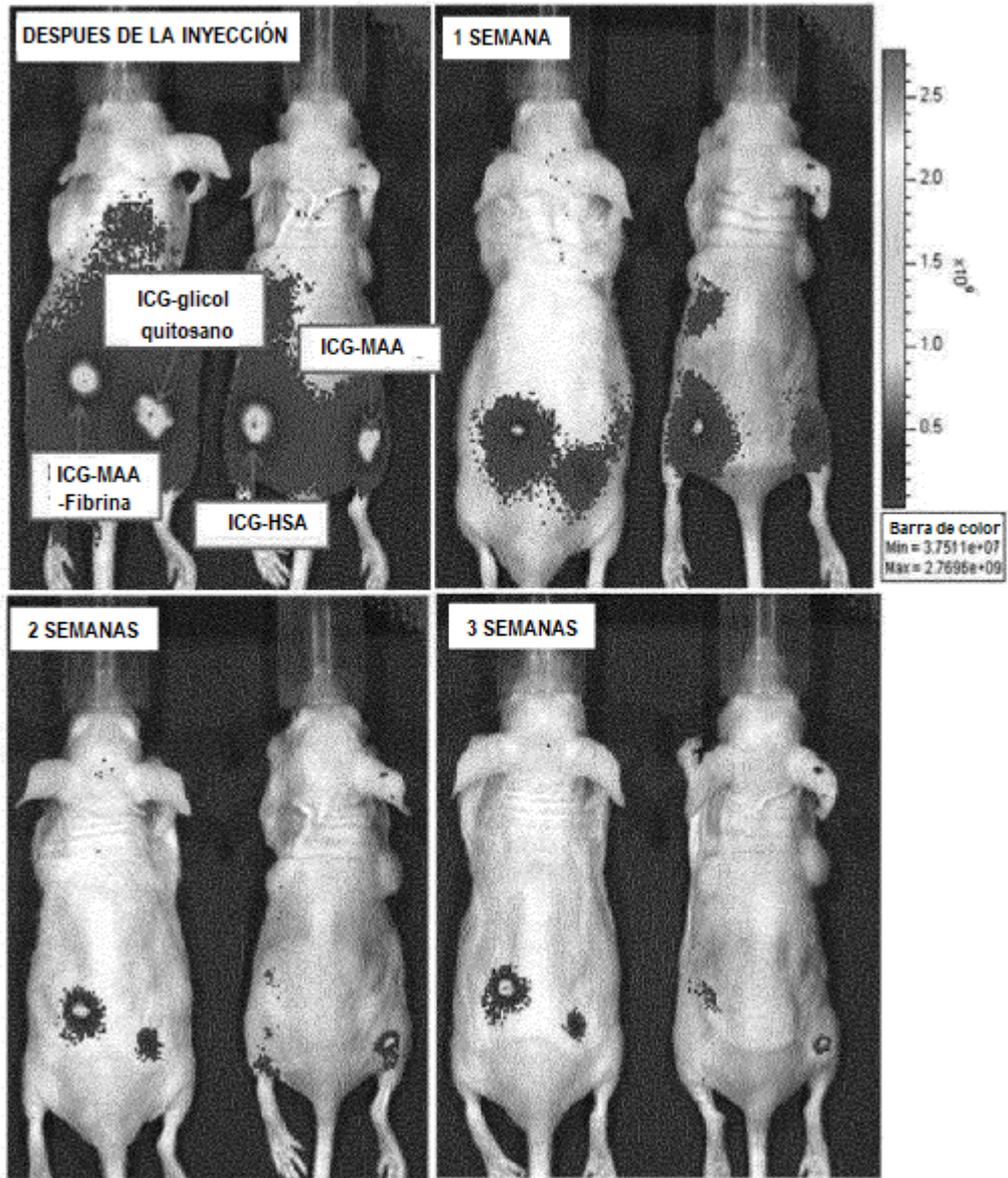


[Figura 5]

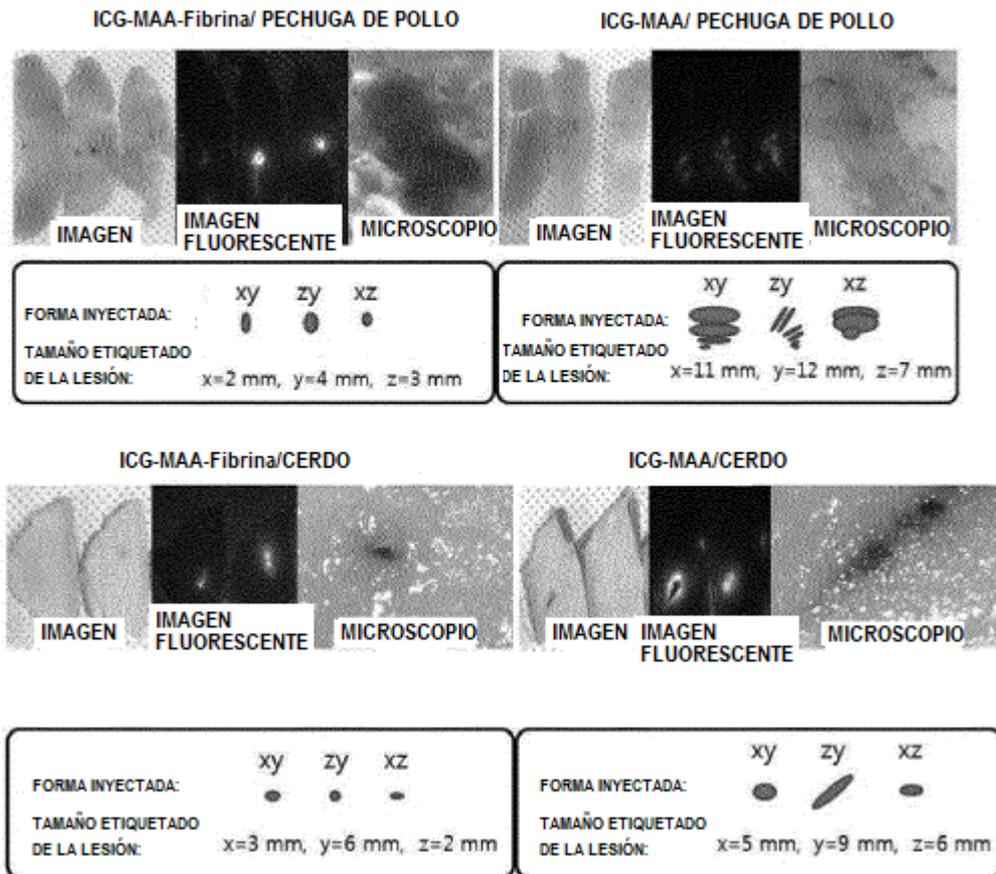
COMPARACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA FLUORESCENCIA EN EL INFRARROJO CERCANO DE LOS COMPLEJOS DE ICG-AGENTES DE ETIQUETADO



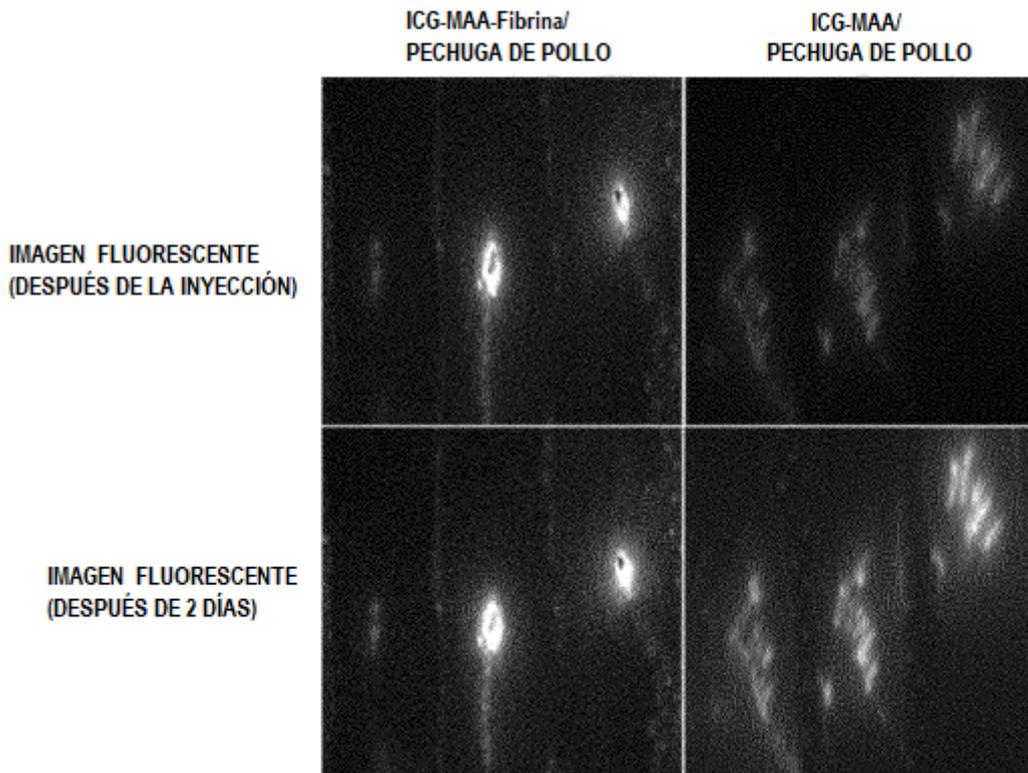
[Figura 6]



[Figura 7]



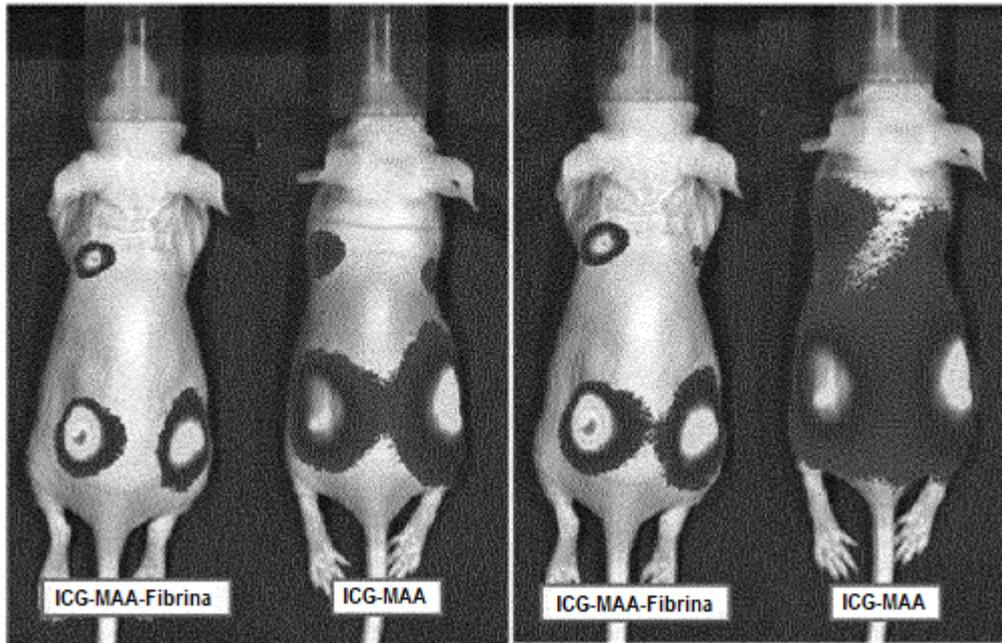
[Figura 8]



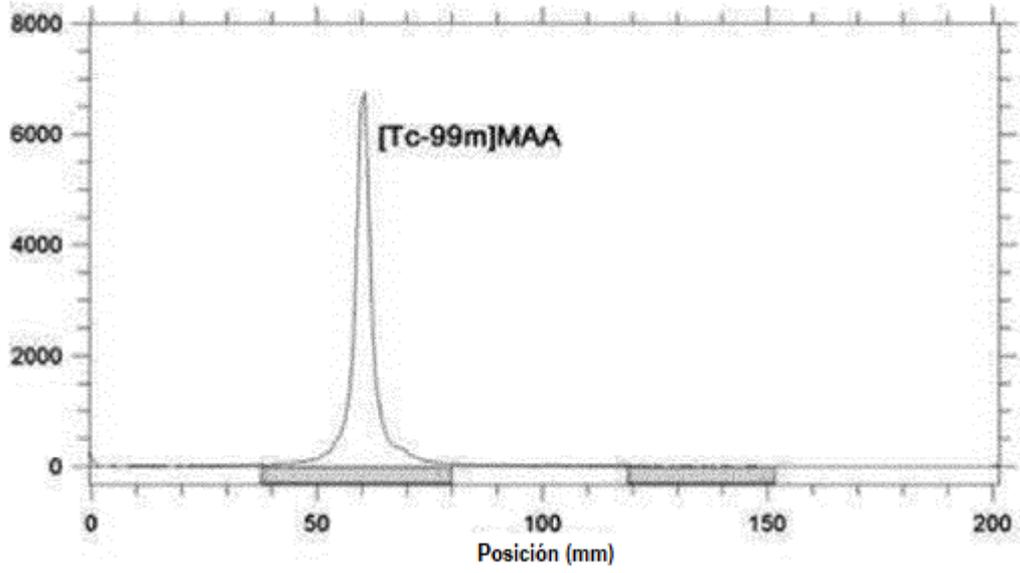
[Figura 9]

IMAGEN FLUORESCENTE
(DESPUÉS DE LA INYECCIÓN)

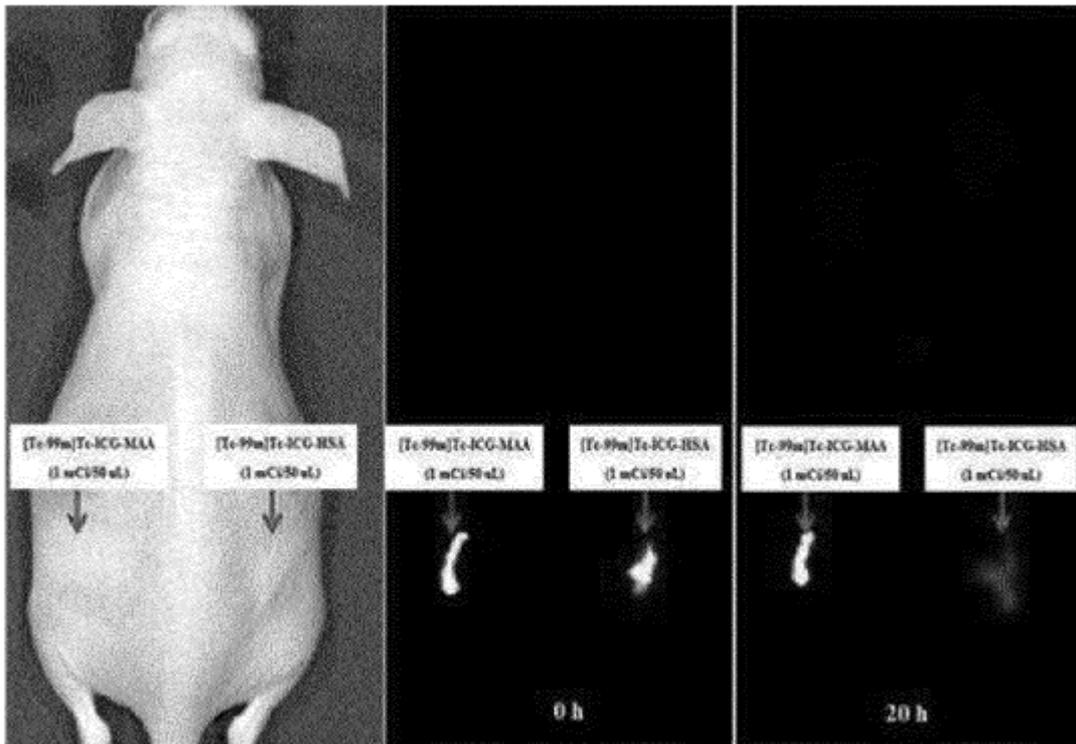
IMAGEN FLUORESCENTE
(DESPUÉS DE 2 DÍAS)



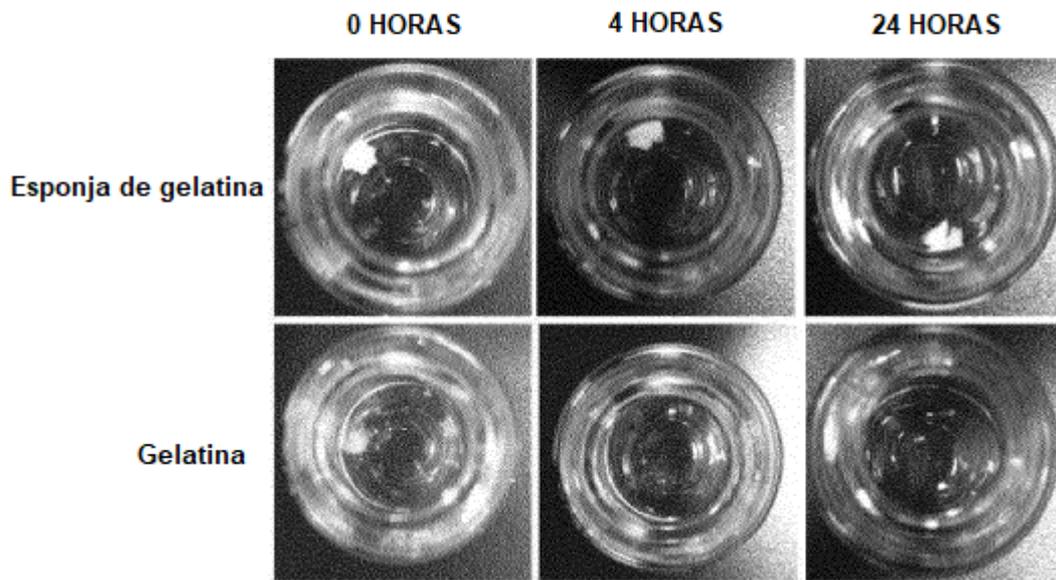
[Figura 10]



[Figura 11]

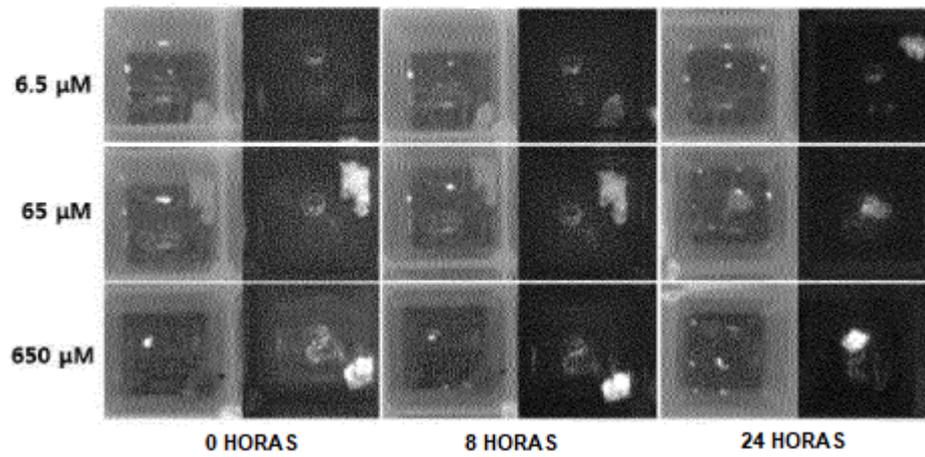


[Figura 12]

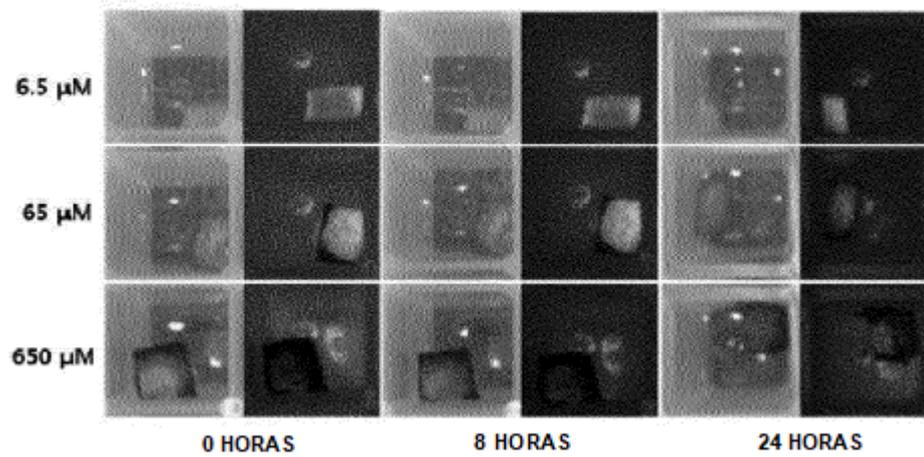


[Figura 13]

(Bobina radio oro/ICG-MAA-esponja de gelatina): ESPONJA DE GELATINA MACROAGREGADA UNIDA A BOBINA DE LÁMINA DE ORO-INDOCIANINA VERDE (BOBINA DE RADIO ORO/ICG-MAA-ESPONJA DE GELATINA)



SPONGOSTÁN UNIDO A INDOCIANINA (ICG SPONGOSTÁN)



[Figura 14]

