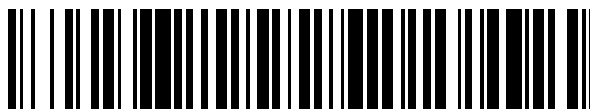


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 279**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
G01N 33/534 (2006.01)
A61K 103/10 (2006.01)
G01N 33/60 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2011** **PCT/KR2011/005994**
87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012** **WO12021045**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2011** **E 11816661 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 2605019**

54 Título: **Marcador de ganglio linfático centinela capaz de generar imágenes multimodales**

30 Prioridad:

13.08.2010 KR 20100078330

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2019

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, SEO IL;
KIM, YOUNG SANG;
BAEK, NAM SUK y
NOH, JIN HEE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 727 279 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

Marcador de ganglio linfático centinela capaz de generar imágenes multimodales

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un marcador del ganglio linfático centinela de acuerdo con las reivindicaciones que comprende una albúmina; un isótopo radiactivo y un colorante infrarrojo cercano que está unido a la albúmina; y un colorante visible que está unido a la albúmina, un método de preparación del mismo, un kit para imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela para preparar el marcador del ganglio linfático centinela, y un método para obtener imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela utilizando el mismo.

Técnica anterior

- 10 A medida que aumenta la tasa de detección temprana de tumores, ha aumentado la tendencia de la resección quirúrgica del cáncer temprano. En general, las células tumorales tienden a infiltrarse en los conductos linfáticos, se diseminan a través de la linfa a los ganglios linfáticos y metastatizan a otros órganos. Por esta razón, los ganglios linfáticos cercanos a una región tumoral a menudo se resecan además del tumor mismo en una cirugía temprana de cáncer o para prevenir la metástasis de las células tumorales.
- 15 Sin embargo, la disección de los ganglios linfáticos puede causar complicaciones como el linfedema y disminuir la calidad de vida del paciente. Por lo tanto, es importante determinar la necesidad de la disección de ganglios linfáticos en pacientes y es necesario reducir significativamente la frecuencia de las complicaciones resultantes de la disección de ganglios linfáticos mediante el uso de un marcador de ganglio linfático centinela adecuado y una biopsia de ganglio linfático centinela. El ganglio linfático centinela fue el primer objetivo de Cabanas et al. en 1977
- 20 para el tratamiento del cáncer de pene y se define como el primer ganglio linfático que recibe drenaje linfático de un tumor primario. Dependiendo del estado metastásico de los ganglios linfáticos centinela, se puede determinar si un ganglio linfático distal después del ganglio linfático centinela está metastatizado o no. Si se encuentra que los tumores no se han diseminado al ganglio linfático centinela, se puede considerar que esos tumores no se han metastatizado al resto de los ganglios linfáticos conectados al ganglio linfático centinela, evitando así la resección de
- 25 los ganglios linfáticos completos. Por lo tanto, actualmente se incluye una biopsia de ganglio linfático centinela en las terapias estándar para el tratamiento del cáncer de mama temprano. Por lo tanto, cuando se realiza la biopsia del ganglio linfático centinela, un marcador de ganglio linfático centinela es fundamental para identificar el ganglio linfático centinela metastatizado con precisión al tiempo que minimiza el daño al tejido normal mediante una incisión mínima.
- 30 En la práctica actual, un ganglio linfático centinela se identifica inyectando una sustancia que drena específicamente en los ganglios linfáticos cuando se inyecta cerca de tejido tumoral y determinando un ganglio linfático donde la sustancia llega por primera vez. Las sustancias con un cierto rango de tamaño de partícula (hasta varios cientos de nm) son útiles en este método, y se han usado diversos tipos de partículas.

- 35 Para desarrollar marcadores de ganglios linfáticos centinela que tienen la forma de partículas descrita anteriormente, se han utilizado diversos métodos empleando isótopos fluorescentes y radiactivos. Pero el método que emplea isótopos radiactivos se usa actualmente como un método estándar.

El documento EP 1419788 describe un marcador de ganglio linfático centinela que comprende partículas de albúmina teñidas con azul de Evans y partículas de albúmina radiomarcadas con ^{99m}Tc.

- 40 El documento WO 00/74727 describe un marcador de ganglio linfático centinela que comprende partículas de albúmina radiomarcadas con ^{99m}Tc y unidas a un colorante.

- Además, los colorantes de bajo peso molecular también se utilizan como marcadores de ganglios linfáticos centinela. Estos colorantes son visibles a simple vista sin la ayuda de un sistema de imágenes especial. Algunos de estos colorantes tienen propiedades fluorescentes y, por lo tanto, pueden detectarse con relativa facilidad utilizando un sistema de imágenes de fluorescencia durante la operación. El uso de colorantes solo requiere un aparato simple y
- 45 brinda información directa al cirujano. Sin embargo, como el tamaño del colorante es demasiado pequeño, su tiempo de paso a través de los ganglios linfáticos es extremadamente corto. Como resultado, los ganglios escalonados o de segundo nivel se tiñen poco después del ganglio linfático centinela, lo que dificulta la identificación del ganglio linfático centinela solo en el tejido teñido. En consecuencia, el método anterior que utiliza un colorante puede reseca
- 50 más ganglios linfáticos de lo necesario y, por lo tanto, tiene una limitación para minimizar la incisión innecesaria, que es el propósito de atacar los ganglios linfáticos centinela. Además, un área quirúrgica puede estar ampliamente teñida, lo que dificulta la operación. Además, cuando se usan colorantes de luz visible, es difícil identificar la ubicación del ganglio linfático centinela mirando la piel en sí sin incidirla. Por otro lado, cuando se usa una sustancia fluorescente, es fácil identificar la ubicación del ganglio linfático centinela en relación con un colorante de luz visible

convencional. Sin embargo, la ubicación es aún difícil de identificar sin incidir en la piel en caso de que la longitud de onda de la sustancia fluorescente se superponga con la de la luz visible. Pero, cuando se usa una sustancia emisora de fluorescencia de longitud de onda del infrarrojo cercano, la ubicación del ganglio linfático centinela se puede identificar sin incidir en la piel.

5 En la práctica clínica actual, se usa frecuentemente un coloide radiactivo, cuyo tiempo de paso a través de los ganglios linfáticos es lo suficientemente largo como para marcar solo el ganglio linfático centinela durante un tiempo relativamente largo y que es capaz de identificar el ganglio linfático centinela marcado independientemente de la profundidad de la piel. Sin embargo, el método anterior tiene inconvenientes en cuanto a que se requiere un aparato especial y que un cirujano que está operando no puede realizar una incisión al mirar directamente el ganglio linfático centinela en la sala de operaciones. Si todo el aparato está completamente equipado, el coloide radiactivo se considera el método más preciso y conveniente, pero en un contexto práctico, los colorantes se usan a menudo junto con el coloide radiactivo para maximizar la detectabilidad del ganglio linfático centinela y la precisión para identificarlo. Además, se sabe que, al realizar una biopsia de ganglio linfático centinela, el uso del coloide radiactivo junto con colorantes es el método más preciso para minimizar los resultados falsos negativos.

15 Sin embargo, cuando se administran tanto el coloide radiactivo como los colorantes, surgen varios problemas de la siguiente manera. En primer lugar, dado que el tiempo de paso de dos sustancias distintas a través de los ganglios linfáticos es diferente, el tiempo de generación de imágenes óptimo también difiere entre dos sustancias. En otras palabras, dado que el colorante pasa a los ganglios linfáticos extremadamente rápido, cuando se utiliza como marcador de ganglios linfáticos centinela, se debe inyectar durante la operación. Pero el coloide radiactivo debe inyectarse un día o varias horas antes de la operación. Como resultado, dos sustancias no pueden inyectarse simultáneamente al mezclarlas debido a sus diferentes propiedades, sino que deben inyectarse a través de dos inyecciones separadas, incurriendo en un gran inconveniente y dificultad para realizarlas.

25 En segundo lugar, las propiedades físicas de los colorantes no son adecuadas para marcar el ganglio linfático centinela. En las circunstancias en las que no hay otra alternativa disponible y el uso de sustancias radiactivas no está permitido, el colorante también se usa como un agente complementario de coloide radiactivo. Sin embargo, las propiedades físicas del colorante no permiten una marcación específica del ganglio linfático centinela y, por lo tanto, el colorante debe unirse a una sustancia que tenga una estructura capaz de permanecer en el ganglio linfático centinela si es posible. Los marcadores de detección de modo único utilizados actualmente, es decir, los marcadores de detección monomodales del ganglio linfático centinela que tienen cada una de las propiedades de tinción, radiactiva o fluorescente no pueden satisfacer individualmente todas las propiedades ideales requeridas para funcionar como un marcador de ganglio linfático centinela adecuado. Por lo tanto, se debe desarrollar un agente adecuado que pueda resolver las limitaciones de los marcadores de ganglios linfáticos centinelas existentes.

35 En tercer lugar, dado que el marcador de ganglio linfático centinela es un agente para su uso en el cuerpo humano, el colorante o marcador debe desarrollarse para ser adecuado para usar en el cuerpo humano. Los marcadores multimodales desarrollados previamente que emplean colorantes con un excelente rendimiento luminiscente y los materiales nanométricos sintetizados en forma artificial, es decir, los nanomateriales no se pueden usar en el cuerpo humano ya que su seguridad *in vivo* aún no se ha establecido.

40 En cuarto lugar, las propiedades de los colorantes deben incluir una longitud de onda de luz visible para que pueda ser utilizada de manera eficaz por un cirujano que está operando al resecar los ganglios linfáticos. El uso de fluorescencia o radiación es necesario en el proceso de identificación del ganglio linfático centinela, pero también se requiere un marcador unido a un colorante de luz visible, ya que se realiza una incisión de la piel que rodea el ganglio linfático centinela identificado y la extracción del ganglio linfático centinela a simple vista. Sin embargo, aún no se ha desarrollado un agente que comprenda un marcador de ganglio linfático centinela unido a un colorante de luz visible.

45 Descripción

Problema técnico

50 En un esfuerzo por identificar un ganglio linfático centinela mediante generación de imágenes *in vivo* sin incisión en la piel, los presentes inventores hallaron que, cuando se prepara un marcador uniendo una albúmina con un colorante infrarrojo cercano y marcándolo con un isótopo radiactivo para generación de imágenes gamma, y luego uniendo la albúmina con un colorante visible que permite una identificación visual de un ganglio linfático centinela durante una operación de extracción del ganglio linfático centinela identificado, y cuando se usa el marcador que comprende la albúmina preparada, se hace posible la generación de imágenes multimodales del ganglio linfático centinela, completando así la presente invención.

Solución técnica

Un objeto de la presente invención es proporcionar un marcador de ganglio linfático centinela que comprende una albúmina; un isótopo radiactivo y un colorante infrarrojo cercano que está unido a la albúmina; y un colorante visible que está unido a la albúmina.

5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar un marcador de ganglio linfático centinela capaz de obtener imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela, que comprende: reducir los enlaces disulfuro de albúmina con grupos tiol usando un agente reductor para preparar una albúmina reducida; marcar los grupos tiol de la forma de albúmina reducida en disulfuro con un isótopo radiactivo; y unir la albúmina marcada con un colorante visible y un colorante infrarrojo cercano.

10 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un kit para la generación de imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela para preparar el marcador de ganglio linfático centinela anterior, que comprende: una forma de albúmina reducida en disulfuro; un isótopo radiactivo y un colorante infrarrojo cercano; y un colorante visible.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método para la generación de imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela, que comprende el uso del marcador de ganglio linfático centinela anterior.

15 Efectos ventajosos

El marcador de ganglio linfático centinela de acuerdo con la presente invención permanece en los ganglios linfáticos durante mucho tiempo y, por lo tanto, permite la generación de imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela. Por lo tanto, cuando se usa este marcador, el ganglio linfático centinela puede identificarse con precisión *in vivo* mediante imágenes infrarrojas cercanas e imágenes gamma sin incisión en la piel, y la ubicación del ganglio linfático centinela puede identificarse con precisión a simple vista durante una operación quirúrgica de la extirpación del ganglio linfático centinela identificado. Además, se puede reducir la tasa de resultados falsos negativos, se puede aumentar la precisión de una biopsia de ganglio linfático centinela y se puede reducir la dependencia de la biopsia con respecto al aparato. En última instancia, el marcador de ganglio linfático centinela de la presente invención se puede usar de manera eficaz en la operación para tratar el cáncer de mama y el melanoma, etc., así como en una biopsia de ganglio linfático centinela para otros tumores, o en la endoscopia, laparoscopia y cirugía robótica.

Descripción de los dibujos

FIG. 1 muestra la estructura de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana.

FIG. 2 muestra la estructura de la forma reducida en disulfuro de albúmina sin marcar con un isótopo radiactivo.

30 FIG. 3 muestra un esquema de reacción para sintetizar el proceso de la forma reducida en disulfuro del kit de albúmina (albúmina de suero humana-tiol).

FIG. 4 muestra un esquema de reacción para sintetizar un compuesto marcado con $[Tc-^{99m}]Tc$ utilizando la forma reducida en disulfuro de albúmina.

35 FIG. 5 muestra los resultados de la cromatografía instantánea de capa fina (ITLC) realizada para confirmar la síntesis de $[Tc-^{99m}]Tc$ -albúmina de suero humana. La ITLC se realizó utilizando etanol:ácido acético amónico al 10% = 1:1 como disolvente de revelado, y se encontró que la proporción de marcación era >99%.

FIG. 6 es un esquema de reacción para unir el verde de indocianina y el azul de Evans con $[Tc-^{99m}]Tc$ -albúmina de suero humana por adsorción.

FIG. 7 muestra los resultados de un experimento de biodistribución realizado para examinar la captación de ganglios linfáticos de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana.

40 FIG. 8 muestra imágenes multimodales de ratones blancos, obtenidas utilizando $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans azul-albúmina de suero humana. La imagen gamma se obtuvo utilizando un sistema SPECT (NanoSPECT, Bioscan) sin incisión en la piel, y la imagen del infrarrojo cercano se obtuvo utilizando un sistema de generación de imágenes de fluorescencia (IVIS Lumina, Xenogen) sin incisión en la piel. Además, la observación visual podría realizarse después de la incisión de la piel.

45 Mejor modo

En un aspecto, la presente invención se refiere a un marcador de ganglio linfático centinela que comprende una albúmina; un isótopo radiactivo y un colorante infrarrojo cercano que está unido a la albúmina; y un colorante visible

que está unido a la albúmina.

La albúmina que se usa en la presente invención es una proteína simple ampliamente hallada en las células o fluidos corporales. Puede ser una proteína que constituye la sustancia básica de las células junto con la globulina y se encuentra ampliamente en tejidos animales y vegetales. Además, la albúmina de suero humana que se usa en la presente invención puede ser una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 66,462 Da y un punto isoeléctrico (IEP) de aproximadamente 4,8, y que consiste en una única cadena polipeptídica, que constituye aproximadamente el 50% (4 g/) de proteína plasmática.

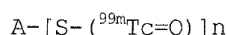
Cuando el marcador que contiene albúmina de acuerdo con la presente invención se inyecta en el tejido intersticial, puede pasar a través de los conductos linfáticos y permanecer específicamente en la estructura de red de los ganglios linfáticos sin drenar hacia los vasos capilares circundantes. Por lo tanto, permanece específicamente en el ganglio linfático centinela (el primer ganglio linfático que recibe el marcador) y muestra una alta relación de fondo a señal. La albúmina de suero humana en la presente invención tiene un tamaño de 6-8 nm más pequeño que el de un agente coloidal radiactivo convencional, de modo que los ganglios linfáticos pueden absorberla rápidamente. Además, se acumula fácilmente en el ganglio linfático centinela sin pasar a través del ganglio linfático centinela, a diferencia de los colorantes moleculares, por lo que pasa a través de los conductos linfáticos y permanece en los ganglios linfáticos sin drenar hacia los vasos capilares.

Por consiguiente, la albúmina de suero humana en la presente invención es captada rápidamente por el ganglio linfático centinela y permanece en el ganglio linfático centinela durante un largo período de tiempo, en comparación con otros agentes coloidales. Además, puede ser utilizada en el cuerpo humano porque no es tóxica.

Diversas nanopartículas para generación de imágenes multimodales informadas anteriormente son en su mayoría sustancias sintetizadas en forma artificial, y estas se probaron principalmente para determinar la seguridad *in vivo* en estadios preclínicos mediante la realización de estudios en animales. En cualquier caso, la albúmina de suero humana de tamaño nanométrico que se usa en la presente invención es una proteína simple que se encuentra ampliamente en tejidos animales y vegetales, y es un marcador que se puede usar en aplicaciones preclínicas y clínicas.

La albúmina de suero humana en la presente invención tiene 17 grupos funcionales disulfuro y, por lo tanto, cuando se reduce con un agente reductor que contiene tiol, se pueden producir teóricamente de 2 a 34 grupos tiol en la albúmina de suero humana (véase la Figura 2). En la presente invención, la albúmina de suero humana que tiene grupos tiol unidos a ella, es decir, la albúmina de suero humana reducida con grupos tiol, se define como "la forma reducida en disulfuro de la albúmina de suero humana" o "albúmina de suero humana con tiol". Los grupos tiol son unidades estructurales que se unen a un isótopo radiactivo y tienen dos o más grupos tiol adyacentes para funcionar como quelatos para el isótopo radiactivo. El isótopo radiactivo puede unirse a los grupos tiol de la albúmina de suero humana y, por lo tanto, en un ejemplo de la presente invención, se utilizó $[Tc-^{99m}]Tc$ como isótopo radiactivo, y los grupos funcionales disulfuro de la albúmina de suero humana se redujeron con un agente reductor que contiene tiol para preparar una albúmina de suero humana con tiol. Como resultado, se produjo un promedio de 19,1 grupos tiol por molécula de albúmina de suero humana y, por lo tanto, la albúmina de suero humana se marcó con hasta 4 isótopos radiactivos de $[Tc-^{99m}]Tc$. De acuerdo con una realización específica de la presente invención, la albúmina de suero humana marcada con $[Tc-^{99m}]Tc$ puede representarse por la siguiente fórmula 1:

Fórmula 1



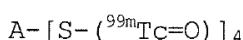
en donde A es la forma reducida en disulfuro de la albúmina de suero humana, S es azufre y n es un número entero de 1 a 8.

Como se usa en el presente documento, el término "isótopo" se refiere a los átomos del mismo elemento químico que tienen el mismo número atómico, pero difieren en masa atómica. En general, un isótopo de cualquier elemento tiene el mismo número de protones y electrones que el elemento, pero tiene un número diferente de neutrones. Debido a que las propiedades químicas de un elemento están determinadas por el número de protones y electrones de los mismos, las propiedades químicas de sus isótopos son las mismas que las de ese elemento. Sin embargo, los isótopos difieren en el número de neutrones y en masa y, por lo tanto, pueden separarse por métodos físicos. Entre los isótopos, un isótopo que tiene radiactividad se llama isótopo radiactivo. Dado que el isótopo radiactivo se desintegra radiactivamente al emitir rayos gamma o partículas subatómicas, también se usa como un marcador importante en el diagnóstico de enfermedades. Los ejemplos de isótopos radiactivos son ^{131}I , ^{125}I , ^{124}I , ^{64}Cu , ^{68}Ga o ^{99m}Tc . Como un isótopo radiactivo que se puede usar como marcador, se puede usar cualquier isótopo radiactivo sin limitación particular en la presente invención, siempre que se conozca en la técnica y se una con grupos tiol. Preferiblemente, el isótopo radiactivo es $[Tc-^{99m}]Tc$. El ' $[Tc-^{99m}]Tc$ ' es un isótopo (^{99m}Tc) de tecnecio (Tc).

Cuando se usa la radiación emitida por los isótopos radiactivos, tendrá una excelente permeabilidad tisular, por lo que también se pueden identificar fácilmente los ganglios linfáticos ubicados en lo profundo del cuerpo. Además, no causa reacciones alérgicas que puedan ser provocadas por algunos de los colorantes. Entre los isótopos radiactivos, $[Tc-^{99m}]Tc$ tiene una dosis de radiación baja y proporciona alta precisión.

$[Tc-^{99m}]TcO_4^-$ se reduce con un agente reductor de tal manera que 4 grupos tiol pueden estar coordinados con el mismo. Por lo tanto, una albúmina de suero humana que tiene 2 a 34 grupos tiol unidos a ella puede marcarse teóricamente con hasta 8 átomos de $[Tc-^{99m}]Tc$. Por consiguiente, un $[Tc-^{99m}]TcO_4^-$ está unido por 4 grupos tiol y, por lo tanto, n en la fórmula 1 puede ser un número entero de 1 a 8. En un ejemplo de la presente invención, los grupos funcionales disulfuro de la albúmina de suero humana se redujeron con un agente reductor que contiene tiol para preparar una albúmina de suero humana con tiol, y como resultado, se produjo un promedio de 19,1 grupos tiol por molécula de albúmina de suero humana. Por lo tanto, como se muestra en la siguiente fórmula 2, la albúmina de suero humana puede marcarse con hasta átomos de $[Tc-^{99m}]Tc$.

Fórmula 2



en donde A es la forma reducida en disulfuro de la albúmina de suero humana, y S es azufre.

Para preparar el marcador de ganglio linfático centinela de la presente invención, un colorante infrarrojo cercano está unido a la albúmina marcada con isótopo radiactivo por adsorción.

Como colorante infrarrojo cercano, cualquier colorante de infrarrojo cercano conocido en la técnica puede usarse con limitación en la presente invención. Preferiblemente, puede ser un colorante fluorescente de infrarrojo cercano. Más preferiblemente, el colorante fluorescente de infrarrojo cercano puede ser verde de indocianina.

Como se usa en este documento, la expresión "infrarrojo cercano" en el colorante de infrarrojo cercano se refiere a la región externa de la región roja del espectro de luz, y la región de longitud de onda corta (0,7503 pm) de la región infrarroja se define generalmente como la región del infrarrojo cercano. La luz infrarroja cercana incluye espectros de electrones que muestran acciones térmicas, fotográficas, fotoeléctricas y fluorescentes, y exhiben efectos de esterilización, de tratamiento de las articulaciones y tratamiento de los músculos y, por lo tanto, se usan con frecuencia en aplicaciones industriales y médicas. La región de longitud de onda del infrarrojo cercano muestra una absorción de luz relativamente alta en comparación con otras regiones de longitud de onda y, por lo tanto, la luz infrarroja cercana generada en el cuerpo también puede detectarse externamente. Cuando se usa luz de longitud de onda infrarroja cercana, existe la ventaja de que la ubicación del ganglio linfático centinela puede identificarse sin incidir en la piel.

Como se usa en el presente documento, la expresión "verde de indocianina" se refiere a un colorante para generación de imágenes de fluorescencia de infrarrojo cercano que se usa ampliamente. Dado que se descompone o se excreta con la orina y las heces una vez que se inyecta en el cuerpo humano, se puede usar un colorante fluorescente en el cuerpo humano y es clínicamente ventajoso.

El acoplamiento del colorante infrarrojo cercano por adsorción se puede lograr mezclando el colorante infrarrojo cercano con una albúmina de suero humana marcada con isótopos radiactivos.

Además, para preparar el marcador de ganglio linfático centinela de la presente invención, un colorante visible se une además al isótopo radiactivo y a la albúmina de colorante infrarrojo cercano por adsorción. Como colorante visible, cualquier colorante que absorba luz visible, conocido en la técnica, puede usarse sin limitación. Preferiblemente, el colorante visible que se usa en la presente invención puede ser azul de Evans.

Como se usa en este documento, el término "visible" en el colorante visible se refiere a la región de longitud de onda visible del espectro de luz, que generalmente tiene una longitud de onda de 380-770 nm. En la región de longitud de onda visible, los cambios en las propiedades según las longitudes de onda se muestran como colores, y las longitudes de onda cambian progresivamente de rojo a violeta: 700-610 nm para rojo; 610-590 nm para naranja; 590-570 nm para amarillo; 570-500 nm para el verde; 500-450 nm para azul; y 450-400 nm para violeta.

Como se usa en el presente documento, la expresión "azul de Evans" se refiere a un colorante que se usa para la observación visual en la región de longitud de onda visible. El azul de Evans permite la detección de un sitio quirúrgico a simple vista, no es tóxico para el uso en el cuerpo humano y se puede usar ventajosamente en aplicaciones clínicas.

El colorante infrarrojo cercano y el colorante visible usado en la presente invención pueden ser verde de indocianina

y azul de Evans, respectivamente, que son seguros de usar en el cuerpo humano. Estos colorantes se unen a la albúmina de suero humana por adsorción simple en oposición al enlace covalente y, por lo tanto, no tienen ninguna preocupación sobre la toxicidad en el uso clínico. El uso de verde de indocianina en el cuerpo humano se informó en varias publicaciones, y se informó que el verde de indocianina fue seguro para usarlo en 18 pacientes con cáncer de mama durante los ensayos clínicos [T. Kitai, T. Inomoto, M. Miwa, T. Shikayama, Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer, Breast Cancer, 2005, 12, 211-215], el azul de Evans se ha utilizado como un colorante en el cuerpo humano, y se informó un estudio clínico que muestra los resultados del uso de azul de Evans en 100 pacientes con cáncer de mama [J.-Y. Bobin, C. Zinzindohoue, S. Isaac, M. Saadat, P. Roy, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 569-573].

En un ejemplo de la presente invención, el colorante visible azul de Evans y el colorante fluorescente infrarrojo cercano verde de indocianina se unieron a albúmina de suero humana marcada con $[Tc-^{99m}]Tc$ por adsorción, preparando así una albúmina marcada con el isótopo radiactivo y unida al colorante fluorescente infrarrojo cercano y al colorante visible. En la presente invención, a menos que se especifique lo contrario, "[$Tc-^{99m}$]Tc-verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana" se refiere a una albúmina marcada con $[Tc-^{99m}]Tc$ y unida al azul de Evans y al verde de indocianina por adsorción.

La albúmina de la invención unida al isótopo radiactivo y al colorante infrarrojo cercano, y el colorante visible se puede usar para la generación de imágenes gamma del tejido marcando con el isótopo radiactivo, para la generación de imágenes de fluorescencia de la región infrarroja cercana (NIR) uniéndose al colorante infrarrojo cercano, y para la generación de imágenes visibles por unión del colorante visible. Específicamente, permite la obtención de imágenes ex vivo mediante imágenes NIR o imágenes gamma sin incisión en la piel, y permite la detección visual de la ubicación del ganglio linfático centinela durante una operación quirúrgica para extirpar el ganglio linfático centinela identificado. En otras palabras, la albúmina de la invención, donde el isótopo radiactivo y el colorante cercano al infrarrojo y el colorante visible están unidos, proporciona la generación de imágenes multimodales, incluyendo la generación de imágenes gamma y NIR, y la generación de imágenes visibles.

La imagen gamma puede observarse mediante varios sistemas de detección de radiactividad conocidos en la técnica, y en un ejemplo de la presente invención, se observó utilizando un sistema SPECT animal (NanoSPECT). Además, la imagen NIR puede observarse mediante diversos sistemas de detección de imágenes NIR conocidos en la técnica, y en un ejemplo de la presente invención, la imagen NIR se observó usando un sistema de imagen de fluorescencia (IVIS Lumina). La imagen visible se pudo observar a simple vista antes y después de la incisión en la piel y se obtuvo con una cámara digital (PowerShot G9) de uso común.

El flujo de la linfa, adonde fluyen la albúmina de la invención unida al isótopo radiactivo y al colorante infrarrojo cercano y el colorante visible, corresponde a la metástasis de las células tumorales del tejido tumoral al tejido circundante a través de los conductos linfáticos, y la primera linfa que tiene el marcador de albúmina que se haya movido a través de los conductos linfáticos puede considerarse como el primer ganglio linfático centinela donde las células tumorales metastatizadas se diseminaron por primera vez.

Por lo tanto, después de la inyección de la albúmina de la invención que está unida al isótopo radiactivo y al colorante infrarrojo cercano, y al colorante visible en el cuerpo, la albúmina fluye a través de los conductos linfáticos a los ganglios linfáticos y se acumula en los ganglios linfáticos. Por lo tanto, la albúmina de la invención que está unida al isótopo radiactivo y al colorante infrarrojo cercano, y el colorante visible puede marcar específicamente el ganglio linfático centinela. El marcador de ganglio linfático centinela de la invención, que comprende la albúmina que está unida al isótopo radiactivo y al colorante infrarrojo cercano, y el colorante visible permite la obtención de imágenes in vivo de los ganglios linfáticos mediante generación de imágenes NIR e imágenes gamma de modo que se pueda hacer una incisión solo en el área de la piel alrededor del ganglio linfático centinela. Además, permite la identificación visual de los ganglios linfáticos por medio de un colorante visible. Por lo tanto, conduce a una operación precisa y eficaz. Además, la presente invención permite la generación de imágenes multimodales del ganglio linfático centinela y, por lo tanto, supera todas las limitaciones en la técnica anterior que se producen cuando los colorantes y los isótopos radiactivos se administran en forma individual. Por lo tanto, la presente invención muestra un excelente efecto en la marcación del ganglio linfático centinela.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un marcador de ganglio linfático centinela capaz de obtener imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela, que comprende: reducir los enlaces disulfuro de albúmina a grupos tiol usando un agente reductor para preparar una albúmina reducida; marcar los grupos tiol de la forma de albúmina reducida en disulfuro con un isótopo radiactivo; y unir un colorante visible con la albúmina marcada.

En el método de la presente invención, primero se lleva a cabo la etapa de reducción de los enlaces disulfuro de albúmina a grupos tiol utilizando el agente reductor que contiene tiol para preparar una albúmina con tiol.

El agente reductor que se usa en la presente invención puede ser una sustancia que escinde los enlaces disulfuro de las proteínas. El grupo tiol que se usa en la presente invención es un grupo funcional presente en el aminoácido

cisteína y está implicado en una reacción de oxidación/reducción en la que la cisteína se oxida en cistina. El grupo tiol se utiliza por las siguientes razones: cuando se usa el grupo tiol, $[Tc-^{99m}]Tc$ puede unirse a la albúmina de suero humana de una manera simple sin un proceso de síntesis de unión de quelatos (como MAG3 e Hynic) más grande que tiol, de modo que el cambio en la estructura de la albúmina de suero humana pueda minimizarse y, como resultado, los cambios en la función física in vivo de la albúmina de suero humana también se pueden prevenir. Los ejemplos del agente reductor que contiene tiol que se usa en la presente invención incluyen 2-mercaptoetanol, 1,4-ditiotreitol, 2-aminoetanodiol, tioglicolato, cisteína, glutatión y otros compuestos conocidos en la técnica.

Posteriormente, se lleva a cabo la etapa de marcación de los grupos tiol de la forma de albúmina reducida en disulfuro con un isótopo radiactivo. En un ejemplo de la presente invención, para marcar la albúmina de suero humana con tiol con $[Tc-^{99m}]Tc$, los enlaces disulfuro (-S-S-) en la albúmina de suero humana se redujeron con el agente reductor, y como resultado, se encontró que se generaron 19,1 grupos tiol (-SH). El grupo tiol es un grupo funcional que se une al isótopo radiactivo $[Tc-^{99m}]Tc$, y como $[Tc-^{99m}]TcO_4^-$ se reduce de tal manera que 4 grupos tiol pueden coordinarse a través de $SnCl_2$, una molécula de albúmina se puede marcar con a 4 átomos de $[Tc-^{99m}]Tc$.

Finalmente, se lleva a cabo la etapa de unión de un colorante visible con la albúmina marcada. Además, el método de la presente invención comprende también una etapa de unión de un colorante infrarrojo cercano a la albúmina. La etapa de unión es preferiblemente una unión simple por adsorción, que no implica una unión fuerte como la unión covalente y, por lo tanto, no causa preocupación por la toxicidad en el uso clínico. La unión del colorante visible y el colorante infrarrojo cercano se puede lograr mezclando el colorante visible y el colorante infrarrojo cercano con la albúmina de suero humana.

Preferiblemente, el colorante infrarrojo cercano puede ser verde de indocianina, y el colorante visible puede ser azul de Evans. El colorante visible y el colorante infrarrojo cercano pueden ser adsorbidos a la albúmina en forma secuencial o simultánea.

En otra realización más, la presente invención proporciona un kit para la generación de imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela para preparar el marcador de ganglio linfático centinela anterior, que comprende: una forma de albúmina reducida en disulfuro; un isótopo radiactivo y un colorante infrarrojo cercano; y un colorante visible.

Un método para preparar el kit puede comprender las etapas de: adición de ácido metilfosfónico, ácido ascórbico y cloruro de estaño a la albúmina de suero humana con tiol para preparar una mezcla; liofilización de la mezcla; y envasado del material seco en un recipiente. Específicamente, el kit se puede preparar agregando ácido metilfosfónico, ácido ascórbico y cloruro de estaño a una dilución de la albúmina de suero humana con tiol, ajustando la mezcla a un pH de 6 y liofilizando la mezcla a $-80^{\circ}C$ durante 24 horas, y envasando la mezcla seca en un recipiente.

Preferiblemente, el material seco puede envasarse en una botella de vidrio. El contenedor se utiliza para preparar y almacenar un kit desechable que puede ser utilizado convenientemente por un tecnólogo médico, un tecnólogo de laboratorio médico o un especialista médico. En un ejemplo de la presente invención, se usó una botella de vidrio como recipiente.

El kit de la presente invención puede comprender, además, un antioxidante. El antioxidante sirve para evitar que los grupos tiol de la forma reducida en disulfuro de la albúmina de suero humana se oxiden para formar un polímero. El antioxidante es preferiblemente vitamina C o ácido gálico y está contenido en el kit de la presente invención en una cantidad de 500 mg por unidad de dosis.

El kit se congela o se liofiliza en un recipiente estéril en una atmósfera de gas inerte. Preferiblemente, se congela en nitrógeno líquido y puede descongelarse lentamente antes de su uso. El kit puede equiparse con un tampón, un vial estéril, una solución salina, una jeringa, un filtro, una columna y otros dispositivos auxiliares para preparar un agente inyectable que debe usar un tecnólogo médico, un tecnólogo de laboratorio médico o un especialista médico. Es bien conocido por los expertos en la técnica que el kit se puede cambiar y modificar dependiendo de las necesidades del paciente o los regímenes dietarios y se puede cambiar de manera que se pueda proporcionar u obtener un isótopo radiactivo.

El kit de la presente invención debe usarse en la práctica clínica del uso del marcador de ganglio linfático centinela y está diseñado de tal manera que los errores en el uso y la contaminación se puedan minimizar, incluso en un ambiente ocupado de operaciones clínicas, y se pueden usar en una manera fácil de usar. En los casos convencionales, se requiere un proceso de etiquetado de un marcador con un isótopo radiactivo antes del uso del marcador, y como el isótopo radiactivo tiene una vida media corta, el marcador debe etiquetarse con el isótopo inmediatamente antes de su uso. Por esta razón, la presente invención proporciona el kit descrito anteriormente para un uso rápido y fácil del marcador con el isótopo, facilitando el uso clínico del marcador. Utilizando este kit, incluso aquellas personas no especializadas pueden realizar la marcación de isótopos sin la ayuda de un sistema especial

de síntesis.

En una realización de la presente invención, la albúmina de suero humana marcada con isótopos radiactivos representada por la Fórmula 1 se puede preparar añadiendo un isótopo radiactivo al kit. En un ejemplo de la presente invención, se sintetizó una albúmina de suero humana marcada con $[Tc-^{99m}]Tc$ agregando 20 mCi/2 mL de $[Tc-^{99m}]TcO_4^-$ al kit de albúmina de suero humana con tiol y permitiendo que la mezcla reaccionara a temperatura ambiente. Los resultados de la reacción de síntesis anterior se pudieron confirmar por cromatografía instantánea de capa fina (ITLC) utilizando etanol:acetato de amonio al 10% = 1:1 como disolvente de revelado, y se encontró que la relación de marcado era > 99%, lo que sugiere que, cuando se utiliza el kit desechable de la albúmina de suero humana con tiol de acuerdo con la presente invención, el marcado con $[Tc-^{99m}]Tc$ puede realizarse con éxito (Figura 5).

Mientras tanto, se podría obtener una albúmina de suero humana marcada con un isótopo radiactivo y unida a un colorante fluorescente del infrarrojo cercano y un colorante visible agregando el colorante fluorescente del infrarrojo cercano y el colorante visible a la albúmina marcada con isótopos radiactivos, mezclando los componentes para unirlos a cada uno de los otros por adsorción, y purificando la mezcla.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la generación de imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela, que comprende el uso del marcador de ganglio linfático centinela descrito anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “generación de imágenes multimodales” se refiere a la visualización de la imagen de un ganglio linfático centinela por diversos métodos. El marcador de ganglio linfático centinela y el kit de la presente invención se pueden visualizar mediante imágenes gamma e imágenes de la región del infrarrojo cercano e imágenes visibles.

En un ejemplo de la presente invención, la albúmina marcada con el isótopo radiactivo y unida al colorante fluorescente del infrarrojo cercano y al colorante visible se administró a ratones blancos, y se realizó una imagen del ganglio linfático centinela de los ratones blancos por generación de imágenes gamma, imágenes de la región del infrarrojo cercano e imágenes visibles (ver FIG. 8).

El marcador de ganglio linfático centinela de la presente invención permanece en el ganglio linfático centinela durante un largo período de tiempo y permite la generación de imágenes multimodales del ganglio linfático centinela. Por lo tanto, cuando se usa el marcador, el ganglio linfático centinela puede identificarse con precisión in vivo mediante imágenes infrarrojas cercanas e imágenes gamma sin incisión en la piel, y la ubicación del ganglio linfático centinela identificado puede identificarse visualmente durante una operación quirúrgica para eliminar el ganglio linfático centinela.

Modo de la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describe con más detalle proporcionando los ejemplos que se muestran a continuación. Estos ejemplos pretenden ilustrar la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Compra de materiales de prueba

El tipo de albúmina de suero humana utilizada en la presente invención fue SK albúmina al 20% (SK Chemicals, Corea), y la columna PD-10 (GE) se usó para la purificación de la mezcla de reacción. El isótopo radiactivo $[Tc-^{99m}]TcO_4^-$ utilizado en esta invención se adquirió de Ultra-Technekow DTE Generator (Covidien). La cromatografía instantánea de capa fina (ITLC) que se utilizó para identificar el marcado se adquirió de Pall Life Science. La exploración de TLC se realizó utilizando el escáner de imágenes de radio AR-2000 radio-TLC Imaging Scanner (Bioscan). Además, el tipo de contador gamma utilizado en un experimento de biodistribución fue el contador gamma Wizard (Perkin Elmer). El kit de ensayo de proteínas BCA y el reactivo de Ellman se adquirieron de Pierce, y otros reactivos y disolventes se adquirieron de Sigma-Aldrich. Se obtuvieron imágenes gamma de animales utilizando NanoSPECT (Bioscan) y se obtuvieron imágenes fluorescentes de la región del infrarrojo cercano (NIR) utilizando IVIS Lumina (Xenogen).

Ejemplo 2: Preparación del kit de albúmina de suero humana con tiol

Se agregaron aproximadamente 40 μ L de EDTA 0,3 M, 40 μ L de $NaHCO_3$ 1 M y 50 μ L de 2-mercaptoetanol 1,5 M a una solución de 0,030 mL (6 mg) de albúmina de suero humana al 20% en 1 mL de Na_2CO_3 0,1 M, y la solución de la mezcla se agitó a 37 °C durante 1 hora para reducir los enlaces disulfuro a grupos tiol. Una vez completada la reacción, el producto de reacción se purificó haciéndolo pasar por una columna PD-10, y la albúmina de suero humana con tiol resultante se destiló a presión reducida y se diluyó en 1 mL de agua destilada. A la solución diluida, se agregaron 17 mg de ácido metilénfosfónico, 3,7 g de ácido ascórbico y 8,45 g de cloruro de estaño, y el pH de la solución se ajustó a 6 mediante la adición de NaOH y HCl. La solución resultante se colocó en una botella de vidrio,

se enfrió y luego se liofilizó a -80 °C durante 24 horas, produciendo un kit descartable (FIG. 3).

El rendimiento del producto del kit de albúmina de suero humana con tiol fue del 91,8%, medido por la cuantificación de la proteína BCA. Además, la cantidad de grupos tiol en la albúmina de suero humana con tiol se analizó utilizando el reactivo de Ellman (reactivo de ensayo de sulfhidrilo). Los resultados del análisis demostraron que se produjeron 19,1 grupos tiol por molécula de albúmina de suero humana con tiol.

Ejemplo 3: Preparación de verde de indocianina y azul de Evans

Se colocaron aproximadamente 0,4 mg de verde de indocianina en un tubo protegido de la luz de 1,5 mL y se colocaron 6 mg de azul de Evans en un tubo protegido de la luz de 1,5 mL.

Ejemplo 4: Preparación de compuesto marcado con $[Tc-^{99m}]Tc$ utilizando un kit de albúmina de suero humana con tiol

Se añadieron aproximadamente 20 mCi/2 mL de $[Tc-^{99m}]TcO_4^-$ al kit de albúmina de suero humana con tiol que se preparó en el Ejemplo 2, y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos (FIG. 4). Una vez completada la reacción, el producto de reacción se pasó a través de un filtro estéril de 0,45 μm y los productos sintetizados se analizaron mediante cromatografía instantánea de capa fina (ITLC) utilizando etanol:acetato de amonio al 10% = 1: 1 como disolvente de revelado, y se halló que la relación de marcado era > 99% (FIG. 5).

Ejemplo 5: Preparación de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana

La albúmina de suero humana- $[Tc-^{99m}]Tc$ preparada en el Ejemplo 4 se añadió al tubo con verde de indocianina y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos en condiciones protegidas de la luz para inducir la unión del verde de indocianina a la albúmina por adsorción. Del mismo modo, $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-albúmina de suero humana resultante se colocó en el tubo con azul de Evans y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora en condiciones protegidas de la luz. Una vez completada la reacción de acoplamiento de adsorción, el producto de la reacción se purificó utilizando PD-10, para dar $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-albúmina de suero humana (FIG. 6).

Ejemplo 6: experimento de biodistribución en la captación de ganglios linfáticos de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana

A través de la realización de un experimento de biodistribución, se analizó la captación de ganglios linfáticos de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana de la invención (FIG. 7). Primero, se inyectaron en la almohadilla de la pata de cada uno de los tres ratones blancos 80 $\mu Ci/50 \mu L$ de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana, y después de 60 minutos de inyección, los ratones se sacrificaron, cada órgano fue aislado de los animales, y la radiactividad de cada tejido se midió utilizando un contador gamma (Wizard gamma counter, Perkin Elmer). La biodistribución de la radiactividad se determinó utilizando un método estándar de cálculo de porcentajes con respecto a la cantidad de inyección (g). FIG. 7 muestra el porcentaje de reactividad en cada tejido. En la FIG. 7, la pata es el área inyectada y el nodo es un ganglio linfático centinela. Como se muestra en la FIG. 7, el nivel de captación de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana fue significativamente mayor en el ganglio linfático centinela que en otros órganos.

Ejemplo 7: Generación de imágenes multimodales in vivo de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana usando sistemas de generación de imágenes

La generación de imágenes multimodales in vivo se llevó a cabo utilizando $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana (FIG. 8). Primero, se obtuvieron imágenes gamma de ratones blancos utilizando un sistema SPECT animal (NanoSPECT, Bioscan). En este experimento, la almohadilla de la pata de cada ratón se inyectó con 100 μCi de $[Tc-^{99m}]Tc$ -verde de indocianina-azul de Evans-albúmina de suero humana, y después de 60 minutos de inyección, se tomaron imágenes SPECT de los ratones. Los resultados demostraron que solo el área inyectada y el ganglio linfático tuvieron una fuerte captación del marcador, mientras que otros órganos no mostraron ninguna captación del marcador. Además, se tomaron imágenes de la región del infrarrojo cercano (NIR) que utilizaban el marcador unido al verde de indocianina utilizando IVIS Lumina (Xenogen). Los resultados mostrados en estas imágenes fueron consistentes con los de las imágenes gamma e imágenes visibles que fueron visualizadas por el marcador unido al azul de Evans. El presente marcador multimodal es seguro para uso clínico, ya que se deriva de la albúmina de suero humana que es segura para el ser humano y está unida al verde de indocianina y al azul de Evans que no son tóxicos para el uso en el cuerpo humano. Además, como el marcador puede permanecer en el ganglio linfático centinela durante al menos 1 hora, demuestra una alta detectabilidad del ganglio linfático centinela. Además, como es un marcador multimodal que genera señales multimodales, proporciona una alta precisión en una biopsia de ganglio linfático centinela.

REIVINDICACIONES

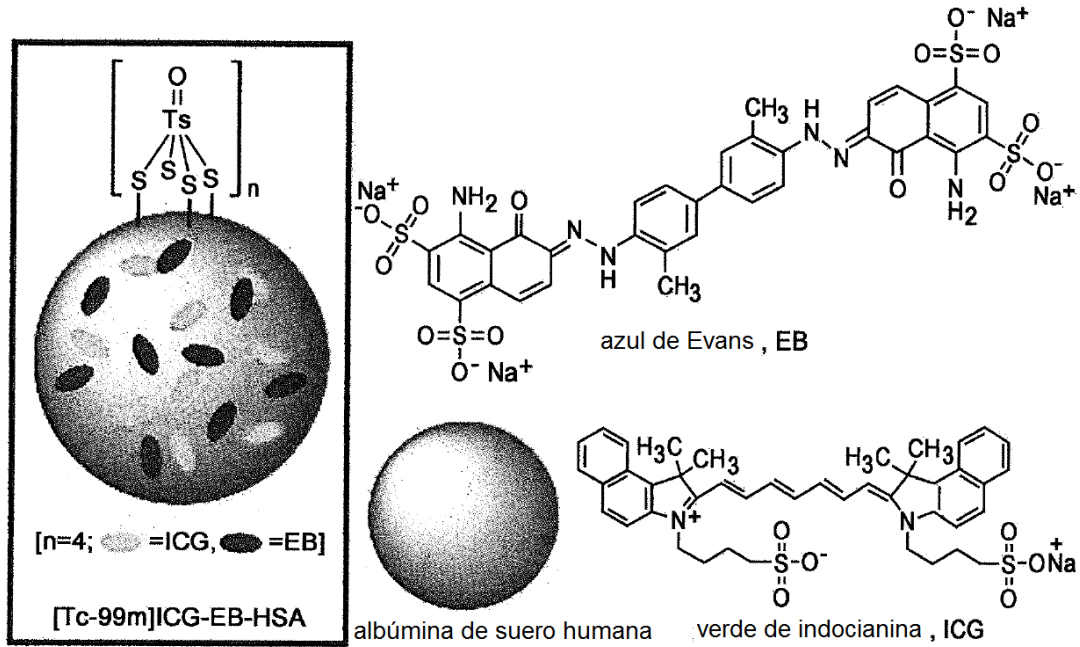
1. Un marcador de ganglio linfático centinela que comprende una albúmina; un isótopo radiactivo; y un colorante infrarrojo cercano que está unido a la albúmina; y un colorante visible que está unido a la albúmina; en donde la albúmina se marca con el isótopo radiactivo y se une al colorante infrarrojo cercano y al colorante visible, y en donde el isótopo radiactivo forma un complejo formando un enlace de coordenadas con grupos tiol generados por la reducción de los enlaces disulfuro de la albúmina.
2. El marcador de ganglio linfático centinela de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el isótopo radiactivo es $[Tc-^{99m}]Tc$.
3. El marcador de ganglio linfático centinela de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el colorante infrarrojo cercano es verde de indocianina.
4. El marcador de ganglio linfático centinela de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el colorante visible es azul de Evans.
5. El marcador de ganglio linfático centinela de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la albúmina es albúmina de suero humana.
6. Un método para preparar un marcador de ganglio linfático centinela capaz de obtener imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela, que comprende:

reducción de los enlaces disulfuro de albúmina a grupos tiol usando un agente reductor para preparar una albúmina reducida;

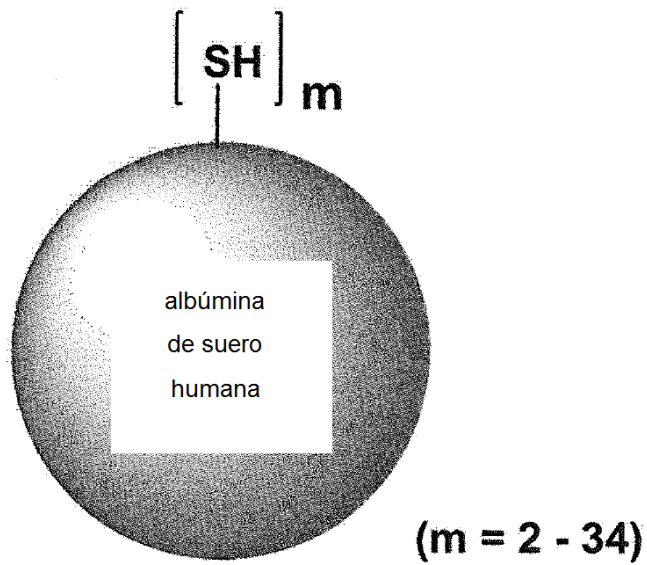
marcación de los grupos tiol de la forma de albúmina reducida en disulfuro con un isótopo radiactivo; y

unión de un colorante visible y un colorante infrarrojo cercano con la albúmina marcada.
7. Un kit para la generación de imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela para preparar el marcador de ganglio linfático centinela de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende: una forma reducida en disulfuro de albúmina; un isótopo radiactivo y un colorante infrarrojo cercano; y un colorante visible.
8. Un método para obtener imágenes multimodales de un ganglio linfático centinela, que comprende el uso del marcador de ganglio linfático centinela de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la generación de imágenes multimodales comprende la generación de imágenes gamma e imágenes de infrarrojo cercano, y la generación de imágenes visibles.

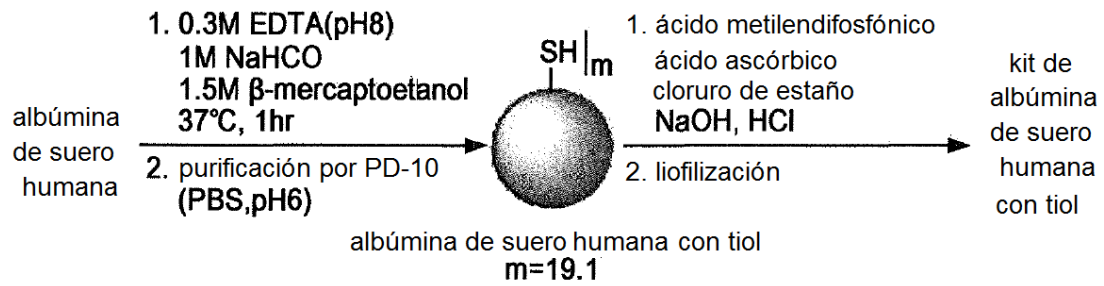
【 Figura 1 】



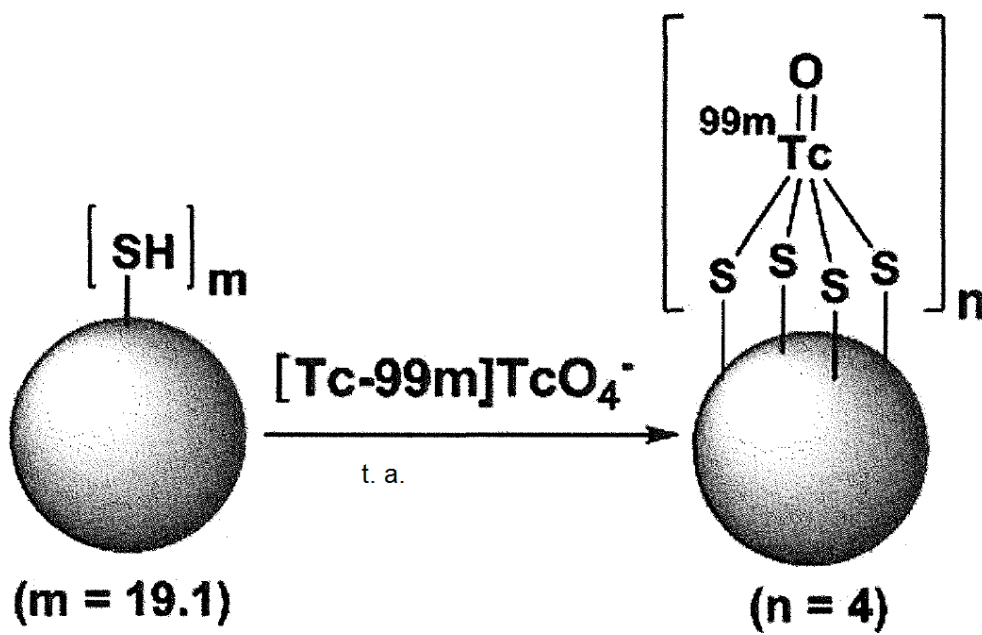
【 Figura 2 】



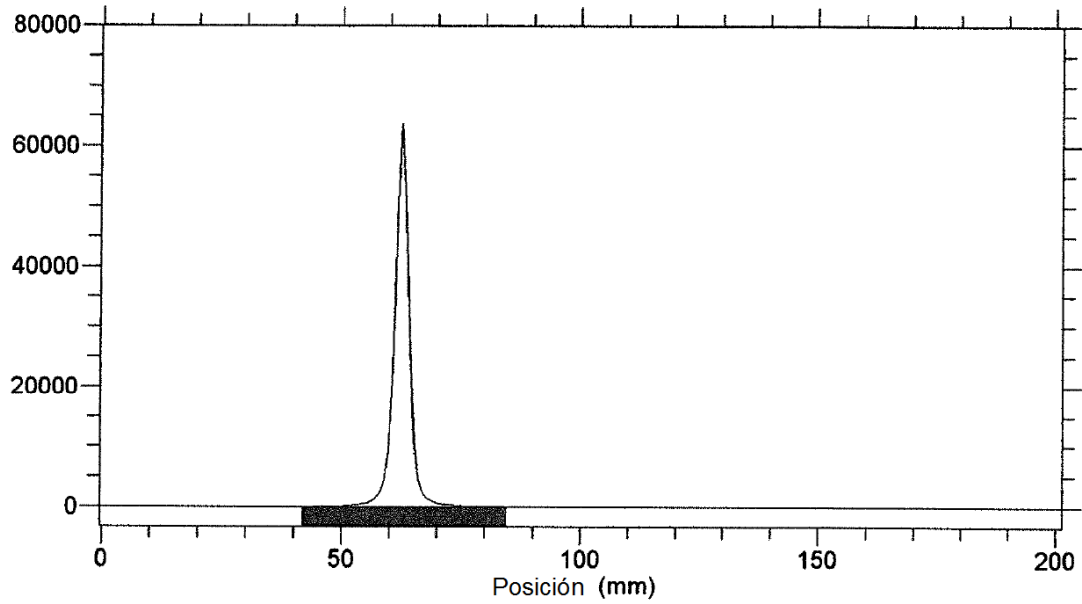
[Figura 3]



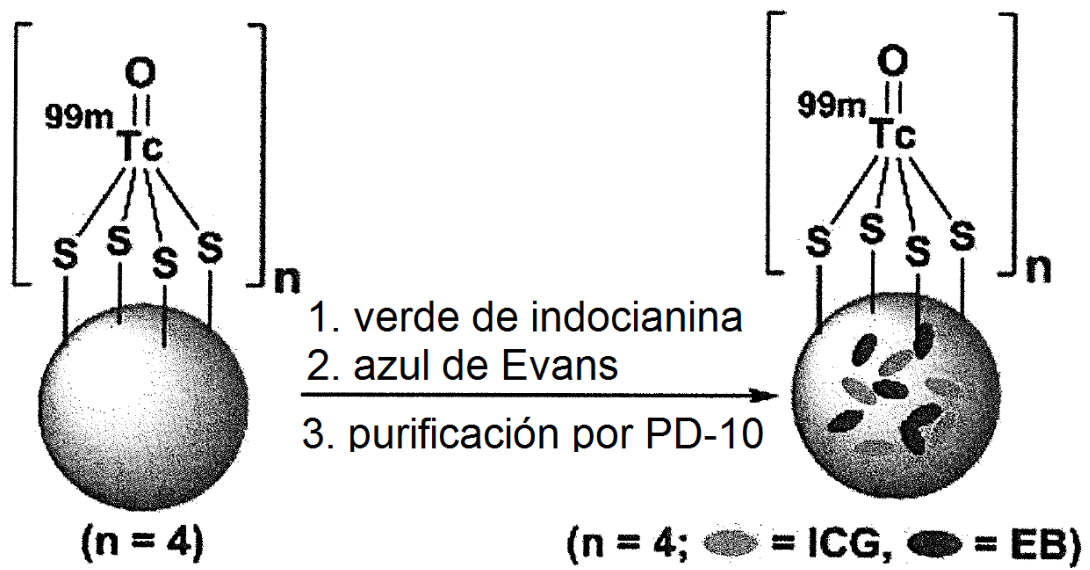
[Figura 4]



[Figura 5]

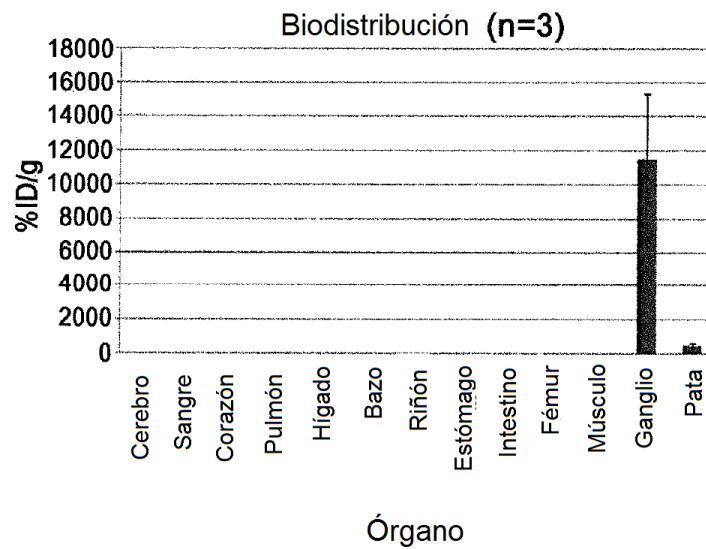


[Figura 6]



[Figura 7]

%ID/g	Cerebro	Sangre	Corazón	Pulmón	Hígado	Bazo	Riñón	Estómago	Intestino	Fémur	Músculo	Ganglio	Pata
Ratón #1	0.01042	0.14911	0.0731	0.13009	5.36195	3.95606	0.97589	0.08476	0.1437	0.34474	0.02881	15900.5	424.679
Ratón #2	0.01822	0.12247	0.09627	0.26383	7.86045	4.57686	1.02668	0.15288	0.13339	0.37588	0.08101	9110.89	595.919
Ratón #3	0.01581	0.18589	0.10907	0.25807	9.03078	6.49118	1.19905	0.11436	0.12726	0.66921	0.10444	9474.9	377.471
Media	0.01482	0.15249	0.09281	0.21733	7.41773	5.00803	1.06721	0.11733	0.13478	0.46328	0.07142	11495.4	466.023
DE	0.004	0.03185	0.01823	0.0756	1.87405	1.32142	0.11697	0.03416	0.00831	0.17902	0.03872	3819.22	114.942



[Figura 8]

