

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 237**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2017** **PCT/KR2017/004302**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2017** **WO17183946**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2017** **E 17786214 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024** **EP 3447496**

54 Título: **Composición de inyección para marcar una lesión**

30 Prioridad:

22.04.2016 KR 20160049425

20.04.2017 KR 20170050971

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2025

73 Titular/es:

NATIONAL CANCER CENTER (100.00%)
323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu
Goyang-si, Gyeonggi-do 10408, KR

72 Inventor/es:

KIM, SEOK KI;
PARK, INSOO y
NOH, JIN HEE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 997 237 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

Composición de inyección para marcar una lesión

5 **[Campo técnico]**

La presente invención se refiere a una composición de inyección para marcar una lesión como se define en las reivindicaciones y un método para proporcionar información sobre una posición de una lesión usando la composición de inyección, como se define en las reivindicaciones.

10

[Antecedentes técnicos]

15

Aunque se han desarrollado varios métodos para el tratamiento anticáncer usando fármacos anticancerosos, la eliminación de las células cancerosas mediante métodos quirúrgicos permanece el método de tratamiento más ampliamente usado.

20

Sin embargo, los métodos quirúrgicos esencialmente requieren técnicas para minimizar la amplitud afectada por la cirugía con el fin de mejorar la salud y bienestar de un paciente después de la operación quirúrgica. En particular, con el fin de alcanzar el objetivo de cirugía de conservación de mama para mujeres coreanas que típicamente tienen pechos pequeños, las lesiones que se extirpan quirúrgicamente necesitan ser menores en el caso de mujeres coreanas que en el caso de mujeres de otros países.

25

Mientras tanto, la amplitud afectada por la cirugía se determina en consideración tanto de la lesión como de las regiones marginales alrededor de la lesión. Cuando un cirujano no puede determinar la localización o extensión exacta de la lesión, el cirujano debe ajustar una región marginal amplia alrededor de la lesión. Esto es porque parte de un tumor puede permanecer en un margen de extirpación de la lesión cuando la amplitud de la cirugía se reduce sin cuidado.

30

Sin embargo, no hay muchos métodos que pueda utilizar un cirujano para identificar de forma precisa una lesión en tiempo real durante cirugía clínica real. Aunque se han desarrollado métodos diagnósticos muy precisos, puesto que tales métodos diagnósticos no se pueden usar durante la cirugía, un cirujano depende principalmente de los sentidos táctil o visual durante la cirugía real, y las lesiones con frecuencia no se identifican claramente en tales casos.

35

Particularmente, las lesiones más pequeñas son más difíciles de identificar. Para lograr los objetivos de cirugía mínimamente invasiva y cirugía de conservación, es necesaria tecnología que muestre a un cirujano una lesión en tiempo real durante la cirugía.

40

En cirugías convencionales para eliminar tumores, en particular cirugía de cáncer de mama, una posición de una lesión diminuta en un paciente se determina antes de la cirugía usando ondas ultrasónicas, mamografía, o imagenología de resonancia magnética, la posición predeterminada de la lesión se marca, y los tejidos relacionados a la lesión marcada se eliminan. Los métodos usados para marcar lesiones incluyen un método de dibujar en la superficie de la piel, un método de usar un alambre, un método de inyectar un pigmento negro tal como carbón, y similares.

45

Sin embargo, mientras el método de dibujar en la superficie de la piel con una pluma para marcar una posición de la lesión es el más fácil de usar, también tiene problemas en que tiene un grado muy bajo de precisión porque la forma de la mama cambia entre el diagnóstico y la operación debido a la naturaleza extremadamente blanda del tejido mamario, y este método es insatisfactorio con respecto a marcar una posición de la lesión en una superficie de la piel cuando la lesión está localizada profunda dentro de la mama.

50

55

Además, en el método de perforar una lesión de mama con un alambre, sería óptimo insertar el alambre para que sea perpendicular a la superficie de la piel. Sin embargo, tal método tiene problemas en que el alambre tiene que insertarse oblicuamente debido a su potencial influencia en la sonda ultrasónica, una posición del alambre puede variar con el movimiento de la mama, lo que produce menor precisión de la que se esperaría, el alambre insertado puede interferir con la cirugía, y es necesario un procedimiento adicional de extirpar un sitio del alambre insertado. Por último, mientras el método de inyectar un pigmento tal como carbón tiene una ventaja en que el pigmento inyectado se puede unir a una lesión para marcar la posición precisa de la lesión, también tiene inconvenientes en que un pigmento negro no se puede identificar desde el exterior de la mama cuando la lesión está localizada profunda en la mama, y un sitio quirúrgico se puede contaminar con el pigmento. Los inconvenientes anteriormente mencionados también pueden aplicarse a operaciones quirúrgicas para eliminar tejidos cancerosos diferentes que en casos de cáncer de mama.

60

65

Puesto que es difícil determinar de forma precisa la amplitud de la cirugía para eliminar quirúrgicamente una lesión, en particular una lesión cancerosa, usando técnicas que se han desarrollado hasta ahora, la amplitud de la extirpación se tiene que expandir cuando una lesión cancerosa se elimina quirúrgicamente, y también tienen que realizarse pruebas para determinar si la lesión se ha eliminado apropiadamente después de la cirugía.

Para resolver estos problemas, la Patente Registrada Coreana No. 10-1552138 divulga una composición para marcar una lesión cancerosa, que incluye un complejo en el que un colorante para teñir tejidos biológicos, un isótopo radioactivo o una combinación de los mismos se une a albúmina macroagregada. En este caso, la composición permite que un marcador se absorba de forma eficaz en una lesión cancerosa para marcar la posición exacta de la lesión, y permite que el pigmento se siga en tiempo real de modo que la amplitud de la lesión que se va a eliminar se puede confirmar.

Mientras tanto, mientras el complejo en forma de una solución acuosa divulgada en la Patente Registrada Coreana No. 10-1552138 es favorable como un marcador para una operación quirúrgica porque el complejo no difunde en tejidos en una forma de pigmento único, en la aplicación real, tiene una desventaja en que una cantidad predeterminada del complejo no se puede inyectar porque precipita en la preparación de inyección.

Asimismo, se puede inyectar demasiado o demasiado poco del complejo en forma de una solución acuosa divulgada en la Patente Registrada Coreana No. 10-1552138 debido a su baja viscosidad. Por tanto, cuando un médico tiene poca experiencia con inyecciones o una situación en una clínica hace difícil administrar inyecciones, no se puede inyectar una cantidad predeterminada de la albúmina macroagregada. Cuando el complejo en la preparación de inyección sedimenta en la jeringa, el complejo se inyecta en forma de un terrón, y a veces se observan irregularidades en el área marcada. Asimismo, cuando el complejo se inyecta con una gran cantidad o cuando los tejidos en los que se inyecta el complejo son duros de penetrar (tejido cicatricial o tejido muscular), la solución inyectada tiende a expandirse mucho a lo largo de tejidos sueltos de membranas solo entre diferentes tejidos o regiones de músculo.

Es decir, la solución inyectada se puede expandir mucho en músculos a lo largo de la fascia muscular, y se puede expandir en tejido cicatricial a lo largo de los granos de tejidos fibrosos en los tejidos cicatriciales. Para prevenir esto, una pequeña cantidad de la solución inyectada se debe inyectar usando una aguja relativamente gruesa, pero este método tiene un problema en que es muy inconveniente en términos de práctica.

Según esto, hay una necesidad para una composición de inyección capaz de resolver los problemas de obstrucción de una aguja de inyección debido a un complejo aglomerado en una inyección, incapacidad de inyectar una cantidad predeterminada del complejo, y rápida expansión del complejo en los tejidos circundantes.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Para resolver los problemas anteriores, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de inyección para marcar una lesión, que sea capaz de resolver el problema de rápida sedimentación del complejo por adición de una composición que puede regular la viscosidad en la composición de inyección.

En particular, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de inyección para marcar una lesión que sea capaz de resolver el problema de rápida expansión del complejo en tejidos circundantes, en que el problema de la rápida sedimentación del complejo también se resuelve y por tanto se puede inyectar una cantidad predeterminada del complejo.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para proporcionar información sobre una posición de una lesión usando la composición de inyección anteriormente mencionada para marcar una lesión.

[Solución técnica]

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier objeto que esté fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona para fines de información solo. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento, diagnóstico o cirugía se refieren a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento, diagnóstico o cirugía del cuerpo humano o animal.

Para lograr los objetos de la presente invención, según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de inyección para marcar una lesión, que incluye:

una primera composición que incluye un complejo que contiene un ingrediente activo y que tiene una densidad media de 1,1 a 1,4 g/ml, el ingrediente activo es un colorante para teñir tejidos biológicos, un isótopo radioactivo o una combinación de los mismos unido a albúmina macroagregada (MAA); y una segunda composición que es ácido hialurónico (HA), el HA tiene un peso molecular medio de 0,5 a 3,0 MDa, en donde el HA se incluye del 0,2 al 1% (p/v) con respecto a la cantidad total de la composición de inyección.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para proporcionar información sobre una posición de una lesión a la que se ha administrado la composición de inyección anterior, que incluye:

determinar la posición de la lesión mediante una señal de un ingrediente activo generada en el sujeto.

[Efectos ventajosos]

5 Una composición de inyección para marcar una lesión según la presente invención incluye una primera composición que incluye un complejo que contiene un ingrediente activo y una segunda composición que incluye ácido hialurónico (HA), que hace posible resolver el problema de la rápida sedimentación del complejo.

10 En particular, la composición de inyección para marcar una lesión según la presente invención puede tener un efecto de resolver el problema de la rápida sedimentación del complejo durante la preparación de la inyección de modo que se puede inyectar una cantidad predeterminada del complejo, y un efecto de proporcionar un uso clínicamente conveniente y estable del complejo resolviendo los problemas de inyección de una cantidad excesiva del complejo y la rápida expansión del complejo a sus alrededores.

15 Asimismo, cuando una cantidad predeterminada de un material viscoso biocompatible tal como ácido hialurónico o colágeno se añade a la composición de inyección de la presente invención para inyectar una cantidad equivalente del material viscoso en varios tejidos tal como tejido muscular, tejido mamario, tejido subcutáneo, tejido de piel, y similares, la composición de inyección de la presente invención puede tener un efecto de permitir que una cantidad predeterminada del complejo se inyecte de forma mucho más eficaz, comparado a cuando el material viscoso no está incluido y también puede tener un efecto de reducir mucho la expansión del complejo incluso cuando la composición de inyección se inyecta rápidamente, comparado a cuando el material viscosos no se incluye.

[Descripción de los dibujos]

25 La figura 1 es un gráfico de una ecuación de regresión lineal para estimar la densidad de ICG-MMA.

La figura 2 es un gráfico que ilustra un cambio en la intensidad de la señal de fluorescencia de infrarrojo cercano de un complejo ICG-MAA según los cambios en las concentraciones de ICG y MAA.

30 La figura 3 es una imagen que ilustra una comparación entre dos tipos de MAA que tienen diferentes concentraciones de HA ((A) HA al 0,1% y (B) HA al 0,5%).

La figura 4 muestra una imagen de campo claro de una solución acuosa de MAA en presencia/ausencia de HA.

35 La figura 5 muestra las señales de fluorescencia medidas de ICG 5 μ M a varias concentraciones de MAA.

La figura 6 muestra imágenes fluorescentes de infrarrojo cercano (NIRF) de pechugas y mollejas de pollo fotografiadas antes y después de la incisión después de inyectar el complejo en las pechugas y mollejas de pollo.

40 La figura 7 muestra una imagen de campo claro y NIRF de una sección de una pechuga de pollo cortada observada después de inyectar el complejo junto con una ruta de la aguja de inyección.

La figura 8 muestra el ensayo de la aplicabilidad de una mezcla ICG-MAA-HA en cirugía de cáncer gástrico usando un catéter endoscópico.

45 La figura 9 es un diagrama que muestra los resultados de medir señales de fluorescencia basado en la presencia/ausencia de ácido hialurónico ((A) el ácido hialurónico no se añade, y (B) se añade ácido hialurónico al 0,1%).

[Mejor manera]

50 Se ilustran formas de realización específicas de la presente invención en los dibujos y se describen en detalle en la descripción detallada.

55 Se entenderá además que los términos “comprende”, “comprender”, “incluye”, “incluir”, “tiene” y/o “tener” cuando se usan en el presente documento, especifican la presencia de características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos expresados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos.

60 La presente invención se dirige a una composición de inyección para marcar una lesión y, más particularmente, a una composición de inyección para marcar una lesión, que es capaz de resolver el problema de la rápida sedimentación de un complejo por la adición de una composición capaz de regular la viscosidad de la composición de inyección a la composición de inyección.

65 En particular, la composición de inyección para marcar una lesión según la presente invención puede resolver el problema de la rápida sedimentación del complejo mediante la adición de una composición capaz de regular la

viscosidad en la composición de inyección, y por tanto puede tener un efecto de permitir que se inyecte una cantidad predeterminada del complejo.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle.

5 Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, se proporciona una composición de inyección para marcar una lesión, que incluye:

10 una primera composición que incluye un complejo que contiene un ingrediente activo y que tiene una densidad media de 1,1 a 1,4 g/ml, el ingrediente activo es un colorante para teñir tejidos biológicos, un isótopo radioactivo o una combinación de los mismos unido a albúmina macroagregada (MAA); y una segunda composición que es ácido hialurónico (HA), el HA tiene un peso molecular medio de 0,5 a 3,0 MDa, en donde el HA se incluye del 0,2 al 1% (p/v) con respecto a la cantidad total de la composición de inyección.

15 Más específicamente, puesto que un complejo en el que un ingrediente activo está unido a albúmina macroagregada tiene una densidad relativamente alta, es decir, una densidad media de 1,1 a 1,4 g/ml, el complejo tiene una desventaja en que el complejo sedimenta en una jeringa durante la preparación de una inyección.

20 Por tanto, la presente invención se diseña para resolver el problema de la rápida sedimentación del complejo durante la preparación de la inyección, y se caracteriza por la adición de una segunda composición que es ácido hialurónico (HA), el HA tiene un peso molecular medio de 0,5 a 3,0 MDa, a la primera composición anteriormente mencionada para regular la viscosidad de la composición de inyección.

La primera composición de la presente invención se describirá primero en detalle a continuación.

25 Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, la primera composición incluye una composición en la que un ingrediente activo está unido a albúmina macroagregada (MAA).

30 En la presente invención, el término "albúmina macroagregada (MAA)" se refiere a una partícula proteínica que tiene un diámetro de 10 a 50 μm , que se prepara calentando seroalbúmina humana de modo que la seroalbúmina humana coagula.

35 Mientras tanto, la estructura y propiedades físicas de la MAA pueden ser diferentes de las de la seroalbúmina humana, que tiene un diámetro de menos de 10 nm. Puesto que la MAA puede tener una característica de permanecer en capilares pulmonares que tienen un diámetro de aproximadamente 8 μm cuando se inyecta por vía intravenosa, lo que produce una microembolia, MAA marcada con un isótopo radioactivo se ha usado para gammagramas pulmonares (para diagnóstico de anomalías del flujo sanguíneo pulmonar tal como embolias pulmonares, trombosis pulmonar, síndrome de aortitis, neumonía, cáncer de pulmón, y similares, o diagnóstico de derivaciones derecha e izquierda o hipertensión venosa pulmonar), escáner venoso (para diagnóstico de sangre venosa central en el sitio que se va a escanear), escáner arterial (para diagnóstico de anomalías de flujo sanguíneo arterial periférico tal como enfermedad de Paget y similares), o similares utilizando la característica anteriormente mencionada. La MAA de la presente invención se puede usar como un mediador para la unión de material de marcaje con un tejido de lesión cancerosa cuando la MAA se inyecta en el tejido de lesión cancerosa.

45 Además, la MAA de la presente invención se puede sintetizar usando HSA recombinante y también HSA no autóloga. Asimismo, se puede comprar y usar MAA que está comercialmente disponible. La MAA de la presente invención se puede usar como un mediador para unir un material de marcaje con un tejido de lesión cancerosa cuando la MAA se inyecta en el tejido de lesión cancerosa. En este caso, el mediador puede servir para adsorber un material de marcaje y prevenir que el material de marcaje se expanda en el tejido de lesión cancerosa.

50 Además, según una forma de realización ejemplar de la presente invención, el término "ingrediente activo" se refiere a un componente que sube la energía de moléculas, iones atómicos, y similares mediante absorción, descarga, y bombardeo de haces de partículas de energía radiante de modo que es responsable de producir una reacción química. En este caso, el ingrediente activo es un colorante para teñir tejidos biológicos, un isótopo radioactivo, o una combinación de los mismos.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, el colorante para teñir tejidos biológicos puede ser un colorante visualmente detectable o un colorante fluorescente.

60 El colorante visualmente detectable se puede seleccionar del grupo que consiste en rojo neutro, azul Nilo, marrón Bismarck, carmín de litio, azul de tripán, verde Janus, violeta de metilo, O-lamina, verde malaquita, safranina, eosina, rojo Congo, eritrosina, nigrosina, azul alcian hematoxilina, azul de anilina, verde claro, y una combinación de los mismos.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, el colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente de infrarrojo cercano, y el colorante fluorescente de infrarrojo cercano puede ser verde de indocianina (ICG), pero la presente invención no está limitada al mismo.

En la presente invención, el término “colorante para teñir tejidos biológicos” se refiere a una sustancia que se une a un tejido biológico para marcar una posición del tejido unido de modo que una posición del tejido marcado se puede determinar a simple vista o con una herramienta de detección. Para los fines de la presente invención, el colorante para teñir tejidos biológicos puede ser un material de marcaje que se puede unir a un tejido canceroso de modo que el material de marcaje se pueda usar para el fin de marcar un sitio en que se ha desarrollado cáncer. Preferiblemente, un colorante visualmente detectable, un colorante fluorescente capaz de emitir fluorescencia en un sitio de unión de modo que el colorante se pueda detectar usando un aparato tal como una cámara de fluorescencia, y similares, se pueden usar solos o en combinación entre sí, pero la presente invención no está particularmente limitada a lo mismo.

En la presente invención, el término “colorante visualmente detectable” se refiere a un tipo de pigmento que permite que un material de marcaje unido a un tejido biológico emita un color en un espectro de color visible de modo que una posición del tejido marcado se pueda determinar a simple vista. Para los fines de la presente invención, cuando el colorante visualmente detectable se inyecta en un sitio en el que se ha desarrollado cáncer para el fin de eliminar el cáncer usando un método quirúrgico, el colorante visualmente detectable puede servir para mejorar una tasa de éxito de cirugía contra el cáncer porque permite la identificación clara de una lesión cancerosa que se va a extirpar. El material de marcaje visualmente detectable preferiblemente incluye rojo neutro, azul Nilo, marrón Bismarck, carmín de litio, azul de tripán, verde Janus, violeta de metilo, O-lamina, verde malaquita, safranina, eosina, rojo Congo, eritrosina, nigrosina, azul alcian hematoxilina, azul de anilina, verde claro, o similares, que se pueden usar solos o en combinación. Sin embargo, el material de marcaje visualmente detectable no está particularmente limitado siempre que puede lograr el objetivo de identificar tejido de lesión cancerosa.

En la presente invención, el término “colorante fluorescente” se refiere a un compuesto orgánico que emite fluorescencia. En este caso, el colorante fluorescente puede absorber luz con ciertas longitudes de onda para formar un estado excitado y maximizar la distancia de penetración de la luz y puede minimizar señales de error producidas por humedad. Preferiblemente, el compuesto orgánico puede ser un colorante fluorescente de infrarrojo cercano que es un compuesto orgánico que emite fluorescencia con una longitud de onda de infrarrojo cercano de 700 nm a 3.000 nm, preferiblemente de 750 nm a 900 nm. La fluorescencia de longitudes de onda del infrarrojo cercano emitida desde el colorante fluorescente de infrarrojo cercano se puede fotografiar en forma de imágenes o seguir en tiempo real usando un aparato tal como una cámara de fluorescencia, una sonda de detección de fluorescencia (documento PCT/KR2011/009271), o similares. En la presente invención, puesto que la fluorescencia de las longitudes de onda de infrarrojo cercano se absorbe *in vivo* a una dosis relativamente pequeña, al contrario que otros intervalos de longitud de onda, la luz de infrarrojo cercano emitida desde un sitio localizado relativamente profundo en un tejido biológico también se puede detectar desde fuera del tejido biológico. Para los fines de la presente invención, cuando el colorante fluorescente de infrarrojo cercano se inyecta en un sitio en el que se ha desarrollado cáncer para eliminar el cáncer usando un método quirúrgico, el colorante fluorescente de infrarrojo cercano puede servir para mejorar una tasa de éxito de cirugía contra el cáncer porque permite la identificación clara de un sitio de lesión de cáncer antes de la extirpación. En particular, a diferencia del colorante visualmente detectable, el colorante fluorescente de infrarrojo cercano puede fomentar la cirugía del cáncer rápida y precisa porque el colorante fluorescente de infrarrojo cercano se puede usar para detectar externamente una posición de una lesión antes de hacer una incisión en el tejido para identificar directamente la lesión. Se puede usar preferiblemente verde de indocianina y similares como el colorante fluorescente de infrarrojo cercano. En este momento, cualquier colorante fluorescente de infrarrojo cercano que se puede usar en el cuerpo humano se puede incluir en el ámbito de la presente invención.

El complejo en el que el colorante fluorescente de infrarrojo cercano se une a MAA puede tener una alta probabilidad respecto a encontrar una lesión diminuta y mejorar un grado de precisión en la extirpación de la lesión porque el complejo tiene una ventaja en que el complejo tiene una excelente estabilidad y precisión relacionado con señales de fluorescencia que se van a detectar, comparado con los complejos en los que el colorante fluorescente de infrarrojo cercano se une a otros materiales que se sabe se acumulan en tumores.

En la presente invención, el término “verde de indocianina (ICG)” se refiere a un colorante de imagenología fluorescente que emite fluorescencia en una región de infrarrojo cercano, que se usa mucho en el campo de biología o medicina. En este caso, es deseable que el ICG se aplique clínicamente como un colorante fluorescente que se puede usar para el cuerpo humano porque el ICG se descompone y desaparece o se excreta en la orina o heces en una hora después de que el ICG se inyecte al cuerpo humano. De hecho, varias tesis han descrito casos en los que se usó verde de indocianina para aplicación en el cuerpo humano. Un ejemplo describió el uso clínico seguro de verde de indocianina en 18 pacientes de cáncer de mama (T. Kitai, et al., Breast Cancer, 12:211-215, 2005). Además, la unión adsorbente del colorante fluorescente de infrarrojo cercano se puede lograr mezclando el colorante fluorescente de infrarrojo cercano con la MAA de la presente invención.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, se confirmó que una proporción de mezcla adecuada para preparar un complejo que muestra un alto nivel de señales de fluorescencia de infrarrojo cercano tras la preparación de un complejo en el que ICG se une a MAA (ICG-MAA) es ICG 3,9 μ M con respecto a MAA 0,23 mg/ml,

ICG 6,5 μ M con respecto a MAA 2,3 mg/ml, e ICG 6,5 μ M con respecto a MAA 11,5 mg/ml. Puesto que las concentraciones de MAA e ICG varían debido a la difusión *in vivo* cuando MAA e ICG se inyectan *in vivo*, es imposible determinar las concentraciones exactas de MAA e ICG en el momento de la inyección. Sin embargo, se confirmó que el complejo tiene el mayor valor de fluorescencia cuando se inyecta a ICG 6,5 μ M con respecto a MAA de 2 a 4 mg/ml, que se inyecta fácilmente en un aspecto experimental. Por tanto, se puede usar preferiblemente ICG 6,5 μ M con respecto a MAA 2 mg/ml.

En la presente invención, el término "isótopo radioactivo" se refiere a un elemento que tiene el mismo número atómico, pero un peso atómico diferente y puede emitir radiación. En este caso, el isótopo radioactivo con frecuencia se usa como un marcador importante para diagnosticar convenientemente enfermedades como resultado de emitir rayos gamma u otras partículas subatómicas para hacer uso de las características de la desintegración radioactiva del isótopo radioactivo. Para los fines de la presente invención, cuando el isótopo radioactivo se inyecta en un sitio en el que se ha desarrollado cáncer en un tejido a una profundidad a la que la fluorescencia emitida del colorante fluorescente de infrarrojo cercano no se puede detectar, para eliminar el cáncer usando un método quirúrgico, el isótopo radioactivo puede servir para mejorar una tasa de éxito de cirugía de cáncer porque permite la identificación clara de un sitio de lesión de cáncer antes de la extirpación. El isótopo radioactivo no está particularmente limitado siempre que tenga una propiedad de ser capaz de marcarse con MAA capaz de unirse a una lesión de cáncer. Sin embargo, el isótopo radioactivo puede ser preferiblemente 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, Ca-68, o similares, y más preferiblemente I-124, I-125, I-131, Cu-64, Tc-99m, Mo-99, CR-51, Ca-45, Ca-68, o similares, todos los cuales se usan para fines médicos. Lo más preferiblemente, se puede usar Tc-99m como el isótopo radioactivo.

En la presente invención, el término "Tc-99m" se refiere a un isótopo radioactivo de tecnecio (Tc) que se ha usado mucho para estudios médicos porque tiene un periodo de semidesintegración corto de 6 horas, produce rayos gamma que se pueden para imagenología, requiere una dosis de radiación muy baja, muestra excelente permeabilidad tisular, y no produce una reacción alérgica como producen algunos pigmentos.

En la presente invención, el término "sujeto" se refiere a un organismo vivo que puede tener una lesión debido al inicio de cáncer y al que se puede administrar un complejo o composición para marcar una lesión cancerosa según la presente invención.

Cuando la composición de inyección para marcar una lesión proporcionada en la presente invención se administra *in vivo* a tejido de lesión cancerosa, la composición de inyección administrada se une a la lesión cancerosa para marcar una posición de la lesión por medio de color, fluorescencia de infrarrojo cercano, radioactividad, o una combinación de los mismos. Asimismo, porque la posición, tamaño y similares de la lesión cancerosa se puede detectar en tiempo real durante la cirugía detectando el marcador, se puede mejorar la precisión y se puede prevenir la pérdida excesiva de tejido cuando la lesión cancerosa se elimina mediante una operación quirúrgica.

Además, puesto que el complejo incluido en la composición de inyección de la presente invención puede permanecer en la lesión cancerosa *in vivo* durante un largo tiempo, al contrario que los complejos en los que el colorante para teñir tejidos biológicos se une a otro material, un grado de precisión respecto a la extirpación de la lesión cancerosa por operación quirúrgica, así como una extirpación quirúrgica de la lesión cancerosa se puede determinar fácilmente. Por ejemplo, después de determinar la posición de una lesión diminuta antes de la cirugía usando ondas ultrasónicas, y similares, el complejo de la presente invención se puede inyectar a un sitio de lesión, y el sitio de lesión se puede determinar de forma estable y precisa durante la cirugía en horas.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, la MAA preferiblemente se usa a una concentración de 1 a 8 mg/ml con respecto a un tampón, pero la presente invención no está limitada a lo mismo.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, el ICG se usa preferiblemente a de 4 a 250 μ M con respecto a MAA de 1 a 8 mg/ml. En consideración a la solubilidad de MAA, se puede usar más preferiblemente ICG 6,5 μ M con respecto a MAA de 2 a 4 mg/ml. Sin embargo, es posible ajustar apropiadamente las concentraciones de MAA e ICG tras la inyección *in vivo* en los intervalos descritos en los ejemplos para mostrar la máxima intensidad de fluorescencia según las condiciones.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, el isótopo radioactivo se puede seleccionar 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, P-32, CR-51, Ca-45, Ca-68, y una combinación de los mismos.

A continuación, la segunda composición según una forma de realización ejemplar de la presente invención se describirá en detalle.

La segunda composición se caracteriza por tener un alto peso molecular de 0,5 a 3,0 MDa e incluir ácido hialurónico (HA).

En particular, puesto que la segunda composición tiene una viscosidad predeterminada, la composición se puede añadir a la composición de inyección para marcar una lesión para resolver el problema de la rápida sedimentación del complejo incluido en la primera composición y de esta manera tiene un efecto de permitir que se inyecte una cantidad predeterminada del complejo.

El peso molecular de la segunda composición está en un intervalo de 0,5 a 3,0 MDa, o en un intervalo de 1,0 a 2,0 MDa. Puesto que la segunda composición tiene un peso molecular relativamente bajo y una viscosidad predeterminada, la segunda composición puede resolver el problema de la rápida sedimentación del complejo incluido en la primera composición.

Aquí, la unidad de peso molecular "Da" es una unidad que representa masa. En este caso, 1/16 de la masa de un átomo de oxígeno se puede denominar como un dalton.

Además, la segunda composición puede tener una viscosidad de 5 a 1.500 cps a temperatura ambiente, y puede tener una viscosidad de 100 a 900 cps, preferiblemente una viscosidad de 100 a 350 cps, a temperatura ambiente.

Más específicamente, cuando la viscosidad de la segunda composición es menor de 5 cps a temperatura ambiente, es imposible resolver el problema de la rápida sedimentación del complejo incluido en la primera composición debido a la baja viscosidad. Por otra parte, cuando la viscosidad de la segunda composición es mayor de 1.500 cps, puede ser difícil inyectar la composición de inyección debido a la viscosidad muy alta, y por tanto se necesita aplicar una alta cantidad de presión cuando la composición de inyección se inyecta en el tejido.

Según la presente invención, la segunda composición incluye un material viscoso biocompatible, y el material viscoso biocompatible es ácido hialurónico (HA).

Según la presente invención, la segunda composición se añade en una cantidad del 0,2% (p/v) al 1% (p/v), basado en el peso total de la composición de inyección.

Más específicamente, cuando la segunda composición se incluye en una cantidad de menos del 0,2% (p/v) basado en el peso total de la composición de inyección, puede ser difícil inyectar una cantidad predeterminada del complejo en el tejido porque el complejo sedimenta rápidamente debido a un corto tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad de la composición de inyección. En particular, surge el problema de inyectar una cantidad excesiva del complejo o de expansión del complejo en el tejido circundante demasiado deprisa cuando se inyecta en los tejidos.

Asimismo, cuando el contenido de la segunda composición es mayor del 1% (p/v) basado en el peso total de la composición de inyección, se puede producir un aumento en la viscosidad debido al grado de concentración de la segunda composición, y por tanto puede ser necesario aplicar una alta cantidad de presión durante la inyección, lo que hace difícil inyectar la composición de inyección a mano.

En un aspecto, la composición de inyección se puede añadir del 0,2% (p/v) al 1% (p/v) en un estado en que la composición de inyección se carga en una jeringa que incluye una guja de 18 a 26G. En otro aspecto, la composición de inyección se puede incluir del 0,2 al 0,5% (p/v) cuando se usa un catéter endoscópico.

Mientras tanto, una forma de realización ejemplar de la presente invención se caracteriza en que se proporciona una composición de inyección para marcar una lesión que satisface la siguiente expresión matemática 1 cuando se mide a temperatura ambiente.

[Expresión matemática 1]

$$|T_2 - T_1| < 15\%$$

en donde T_1 representa la transmitancia (%) a 550 nm cuando se mide a un cuarto de punto de la altura de un recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ en un estado en que la composición de inyección preparada se carga en el recipiente transparente, y

T_2 representa la transmitancia (%) a 550 nm cuando se mide a un cuarto de punto de la altura de un recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ después de haberse dejado reposar durante 120 minutos en un estado en que la composición de inyección preparada se carga en el recipiente transparente.

En este momento, la transmitancia se puede referir a un grado de paso de la luz a través de una capa de material. En este momento, cuando la intensidad de la luz incidente en la capa de material es I_1 y la intensidad de la luz emitida a través de la capa de material es I_2 , se puede considerar que la transmitancia es $T = I_2/I_1$.

Además, el recipiente transparente puede tener un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ (anchura $\times$ longitud $\times$ altura), pero la presente invención no está limitada a lo mismo.

Asimismo, el término “un cuarto de punto de la altura del recipiente transparente” se puede referir a un punto correspondiente a un cuarto del recipiente medido desde el fondo del mismo.

A modo de un ejemplo, la transmitancia (T_1) a 550 nm cuando se mide a un cuarto de punto del recipiente en un estado en que se añade ácido hialurónico al 0,4% (p/v) y la composición de inyección preparada se carga en el recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ puede ser el 0,4%. La transmitancia (T_2) a 550 nm cuando se mide a un cuarto de punto del recipiente después de haberse dejado reposar durante 120 minutos en un estado en que la composición de inyección preparada se carga en el recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ puede ser el 78,71%.

Es decir, el tiempo de mantenimiento de suspensibilidad satisface $|T_2 - T_1| < 15\%$ porque el tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad se extiende añadiendo un segundo componente capaz de regular la viscosidad en la composición de inyección.

Además, en una forma de realización ejemplar de la presente invención, se puede proporcionar una composición de inyección para marcar una lesión que satisface la siguiente expresión matemática 2 cuando se mide a temperatura ambiente.

[Expresión matemática 2]

$$|F_2 - F_1| < 20 \text{ gf}$$

en donde F_1 representa una fuerza de deslizamiento medida al inicio de la inyección en un estado en que la composición de inyección preparada se carga en una jeringa con una aguja de 26G, y

F_2 representa una fuerza de deslizamiento medida al inicio de la inyección cuando se inyecta después de ser mantenida durante 120 minutos en un estado en que la composición de inyección preparada se carga en una jeringa con una aguja de 26G.

Aquí, la unidad “gf” de la fuerza de deslizamiento se refiere a la magnitud de la fuerza que se puede denominar fuerza gravitacional. Aquí, una fuerza gravitacional (g) representa 0,0098 N.

Además, la “fuerza de deslizamiento” se refiere a una fuerza de deslizamiento que se ejerce sobre un dedo cuando la composición se inyecta mediante una jeringa en un estado en que la composición se carga en una jeringa.

Mientras tanto, la aguja de calibre (G) 26 se puede referir a una jeringa con una aguja que tiene un diámetro interno de 0,241 mm.

Como un aspecto específico, la fuerza de deslizamiento medida según la expresión matemática 2 puede ser menor que o igual a 5 gf. Es decir, $|F_2 - F_1|$ puede ser menor que o igual a 5 gf.

En particular, un valor numérico pequeño para $|F_2 - F_1|$ indica una pequeña diferencia en la presión entre un punto inicial de inyección después de dejar reposar la composición de inyección durante un tiempo predeterminado y un punto intermedio de inyección, que indica que la suspensibilidad de la composición de inyección se mantiene incluso cuando la composición de inyección se deja reposar durante 120 minutos, en particular que la velocidad de sedimentación del complejo en la composición se ha ralentizado.

Además, F_2 se caracteriza por tener una fuerza de deslizamiento de 120 a 165 gf. Más específicamente, F_2 puede estar en un intervalo de 120 a 165 gf cuando la segunda composición se incluye del 0,2% (p/v) al 1% (p/v), basado en el peso total de la composición de inyección.

Es decir, la composición de inyección de la presente invención puede tener un efecto de dejar que se inyecte una cantidad predeterminada de un complejo porque el problema de la rápida sedimentación del complejo durante la preparación de la inyección se resuelve añadiendo una cantidad predeterminada del material viscoso biocompatible tal como ácido hialurónico o colágeno a la composición de inyección, y también se puede resolver el problema de inyectar una cantidad excesiva del complejo y el problema del complejo expandiéndose en los tejidos circundantes. Asimismo, la composición de inyección de la presente invención puede tener un efecto de reducir mucho la expansión del complejo mediante la adición de una cantidad predeterminada del material viscoso biocompatible tal como ácido hialurónico o colágeno a la composición de inyección cuando la misma cantidad de la composición de inyección se inyecta en varios tejidos tal como tejido muscular, tejido mamario, tejido subcutáneo, tejido de piel, y similares, comparado a cuando el material viscoso no se incluye. Incluso cuando la composición de inyección se inyecta rápidamente, la composición de inyección de la presente invención puede tener un efecto de reducir mucho la expansión del complejo, comparado a cuando el material viscoso no se incluye.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, la lesión puede ser una lesión cancerosa, pero la presente invención no está limitada a la misma.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, el cáncer puede ser un cáncer sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de piel, cáncer cervical, cáncer de pulmón, tumores cerebrales, tumores gastrointestinales, cáncer de hígado, sarcoma de tejidos blandos, linfoma, y una combinación de los mismos.

Según una forma de realización ejemplar de la presente invención, la composición de inyección según la presente invención se puede usar para determinar un tamaño y posición del tejido de lesión cancerosa durante la cirugía para eliminación del cáncer.

Asimismo, la presente invención se dirige a un método para proporcionar información sobre una posición de una lesión a la que se ha administrado la composición de inyección según la presente invención, que incluye:

determinar una posición de la lesión usando una señal de un ingrediente activo generada en el sujeto.

[Modo para la invención]

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a ejemplos y ejemplos experimentales de los mismos. Sin embargo, será aparente para los expertos en la materia que los siguientes ejemplos se dan solamente para describir la presente invención más completamente, y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención

<Ejemplo de preparación>

Ejemplo de preparación 1: Preparación de albúmina macroagregada (MAA)

Para preparar albúmina macroagregada (MAA), se mezclaron 10 ml de seroalbúmina humana (SK Plasma) al 2% diluida con un tampón acetato 0,1 M (pH 5,4, Sigma-Aldrich, Corea) con 50 mg de cloruro de estaño (Sigma-Aldrich, Corea), y la mezcla resultante se agitó fuertemente a temperatura ambiente durante 10 minutos, y después se hizo reaccionar mientras se agitaba a 70°C durante otros 20 minutos.

A continuación, para prevenir la coagulación adicional después de completar la reacción, un producto de reacción se puso en hielo para enfriar rápidamente.

Después, se añadieron 0,35 ml de seroalbúmina humana al 20% (70 mg en el caso de suero humano) al producto de reacción enfriado, y después se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de ello, un producto de reacción se dividió en viales de vidrio a contenidos de 1, 2, 4, y 8 mg con respecto a la MAA, y después se liofilizó para preparar kits de MAA liofilizada.

Los kits de MAA finalmente incluían la MAA liofilizada a contenidos de 1, 2, 4, y 8 mg.

Como se ha descrito anteriormente, se usó el tampón acetato durante un proceso de preparación cuando se preparó la MAA, y los kits de MAA liofilizada se usaron después de que los kits de MAA se disolvieran en agua para inyección o agua para inyección que incluía HA.

Ejemplo de preparación 2: Preparación de un marcador basado en MAA al que está unido verde de indocianina (ICG)

Ejemplo de preparación 2-1: Determinación de la proporción de mezcla de ICG y MAA

Para preparar un marcador basado en MAA que emite fluorescencia de infrarrojo cercano, verde de indocianina (ICG, Jeil Pharmaceutical Co., Ltd., Diagnogreen Injection) que emite fluorescencia de infrarrojo cercano se unió a la MAA preparada en el ejemplo 1 para preparar un complejo (ICG-MAA).

En este caso, para determinar la proporción de mezcla de ICG y MAA capaz de emitir la fluorescencia de infrarrojo cercano más fuerte, se hicieron reaccionar de 1,3 a 1,032 μM de ICG y de 0 a 11,5 mg/ml de MAA en varias proporciones para preparar los correspondientes complejos ICG-MAA.

Después, las intensidades de señal de fluorescencia de infrarrojo cercano emitidas de los complejos ICG-MAA preparados se midieron (tabla 1 y Fig. 2).

La figura 2 es un gráfico que ilustra un cambio en la intensidad de la señal de fluorescencia de infrarrojo cercano del complejo ICG-MAA según los cambios en las concentraciones de ICG y MAA.

[Tabla 1]

ICG (μM)	MAA (mg/ml)			
	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

Con respecto a la tabla 1 y la figura 2, se confirmó que ICG 25,8 μM tenía el mayor valor de intensidad de señal de fluorescencia de infrarrojo cercano cuando MAA no se trató, y que ICG 3,9 μM tenía el mayor valor de intensidad de señal de fluorescencia de infrarrojo cercano cuando se trataron 0,23 mg/ml de MAA.

Además, se puede ver que ICG 6,5 μM tenía el mayor valor de intensidad de señal de fluorescencia de infrarrojo cercano cuando se trataron 2,3 mg/ml de MAA, y que ICG 7,5 μM tenía el mayor valor de intensidad de señal de fluorescencia de infrarrojo cercano cuando se trataron 11,5 mg/ml de MAA.

Mientras tanto, puesto que las concentraciones de MAA e ICG variaban debido a la difusión *in vivo* cuando MAA e ICG se inyectaban *in vivo*, era imposible determinar las concentraciones exactas de MAA e ICG en el momento de inyección. Sin embargo, se confirmó mediante experimentos que los complejos tenían el mayor valor de fluorescencia cuando se inyectó ICG 6,5 μM con respecto a MAA 2 mg/ml.

Ejemplo de preparación 2-2: Preparación de un complejo ICG-MAA en el que ICG está unido

Se prepararon complejos ICG-MAA en los que las concentraciones de MAA eran 1, 2, 4, y 8 mg/ml. Las reacciones para preparar los complejos ICG-MAA se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Más específicamente, se añadieron 0,5 ml de ICG 13 μM a cada uno de los kits liofilizados de MAA de 1, 2, 4, y 8 mg, y se hicieron reaccionar mientras se agitaba suavemente durante aproximadamente un minuto. Después de ello, se añadieron 0,5 ml de agua destilada a cada uno de los kits liofilizados de MAA, y se agitó suavemente durante aproximadamente cinco minutos para preparar complejos ICG-MAA 6,5 μM que tenían diferentes concentraciones de MAA.

<Ejemplos>

Ejemplo 1: Preparación de ICG-MAA-HA

Se prepararon composiciones de inyección ICG-MAA-HA que incluían MAA a concentraciones 1, 2, 4, y 8 mg/ml, ICG 6,5 μM y ácido hialurónico (HA; Shandong Focuschem Biotech Co.) a una concentración del 0,5%.

Más específicamente, se añadieron 0,5 ml de ICG 13 μM respectivamente a los kits liofilizados de MAA de 1, 2, 4, y 8 mg, y se hicieron reaccionar mientras se agitaba suavemente durante aproximadamente un minuto. Después de ello, se añadieron al mismo 0,5 ml de cada uno de HA (1.448 kDa) al 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 2, 4, y 8% (p/v) disuelto de antemano, y después se mezcló homogéneamente mientras se agitaba fuertemente durante aproximadamente 5 minutos.

Como resultado, se prepararon un total de 32 composiciones de inyección ICG-MAA-HA que incluían HA a concentraciones del 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, y 4% (p/v), ICG a una concentración de 6,5 μM y MAA a concentraciones de 1, 2, 4, y 8 mg/ml.

Como referencia, se llevó a cabo un proceso de preparar ICG-MAA-HA a temperatura ambiente.

<Ejemplos experimentales>

Ejemplo experimental 1: Medida de las densidades de los complejos ICG-MAA

Las densidades de los complejos ICG-MAA se midieron.

Puesto que los complejos ICG-MAA estaban presentes en la forma realmente usada en una fase en solución acuosa, era difícil medir directamente las densidades de los complejos sin producir daño a las formas de los materiales biológicos, y similares. Por tanto, las densidades de los complejos ICG-MAA se midieron indirectamente con referencia a un cambio en la densidad según la concentración.

La densidad se midió usando el complejo ICG-MAA preparado que incluye MAA a una concentración de 2 mg/ml e ICG 6,5 μ M, y las densidades de ICG-MAA se midieron usando los complejos ICG-MAA a concentraciones de 20 mg/ml a 200 mg/ml (del 2 al 20% (p/v), como sigue.

Más específicamente, se echaron 20 ml de agua destilada en un recipiente transparente a temperatura ambiente, y el complejo ICG-MAA anteriormente mencionado se añadió al mismo para medir una densidad variable del agua destilada que incluía el complejo ICG-MAA. En particular, se midió la densidad variable según la concentración del complejo ICG-MAA.

Como referencia, se puede ver que, cuando el complejo ICG-MAA se añadió y disolvió en agua destilada, el agua destilada mostró suspensibilidad blanca.

La tabla 2 enumera las densidades con respecto a agua destilada que incluye los complejos ICG-MAA, que se resumen según la concentración de agua destilada que incluye los complejos ICG-MAA.

[Tabla 2]

Complejo ICG-MAA (% (p/v))	Densidad (g/ml)
20	1,0616
12	1,0395
10	1,0338
8	1,0283
6	1,0228
4	1,0177
2	1,0118

Con respecto a la tabla 2, se obtuvo una ecuación de regresión lineal mediante análisis de regresión lineal, y la densidad cuando alcanzó el 100% se midió por extrapolación ($0,2757 \times 100 + 1,0064 = 1,2821$).

Como resultado, se estimó que la densidad del complejo ICG-MAA era 1,2821 g/ml según la ecuación de regresión (Fig. 1).

Además, se puede ver que, cuando el agua destilada en la se disolvió el complejo ICG-MAA se comprobó después de 20 minutos, una suspensión blanca había sedimentado en el fondo del recipiente.

Como resultado, se juzgó que la densidad del complejo ICG-MAA era 1,2821 g/ml, que era mayor que la densidad (0,99821 g/ml) del agua destilada a temperatura ambiente.

Ejemplo experimental 2: Evaluación de la utilidad de la composición de invención

Ejemplo experimental 2-1: Utilidad de ICG-MAA-HA como composición de inyección 1

Para evaluar la utilidad de ICG-MAA-HA como una composición de inyección, se midió un tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad de ICG-MAA-HA según la concentración de HA. Como referencia, se usó MAA a una concentración de 2 mg/ml, y la solución de inyección de ICG-MAA-HA final tenía una característica de una suspensión de verde claro cuando MAA e ICG se disolvieron por completo.

Más específicamente, se midió el tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad después de la preparación de la solución de inyección de ICG-MAA-HA, y el tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad se midió según una concentración creciente de HA. Aquí, la suspensibilidad define un tiempo de mantenimiento de suspensibilidad como un punto de referencia de tiempo cuando una región de sedimentación y una región flotante se separan basado en transmitancia de luz del 20% con 500 nm.

Los resultados se enumeran en la tabla 2.

La tabla 2 enumera los tiempos de mantenimiento de suspensibilidad después de la preparación de la solución de inyección de ICG-MAA-HA según la concentración del solvente HA.

[Tabla 3]

Concentración (% (p/v)) del solvente HA	Tiempo de mantenimiento de suspensibilidad
0% (simple agua para inyección)	A los 10 minutos
0,1%	A los 30 minutos
0,2%	A las 2 horas
0,3%	A las 8 horas
0,4%	A las 14 horas
0,5%	A las 24 horas
* Un tiempo de disolución se acorta cuando la inyección se agita fuertemente usando un agitador mecánico, pero el tiempo de disolución no es constante según la potencia de agitación cuando la inyección se agita suavemente.	

Con respecto a la tabla 3, se puede ver que la composición de inyección a la que no se añadió HA tenía un tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad más corto que la composición a la que se añadió HA, y el tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad se alargó con una proporción creciente de HA añadido.

Mientras tanto, se confirmó que el tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad era menor de 30 minutos cuando se añadió HA al 0,1% a la composición de inyección, y que el tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad era mayor de 2 horas cuando la concentración de HA era mayor del 0,2% (p/v), y el tiempo de mantenimiento de la suspensibilidad era mayor de 8 horas cuando la concentración de HA era mayor del 0,3% (p/v).

Es decir, se juzgó que el complejo era realmente eficaz como una preparación inyectable cuando la concentración de HA era mayor del 0,2% (p/v).

La figura 3 muestra una imagen que ilustra una comparación entre dos tipos de MAA que tienen diferentes concentraciones de HA.

Más específicamente, como las imágenes de la inyección de ICG-MAA-HA así preparada fotografiada después de 30 minutos, la figura 3(A) es una imagen de MAA a la que se añade HA al 0,1%, y la figura 3(B) es una imagen de MAA a la que se añade HA al 0,5%.

Con respecto a la figura 3, se puede ver que la composición de inyección a la que se añadió HA al 0,1% sedimentó rápidamente, pero la composición de inyección a la que se añadió HA al 0,5% no sedimentó durante un tiempo largo. Es decir, se puede ver que puesto que ICG-MAA-HA en el que se añadió HA al 0,5% a ICG-MAA no sedimentó rápidamente durante la preparación de la inyección, puede ser muy útil como una composición de inyección, como se muestra en la figura 3.

Ejemplo experimental 2-2: Utilidad de ICG-MAA-Ha como composición de inyección 2

En el ejemplo experimental 2-2, las fuerzas de deslizamiento ejercidas en un dedo tras la inyección según la concentración de ácido hialurónico (HA) se midieron en varias condiciones, y se juzgó la utilidad de ICG-MAA-HA como una composición de inyección.

Más específicamente, cuando la solución de inyección finalmente preparada se usó como una inyección, se evaluó la facilidad de inyección usando jeringas desechables de 1 cc equipadas con agujas de 18G, 21G, 22G, 23G, y 26G.

Mientras tanto, para las características de la composición, las cargas aplicadas tras la inyección se examinaron usando una aguja de calibre 18 (diámetro interno de aguja: 0,838 mm), una aguja de 21G (diámetro interno de aguja: 0,495 mm), una aguja de 22G (diámetro interno de aguja: 0,394 mm), una aguja de 23G (diámetro interno de aguja: 0,318 mm), y una aguja de 26G (diámetro interno de aguja: 0,241 mm).

Además, se midió la resistencia (una fuerza ejercida en un dedo tras la inyección) usando un catéter endoscópico (7 Fr, longitud; 180 cm, MTW, Alemania) equipado con un tubo de conexión de 1,8 m de longitud.

Los resultados se enumeran en la siguiente tabla 4.

[Tabla 4]

gf	Jeringa	Agua	Ácido hialurónico (% {p/v})											
			0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00	2,00	3,00
26G	79	91	107,5	110,0	115,0	120,0	125,0	131,0	136,0	142,0	146,0	152,5	253,2	No inyectable
23G	82,6	81	97,5	100,0	102,0	104,0	107,0	112,0	120,0	128,0	132,0	138,0	240,6	No inyectable
22G	72,5	72,5	92,5	93,0	95,0	97,0	99,0	110,0	115,0	118,0	120,0	124,0	223,8	690,4
21G	67	72,5	87,5	93,0	90,0	91,0	92,5	97,0	102,0	105,0	110,0	114,0	220,5	650,2
18G	62	75	78	81,0	83,0	85,0	87,5	91,0	95,0	99,0	102,0	104,0	208,9	640,3
7 Fr		145	280	380	490	600	631	780	No inyectable	No inyectable	No inyectable	No inyectable	No inyectable	No inyectable

En general, cuando se usó una aguja de inyección usada para ensayos clínicos, se aplicó una fuerza de 60 a 140 gf durante la inyección. La aguja de inyección se usó sin dificultad debido a la baja resistencia durante las inyecciones hasta que la concentración de ácido hialurónico (HA) alcanzó el 1%.

5 Por otra parte, cuando se usó una aguja de catéter endoscópico (7Fr, 180 cm) en la que la resistencia aumentó debido a un largo tubo, se aplicó una fuerza de 140 gf en el caso de agua, y se aplicó una fuerza de 780 gf en el caso de HA a una concentración del 0,60% (p/v), indicando que la solución de inyección era inyectable con una presión notablemente alta.

10 Aunque esto puede ser diferentes para individuos, cuando se aplicó una fuerza de deslizamiento de 700 gf, era difícil inyectar la solución de inyección en tejidos, lo que hizo difícil inyectar de forma precisa la solución de inyección. Por otra parte, cuando se usó una aguja de catéter endoscópico (7Fr, 180 cm), se aplicó una fuerza de 780 gf cuando HA estaba presente a una concentración del 0,60%, indicando que la solución de inyección era inyectable con una presión notablemente alta. La solución de inyección no era inyectable a mano debido a la alta resistencia cuando la
15 concentración de HA era mayor del 0,70%.

Es decir, la solución de inyección era inyectable en condiciones de inyección generales hasta que la concentración de ácido hialurónico alcanzó el 1% (p/v), y la solución de inyección era inyectable a mano hasta que la concentración de ácido hialurónico alcanzó el 0,5% (p/v) en el caso de un catéter endoscópico de especialidad que tiene una aguja
20 larga, en que una jeringa se conectó a una aguja a través de un tubo.

Mientras tanto, se puede ver que cuando se usaron jeringas generales (de 26G a 18G) que entran en contacto directo con los tejidos, era deseable para inyectar suavemente la solución de inyección en los tejidos, es decir, una fuerza de menos de 200 gf se aplicó a las jeringas, y era posible inyectar la solución de inyección con una fuerza de menos de
25 200 gf hasta que la concentración de ácido hialurónico alcanzó el 1% (p/v).

Ejemplo experimental 3: Cambio en la presión de la jeringa según la precipitación de ICG-MAA-HA

30 Ejemplo experimental 3-3: Cambio en la presión de la jeringa según la precipitación de ICG-MAA-HA-1

En el ejemplo 3-3, se midieron la presión (A) aplicada a la jeringa cuando la composición de inyección a la que se añadió ácido hialurónico se inyectó inmediatamente después de la adición de HA y la presión (B) aplicada a la jeringa después de que la composición de inyección se dejara reposar durante 120 minutos de modo que la composición sedimentó, y se enumeran en la siguiente tabla.

35 En este caso, se usó la jeringa equipada con una aguja de 26G para medir una fuerza de deslizamiento de la jeringa.

Además, la unidad de la fuerza de deslizamiento es gf que representa la fuerza gravitacional (1 g = 0,0098 N).

40 [Tabla 5]

HA (%)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
A	91	107,5	110,0	115,0	120,0	125,0	131,0	136,0	142,0	146,0	152,5
B	400	310	125	126	130	140	144	152	160	155	165
B - A	309	202,5	15	11	10	15	13	16	18	9	12,5

Con respecto a la tabla 5, se puede ver que la presión (A) aplicada a la jeringa cuando la composición de inyección a la que se añadió ácido hialurónico se inyectó inmediatamente después de la adición de HA y la presión (B) aplicada a la jeringa después de que la composición de inyección se dejara reposar durante 120 minutos de modo que la
45 composición sedimentó aumentó al aumentar la concentración de ácido hialurónico.

Además, según aumentó la concentración de ácido hialurónico, no había gran diferencia entre la presión (B) aplicada a la jeringa después de que la composición de inyección se dejara reposar durante 120 minutos y la presión (A) aplicada a la jeringa cuando la composición de inyección se inyectó inmediatamente. Particularmente, desde cuando
50 la concentración de ácido hialurónico aumentó desde el 0,2% (p/v) al 1,0% (p/v), un valor medio B - A era 13,2778 gf, y la desviación estándar era 2,969755.

Ejemplo experimental 3-3: Cambio en la presión de la jeringa (fuerza de deslizamiento) según la precipitación de ICG-MAA-HA-2

55 En general, una presión aplicada a la jeringa con una aguja de 26G según la concentración de ácido hialurónico aumentó desde aproximadamente 20 gf (HA al 0,1%) a 70 gf (HA al 1,0%). La presión aplicada a la jeringa aumentó según una composición de inyección diferente de ácido hialurónico en la inyección. En un ejemplo, una fuerza de 15 gf se aplicó adicionalmente cuando MAA estaba presente a una concentración de 8 mg/ml.

60

Por tanto, en el ejemplo experimental 3-3, se midieron las presiones aplicadas a la jeringa cuando la composición de inyección a la que se añadió ácido hialurónico se inyectó inmediatamente después de la adición de ácido hialurónico y después de que la composición de inyección se dejara reposar durante 120 minutos para dejar que la composición sedimentara, y se enumeran en la siguiente tabla.

Como referencia, en la tabla 6, (A) enumera las presiones cuando la composición de inyección se inyectó inmediatamente, y (B) enumera las presiones al inicio de la inyección cuando la composición se dejó reposar durante 120 minutos. Asimismo, (C) enumera las presiones (fuerzas ejercidas en un dedo, es decir, fuerzas de deslizamiento) en un punto intermedio de la inyección después de que la composición de inyección se dejara reposar durante 120 minutos.

[Tabla 6]

HA (%)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	2,0	3,0
A	115	120	123	127,5	132,5	137,5	143,5	148,5	154,5	158,5	165	252	721
B	400	310	125	126	130	140	144	152	160	155	165	257	711
C	110	120	125	128	138	138	142	150	155	160	170	253	718

Con respecto a la tabla 6, se puede ver que, cuando no se añadió ácido hialurónico, la presión fue mayor de 400 gf cuando la inyección se empezó después de que la composición de inyección se dejara reposar durante 2 horas, indicando que la aguja de inyección estaba obstruida con la composición en la inyección.

Asimismo, la presión cayó a 120 gf según la aguja obstruida con la composición se abrió.

Cuando el ácido hialurónico estaba presente a una concentración del 0,2% (p/v) o más, la aguja de inyección no se obstruyó con la composición en la inyección incluso después de que la composición se dejara reposar durante 120 minutos, y por tanto la composición era inyectable con una pequeña fuerza (200 gf) como esa cuando la composición se inyectó inmediatamente.

Es decir, cuando se añadió ácido hialurónico en una cantidad apropiada (el 0,2% o más), la velocidad de precipitación podía ralentizarse, y la desventaja de tener que aplicar una fuerza excesiva al inicio de la inyección debido a que la aguja de inyección estaba obstruida con la composición que precipita se pudo resolver.

Mientras tanto, cuando la concentración de ácido hialurónico era mayor del 1% (p/v), la resistencia durante la inyección era alta debido a la viscosidad del ácido hialurónico.

Ejemplo experimental 3: Cambio en la transmitancia según la precipitación de ICG-MAA-HA

Se midió un cambio en la densidad óptica a lo largo del tiempo para la composición de inyección preparada en el ejemplo 1. Como referencia, se midió un cambio en la densidad óptica para una composición de inyección que incluye 2 mg/ml de MAA.

Además, se obtuvo la transmitancia midiendo la transmitancia de luz visible usando un espectrómetro de UV (TECAN. Infinite M200PRO).

Más específicamente, cuando se midió la transmitancia en un cuarto de punto de la altura de un recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$, usando un espectrómetro de UV, en un estado en el que la composición de inyección se cargó en el recipiente, se midió la transmitancia a 550 nm.

En este caso, T_1 representa la transmitancia (%) a 550 nm cuando se mide a un cuarto de punto de la altura de un recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ en un estado en el que la composición de inyección preparada se carga en el recipiente transparente, y T_2 representa la transmitancia (%) a 550 nm cuando se mide a un cuarto de punto de la altura de un recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ después de dejar reposar durante 120 minutos en un estado en el que la composición de inyección preparada se carga en el recipiente transparente.

[Tabla 7]

HA (%)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
T_1	77,76	78,76	78,53	78,61	78,78	78,65	78,48	78,18	77,97	77,69	77,65
T_2	87,88	87,95	78,71	78,77	78,65	78,71	78,56	78,20	78,11	78,81	77,73
$ T_2 - T_1 $	10,12	9,19	0,18	0,16	0,13	0,06	0,08	0,02	0,14	0,12	0,08

Con referencia a la tabla 7, se confirmó que, cuando se examinó el cambio en transmitancia según la precipitación de ICG-MAA-HA, la transmitancia medida al principio cuando el ácido hialurónico no se añadió era el 77,76% y la transmitancia aumentó al 87,88% cuando la composición de inyección se dejó reposar durante 120 minutos.

Esto era porque la composición de inyección primero se suspendió según se disolvió el ICG-MAA en la composición de inyección, y las partículas de ICG-MAA sedimentaron debido a la alta densidad después de 120 minutos, produciendo transmitancia aumentada en el un cuarto de punto del recipiente desde el fondo del mismo.

Además, cuando la concentración de ácido hialurónico (HA) era mayor que o igual al 0,4% (p/v), una diferencia entre la transmitancia (T_1) medida al principio y la transmitancia (T_2) medida después de que la composición de inyección se dejara reposar durante 120 minutos era insignificante a menos del 1%.

Esto indica que la suspensibilidad de la composición de inyección se mantenía constante durante el tiempo cuando el ICG-MAA-HA se incluía en la composición de inyección.

Como resultado, se puede ver que el complejo era capaz de prevenir la sedimentación rápidamente en la composición de inyección cuando la viscosidad del complejo ICG-MAA se controló añadiendo ácido hialurónico (HA) a la composición de inyección.

Mientras tanto, se puede ver que el complejo sedimentó a las 2 horas porque había una diferencia del 9,19% entre T_1 y T_2 cuando estaba presente ácido hialurónico a una concentración del 0,2% (p/v). Sin embargo, se juzgó que el complejo ICG-MAA se podría usar como una composición de inyección incluso cuando se añadía ácido hialurónico (HA) al 0,2% al complejo ICG-MAA porque el complejo ICG-MAA típicamente se administra a los 30 minutos cuando se prepara para uso como una composición de inyección.

Ejemplo experimental 4: Imagen de campo claro de ICG-MAA según la aplicación de HA

La figura 4 muestra una imagen de campo claro de soluciones de inyección de ICG-MAA-HA que incluyen HA al 0,5% (p/v), ICG 6,5 μ M, y 2, 4, y 8 mg/ml de MAA y soluciones de inyección de ICG-MAA que incluyen ICG 6,5 μ M, y 2, 4, y 8 mg/ml de MAA. Se visualizó una distribución de partículas de MAA usando un microscopio óptico con un hemocitómetro. Cada cuadrado representa un tamaño de 0,05 mm². Un panel superior (Fig. 4-1, 2 y 3) muestra ICG-MAA que no incluye HA, y un panel inferior (Fig. 4-4, 5, 6) muestra ICG-MAA-HA que incluye HA al 0,5% (p/v). Las concentraciones de MAA son como sigue: Fig. 4-1 y 4-4: 2 mg/ml; Fig. 4-2 y 4-5: 4 mg/ml; y Fig. 4-3 y 4-6: 8 mg/ml. En el panel superior, se obtuvo una imagen clara porque las partículas de MAA estaban en foco en un campo claro ya que todas las partículas de MAA habían sedimentado. Por otra parte, en el panel inferior, puesto que las partículas de MAA sedimentaron y flotaban en las soluciones de inyección, algunas partículas estaban en foco y se obtuvo una imagen clara de las partículas, y otras partículas no estaban en foco en la imagen.

Ejemplo experimental 5: Características de mantenimiento de fluorescencia en ICG-MAA-HA

La figura 5 muestra las señales de fluorescencia medidas para ICG-MAA-HA, a la que se añaden ICG 5 μ M y HA al 0,5%, a varias concentraciones de MAA. La figura 5A muestra una imagen de campo claro, y la figura 5B muestra una imagen de NIRF. Las concentraciones de MAA fueron 0 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, y 8 mg/ml, como se muestra de izquierda a derecha en las figuras 5A y 5B. La imagen de NIRF se obtuvo emitiendo luz del 17 LED NIR de 2 mA que tienen una longitud de onda pico a 740 nm. La imagen se fotografió y visualizó por software de visualización AVT UniCam (Allied Vision Technologies) según los siguientes ajustes de una cámara: tiempo de exposición 200 ms; ganancia: 200; valor de escala de grises diana: 125; y brillo: 16.

Puesto que la MAA presente en agua había sedimentado muy rápidamente en las paredes de tubos Eppendorf, los presentes inventores fotografiaron una imagen de campo claro, mezclaron los respectivos tubos, y después recolocaron los tubos. En este caso, se observaron pequeños cambios en las posiciones de los tubos entre las figuras 5A y 5B.

La figura 5C muestra los espectros de emisión de fluorescencia de ICG 5 μ M presente a varias concentraciones de MAA. La intensidad de fluorescencia relativa (u.a: unidad arbitraria) se obtuvo usando un lector de microplacas de fluorescencia controlado por ordenador (Safire II; Tecan, Durham, NC). La longitud de onda de excitación para ICG fue 760 nm, y la longitud de onda de emisión estaba en un intervalo de 790 a 850 nm.

Es decir, se puede ver que la fluorescencia se mantuvo para ICG-MAA-HA, como se muestra en las figuras 5A a 5C.

Ejemplo experimental 6: Resultados de inyectar ICG-MAA-HA en pechuga de pollo

La figura 6 muestra los resultados experimentales que ilustran una diferencia según la adición de HA al 0,5% (p/v). Asimismo, se determinó una diferencia en la resistencia de tejido usando una pechuga de pollo que tiene una resistencia tisular típica y una molleja de pollo que tiene una resistencia tisular compacta. Se inyectaron lentamente 50 μ l de cada uno de ICG-MAA-HA e ICG-MAA 5 veces en la pechuga de pollo y la molleja de pollo a una profundidad de 5 mm. Se obtuvo una imagen de NIRF emitiendo luz de 17 LED NIR de 2 mA que tienen una longitud de onda pico de 740 nm. La imagen se fotografió y visualizó por software de visualización AVT UniCam (Allied Vision Technologies) según los siguientes ajustes de una cámara: tiempo de exposición 195 ms; ganancia: 170; valor de escala de grises

diana: 125; y brillo: 16. Llevó aproximadamente de 2 a 3 minutos preparar e inyectar las inyecciones. Cuando se inyectó ICG-MAA dos de las cinco veces en la pechuga de pollo y se inyectó tres de cinco veces en la molleja de pollo, las partículas de ICG-MAA habían sedimentado y obstruido la aguja de inyección, lo que hizo difícil inyectar las soluciones de inyección. Cuando era difícil inyectar las soluciones de inyección, la jeringa se agitó, y las soluciones de inyección se inyectaron de nuevo en un tiempo corto. Por otra parte, ICG-MAA-HA se inyectó siempre suavemente en diez intentos.

Las figuras 6-1 y 6-2 son imágenes de NIRF fotografiadas antes y después de la incisión después de inyectar ICG-MAA-HA que incluye HA al 0,5% en la pechuga de pollo. Se puede ver que los marcadores estaban apropiadamente distribuidos. Las figuras 6-3 y 6-3 son imágenes de NIRF fotografiadas antes y después de la incisión después de inyectar ICG-MAA-HA que incluye HA al 0,5% en la molleja de pollo. Asimismo, se puede ver que los marcadores estaban apropiadamente distribuidos. Las figuras 6-5 y 6-6 son dos imágenes de NIRF fotografiadas después de que ICG-MAA sin incluir HA al 0,5% se inyectara en la pechuga de pollo. Se juzgó que los marcadores estaban apropiadamente distribuidos, como se muestra en la figura 6-5, pero se inyectó una pequeña cantidad de los marcadores porque las partículas de ICG-MAA habían sedimentado durante la inyección cuando se inyectó la misma cantidad total, como se muestra en la figura 6-6. Las figuras 6-7 y 6-8 son imágenes de NIRF fotografiadas después de que ICG-MAA sin incluir HA al 0,5% se inyectara en la molleja de pollo. ICG-MAA fluyó de vuelta a lo largo de una pista de inyección de modo que los marcadores no estaban apropiadamente distribuidos.

La figura 7 muestra una imagen de campo claro y NIRF de una sección de una pechuga de pollo cortada observada después de inyectar el complejo a lo largo de una ruta de la aguja de inyección. Se indica una región en la que se inyectó ICG-MAA-HA por un círculo blanco en la imagen de campo claro. La imagen de NIRF se obtuvo emitiendo luz de 17 LED NIR de 2 mA que tienen una longitud de onda pico de 740 nm. La imagen se fotografió y visualizó por software de visualización AVT UniCam (Allied Vision Technologies) según los siguientes ajustes de una cámara: tiempo de exposición 195 ms; ganancia: 170; valor de escala de grises diana: 125; y brillo: 16.

De los resultados, se puede ver que, cuando se inyectó ICG-MAA-HA en los tejidos (pechuga de pollo), las características de fluorescencia se mantuvieron bien, y la capacidad de expansión también era muy baja. Es decir, se puede ver que el problema del complejo ICG-MAA extendiéndose en los alrededores demasiado rápido y demasiado lejos se podía resolver usando ICG-MAA-HA.

Ejemplo experimental 7: Resultados de inyectar ICG-MAA-HA en pechuga de pollo usando un catéter endoscópico.

La figura 8 muestra el ensayo de la aplicabilidad de una mezcla ICG-MAA-HA en cirugía de cáncer gástrico usando un catéter endoscópico. Las figuras 8-1 a 8-3 y 8-5 muestran imágenes de campo claro, y las figuras 8-4 y 8-6 muestran imágenes de NIRF:

Fig. 8-1: una mezcla ICG-MAA-HA [ICG 6,5 μ M, MAA 2 mg/ml, y HA al 0,5% (p/v)] se inyectó en un lado de la pechuga de pollo usando un catéter endoscópico desechable;

Fig. 8-2: la mezcla se inyectó en un segundo sitio de la pechuga de pollo;

Fig. 8-3: dos flechas representan los sitios para inyecciones;

Fig. 8-4: muestra una imagen de NIRF de los sitios para inyecciones como los que revisten las paredes del estómago;

Fig. 8-5: muestra una imagen de una pechuga de pollo inyectada invertida;

Fig. 8-6: muestra una imagen de NIRF de los sitios para inyecciones en la pechuga de pollo invertida. En este caso, los sitios para inyecciones se pueden ver usando fuentes de NIR externas.

Las imágenes de NIRF se obtuvieron emitiendo luz de 17 LED NIR de 2 mA que tienen una longitud de onda pico de 740 nm. La imagen se fotografió y visualizó por software de visualización AVT UniCam (Allied Vision Technologies) según los siguientes ajustes de una cámara: tiempo de exposición 195 ms; ganancia: 170; valor de escala de grises diana: 125; y brillo: 16.

De los resultados, se puede ver que, cuando se inyectó ICG-MAA-HA en los tejidos (pechuga de pollo) usando un catéter endoscópico, las características de fluorescencia se mantuvieron bien, y la capacidad de expansión también era muy baja. Es decir, se puede ver que, incluso cuando se llevó a cabo la cirugía para cáncer gástrico como con la pechuga de pollo, se podía prevenir que el complejo ICG-MAA se extendiera a los alrededores demasiado rápido y demasiado lejos mientras se mantenían las características de fluorescencia usando ICG-MAA-HA.

Ejemplo experimental 8: Efecto de la concentración constante de ICG-MAA-HA

Para examinar un efecto de inyectar una cantidad predeterminada de la composición de inyección según un aumento en la velocidad de precipitación, cada una de la composición de inyección ICG-MAA a la que no se añadió ácido

hialurónico y la composición de inyección ICG-MAA-HA a la que se añadió HA al 0,1% (p/v) se inyectó secuencialmente a un tubo en una cantidad de 100 µl para medir una señal de fluorescencia.

5 Mientras tanto, las señales de fluorescencia se midieron después de inyectar la composición inyección en los tubos y precipitar durante 5 minutos.

Como referencia, cuando estaba presente la MAA a una concentración de 2 mg/ml, se añadió ICG 1,5 µM (aproximadamente 0,001 mg) a la composición de inyección ICG-MAA, y se añadió HA al 0,1% (p/v) a la composición de inyección ICG-MAA-HA

10 La figura 9 es un diagrama que muestra los resultados de medir señales de fluorescencia según la presencia/ausencia de ácido hialurónico (a una cantidad inicial de 100 µl desde la izquierda: (A) el ácido hialurónico no se añade, y (B) se añade ácido hialurónico al 0,1%).

15 Las imágenes de fluorescencia de infrarrojo cercano (NIRF) de la figura 9 se obtuvieron emitiendo luz de 17 LED NIR de 2 mA que tienen una longitud de onda pico de 740 nm. Las imágenes se fotografiaron y visualizaron por software de visualización AVT UniCam (Allied Vision Technologies) según los siguientes ajustes de una cámara: tiempo de exposición 200 ms; ganancia: 200; valor de escala de grises diana: 125; y brillo: 16.

20 Con respecto a la figura 9, el CV (desviación estándar/media) del volumen de la composición inyectada era el 28% en el caso de la composición de inyección a la que no se añadió ácido hialurónico.

25 En particular, cuando se compararon las intensidades de fluorescencia como se muestra en la figura 9(A), hubo una gran diferencia en las intensidades de fluorescencia entre la izquierda y la derecha. De los resultados, se juzgó que una gran cantidad de ICG-MAA se inyectó al principio, pero una cantidad decreciente de ICG-MAA se inyectó después de ello, indicando que la cantidad predeterminada de ICG-MAA no se inyectó.

30 Por otra parte, con respecto a la figura 9(B), se puede ver que, cuando se añadió ácido hialurónico a la composición de inyección, la sedimentación de ICG-MAA se había ralentizado, permitiendo de esta manera que se inyectara la cantidad predeterminada de ICG-MAA.

35 La presente invención se ha descrito en detalle. Sin embargo, los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención deben entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, mientras indican formas de realización preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de inyección para marcar una lesión, que comprende:

una primera composición que comprende un complejo que contiene un ingrediente activo y que tiene una densidad media de 1,1 a 1,4 g/ml, el ingrediente activo es un colorante para teñir tejidos biológicos, un isótopo radioactivo o una combinación de los mismos unido a albúmina macroagregada (MAA); y

una segunda composición que es ácido hialurónico (HA), el HA tiene un peso molecular medio de 0,5 a 3,0 MDa, en donde el HA se incluye del 0,2 al 1% (p/v) con respecto a la cantidad total de la composición de inyección.

2. La composición de inyección de la reivindicación 1, en donde la composición de inyección satisface la siguiente expresión matemática 1 cuando se mide a temperatura ambiente:

[Expresión matemática 1]

$$|T_2 - T_1| < 15\%$$

en donde T_1 representa la transmitancia (%) a 550 nm cuando se mide a un cuarto de punto de la altura de un recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ en un estado en que la composición de inyección preparada se carga en el recipiente transparente, y

T_2 representa la transmitancia (%) a 550 nm cuando se mide a un cuarto de punto de la altura de un recipiente transparente que tiene un tamaño de $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ después de haberse dejado reposar durante 120 minutos en un estado en que la composición de inyección preparada se carga en el recipiente transparente.

3. La composición de inyección de la reivindicación 1, en donde la composición de inyección satisface la siguiente expresión matemática 2 cuando se mide a temperatura ambiente:

[Expresión matemática 2]

$$|F_2 - F_1| < 20 \text{ gf}$$

en donde F_1 representa una fuerza de deslizamiento medida al inicio de la inyección en un estado en el que la composición de inyección preparada se carga en una jeringa con una aguja de 26G, y

F_2 representa una fuerza de deslizamiento medida al inicio de la inyección cuando se inyecta después de dejarla reposar durante 120 minutos en un estado en que la composición de inyección preparada se carga en una jeringa con una aguja de 26G.

4. La composición de inyección de la reivindicación 3, en donde la fuerza de deslizamiento medida según la expresión matemática 2 es menor que o igual a 15 gf.

5. La composición de inyección de la reivindicación 3, en donde la F_2 tiene una fuerza de deslizamiento de 120 a 165 gf.

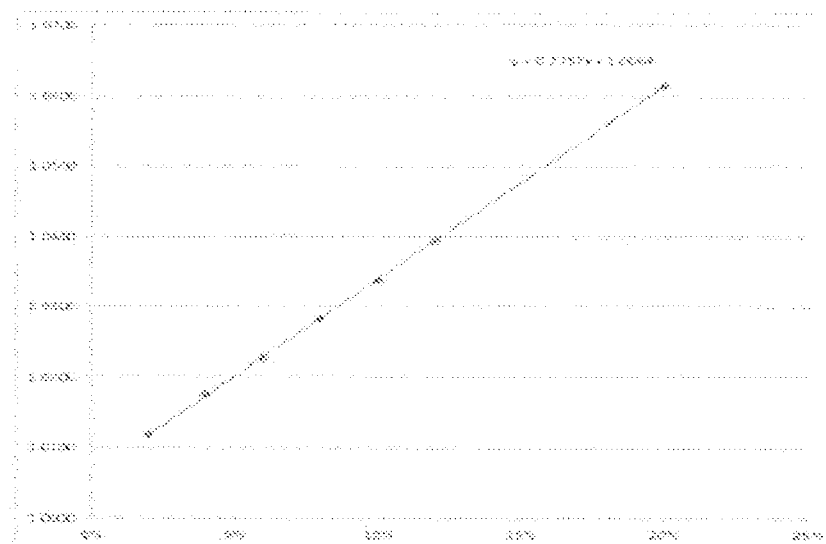
6. La composición de inyección de la reivindicación 1, en donde el colorante para teñir tejidos biológicos es un colorante visualmente detectable o un colorante fluorescente, y

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, P-32, Cr-51, Ca-45, Ca-68, y una combinación de los mismos.

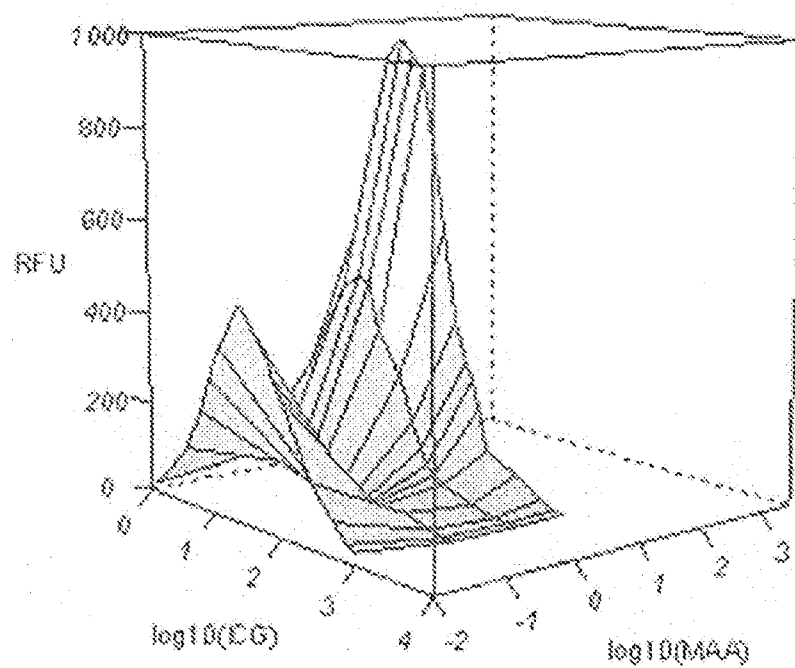
7. Un método para proporcionar información en una posición de una lesión a la que la composición de inyección de la reivindicación 1 se ha administrado, que comprende:

determinar la posición de la lesión mediante una señal de un ingrediente activo generada en el sujeto.

【Figura 1】



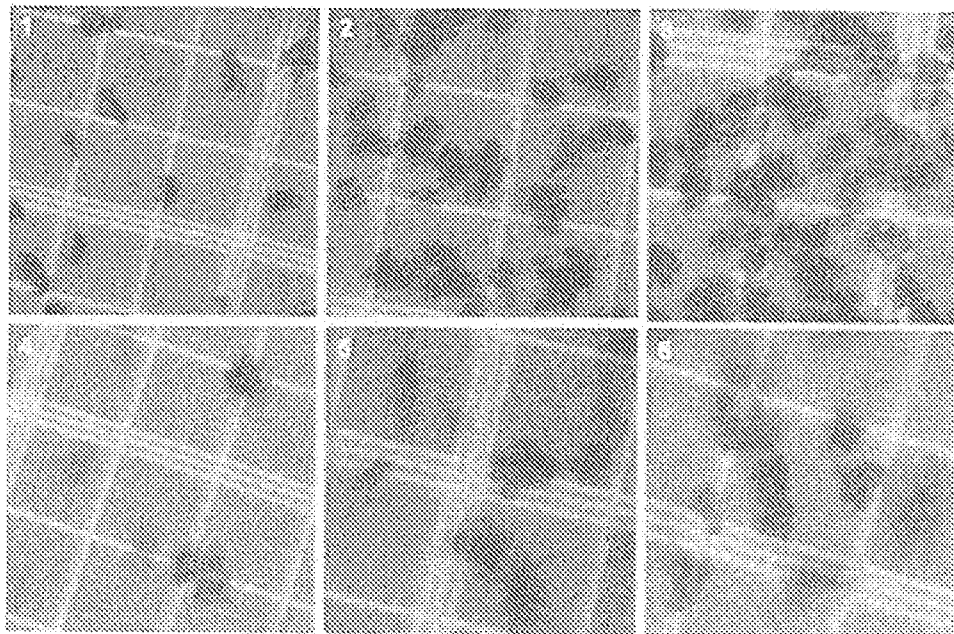
【Figura 2】



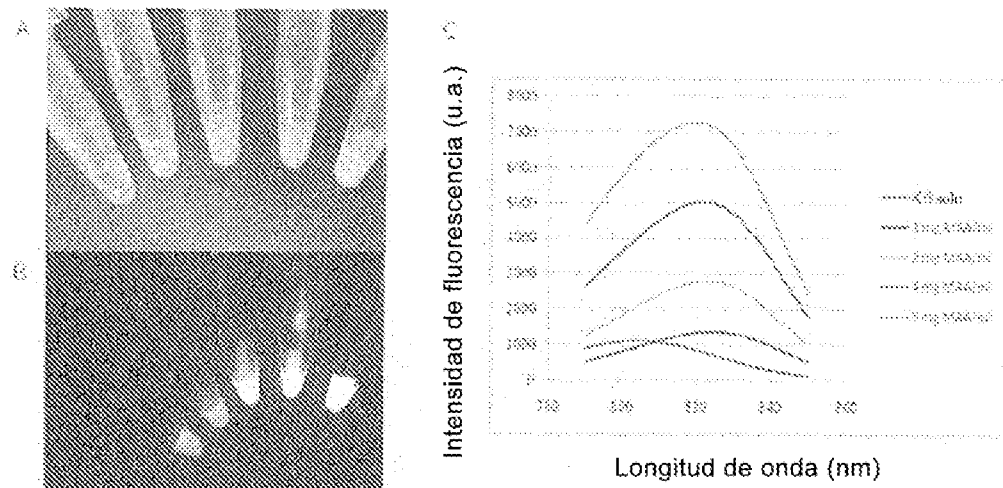
【Figura 3】



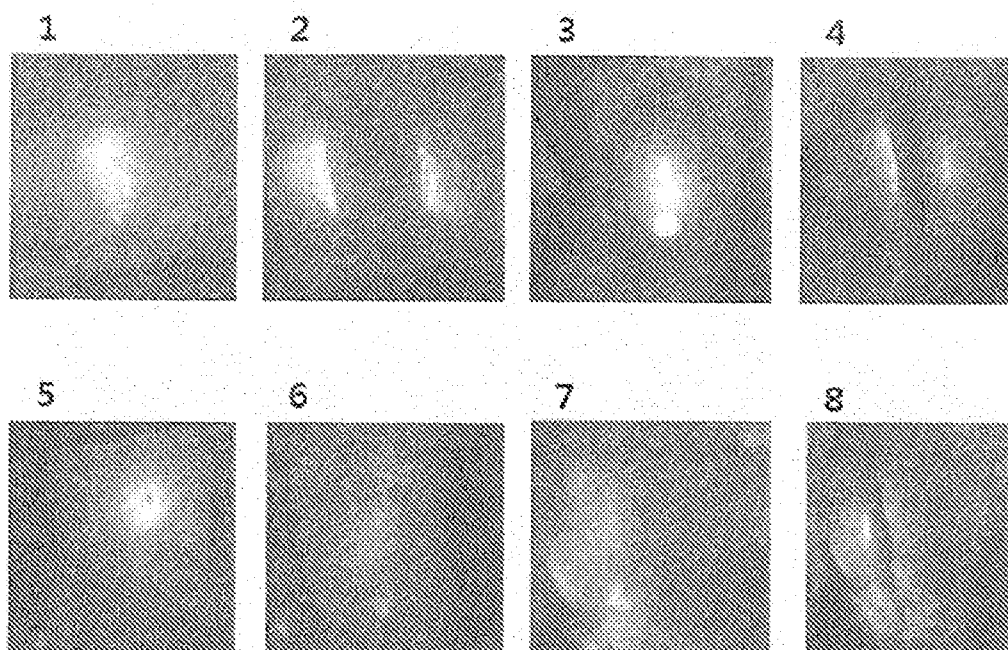
【Figura 4】



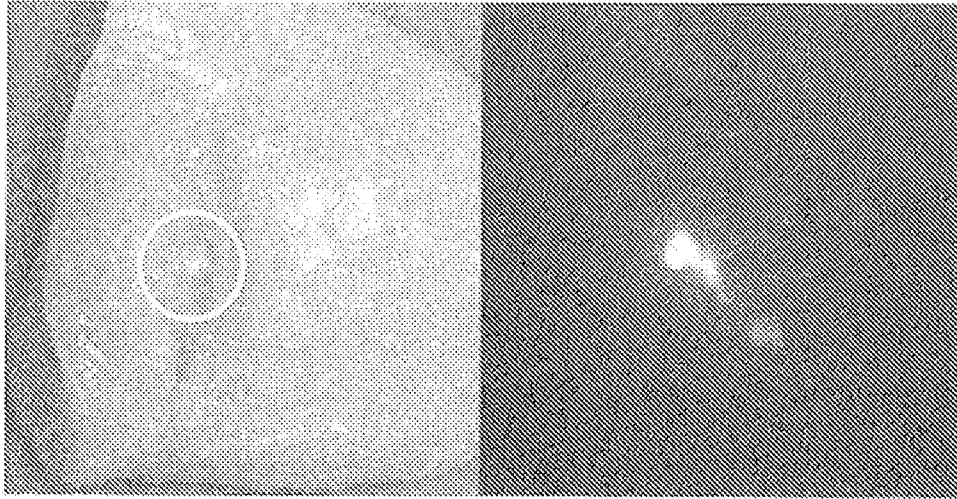
【Figura 5】



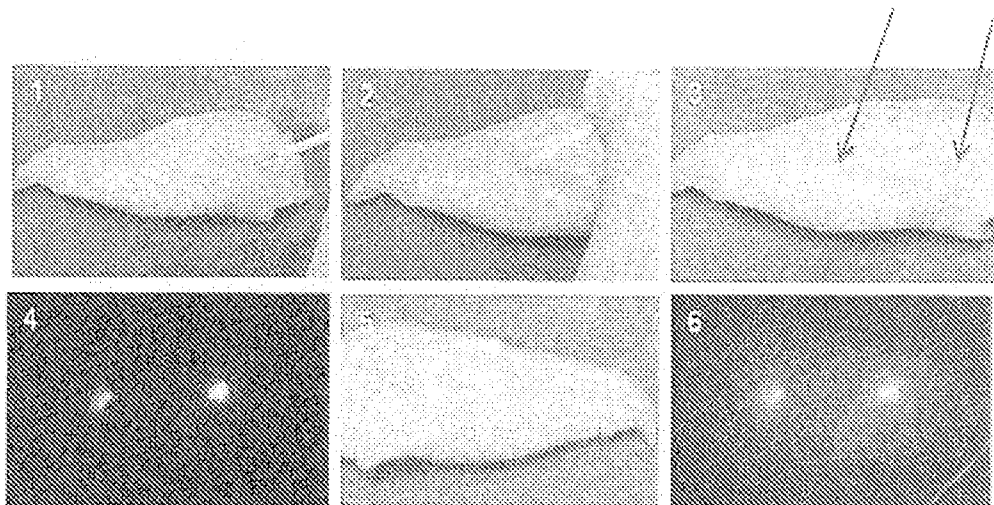
【Figura 6】



【Figura 7】



【Figura 8】



【Figura 9】

