

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 358**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61J 1/00 (2013.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2016** **E 20172729 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 3777978**

54 Título: **Conjugados de colorante de ftalocianina y su almacenamiento**

30 Prioridad:

18.08.2015 US 201562206774 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.02.2025

73 Titular/es:

RAKUTEN MEDICAL, INC. (100.00%)
11080 Roselle Street
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

MAKINGS, LEWIS, R.;
HEIM, ROGER;
GARCIA-GUZMAN, MIGUEL;
CHIN, EILEEN, SUN;
YADAV, DEEPAK y
FONG, JERRY

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 999 358 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugados de colorante de ftalocianina y su almacenamiento

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere en algunos aspectos a composiciones y artículos manufacturados que contienen conjugados de colorante de ftalocianina estables y a las composiciones para su uso en métodos de fotoinmunoterapia, que comprenden específicamente el tratamiento de una hiperplasia o un tumor en un sujeto humano. Los conjugados de colorante de ftalocianina son conjugados que contienen un colorante de ftalocianina unido a una molécula de direccionamiento que se une a una molécula diana de la superficie celular de una célula o patógeno, tal como un anticuerpo.

15 **Antecedentes**

Hay varias terapias disponibles para tratar enfermedades, tales como un cáncer. Por ejemplo, la fotoinmunoterapia (PIT, del inglés "photoimmunotherapy") es un método que utiliza un fotosensibilizador conjugado con un anticuerpo u otra molécula de direccionamiento para dirigirse a una molécula diana de la superficie celular, por ejemplo, un receptor de la superficie celular, para permitir la destrucción dirigida de células específicas. En algunos casos, la PIT puede dirigirse de manera selectiva a células enfermas, tales como células tumorales, y de ese modo destruyen de manera selectiva dichas células sin dañar las células sanas. Se necesitan estrategias mejoradas para mejorar los conjugados de colorante de ftalocianina para su uso en dichos métodos, por ejemplo, estrategias que minimizan o evitan la fotodegradación y mejoran la actividad del conjugado cuando se utiliza para PIT. Se proporcionan métodos y conjugados que satisfacen dichas necesidades.

Maawy *et al.* en PLoS ONE 10(3):e0121989 doi:10.1371/journal.pone.0121989 informan que la fotoinmunoterapia en el infrarrojo cercano con anti-CEA-IR700 da como resultado la lisis tumoral y una disminución de la carga tumoral en modelos de cáncer de páncreas en ratones ortotópicos. El documento US 2014/120119 se refiere a métodos de destrucción celular, que incluyen poner en contacto una célula que tiene una proteína de superficie celular con una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de anticuerpo-IR700, en donde el anticuerpo se une específicamente a la proteína de superficie celular, tal como un antígeno específico de tumor en la superficie de una célula tumoral, y en el que la célula también se pone en contacto con uno o más agentes terapéuticos (tal como un agente anticanceroso).

35 **Sumario**

La invención actualmente reivindicada es como se define en el conjunto de reivindicación adjunto.

En el presente documento se proporciona una descripción de la presente invención, así como una descripción de otros temas que son útiles para el contexto y la comprensión completa de la presente invención. Además, cabe señalar que cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente divulgación para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

En el presente documento se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un método de fabricación de un conjugado de colorante de ftalocianina. En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto una molécula de direccionamiento, tal como una macromolécula, con un colorante de ftalocianina, que en algunos casos contiene un grupo químico reactivo, en condiciones para producir un conjugado que contenga el colorante de ftalocianina unido, tal como unido de manera covalente, a la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el método incluye formular el conjugado en un tampón farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, antes, durante y/o después de la preparación del conjugado, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una longitud de onda dentro de un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm. En algunas realizaciones, antes, durante y/o después de la preparación del conjugado, tal como durante las etapas de puesta en contacto y/o de formulación, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una intensidad inferior a 500 lux.

En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto una molécula de direccionamiento con un colorante de ftalocianina en una relación molar de colorante a molécula de direccionamiento de o de aproximadamente 1:1 a 1000:1. En algunas realizaciones, el colorante incluye un grupo químico reactivo, en condiciones para producir un conjugado que contiene el colorante de ftalocianina unido de manera covalente a un grupo de unión de la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el método incluye formular el conjugado en un tampón farmacéuticamente aceptable a una concentración de o de aproximadamente 0,01 mg/ml a 1000,0 mg/ml. En algunas realizaciones, antes, durante y/o después de la preparación del conjugado, tal como durante las etapas de puesta en contacto y/o de formulación, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una intensidad inferior a 500 lux.

En algunas realizaciones, el conjugado se formula a una concentración de o de aproximadamente 0,01 mg/ml a

aproximadamente 200,0 mg/ml o de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el conjugado se formula a una concentración de o desde aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 5,0 mg/ml.

- 5 En algunas realizaciones, antes de la etapa de puesta en contacto, el colorante de ftalocianina se disuelve en un disolvente en condiciones en las que la única luz a la que se expone el colorante tiene una longitud de onda dentro de un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el colorante durante o después de su disolución en disolvente tiene una intensidad inferior a 500 lux. En algunas realizaciones, el colorante se disuelve en el disolvente hasta una concentración en un intervalo de o de
- 10 aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunas realizaciones, el colorante se disuelve en el disolvente a una concentración de o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del colorante de ftalocianina en el disolvente es aproximadamente 10 mg/ml. En algunas realizaciones, el disolvente es dimetilsulfóxido (DMSO) o DMF y disolventes a base de agua.

- 15 En algunas realizaciones, la etapa de formulación incluye concentrar el conjugado.

- En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo durante al menos 5 minutos, al menos 15 minutos, al menos 30 minutos, al menos 60 minutos, al menos 90 minutos, al menos 120 minutos, al menos 240 minutos, al menos 360 minutos, al menos 24 horas, al menos 72 horas o al menos 120 horas. En algunas
- 20 realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo durante 5 minutos a 150 horas, 5 minutos a 100 horas, 5 minutos a 48 horas, 5 minutos a 24 horas, 5 minutos a 6 horas, 5 minutos a 2 horas, 5 minutos a 90 minutos, 5 minutos a 60 minutos, 5 minutos a 30 minutos, 30 minutos a 150 horas, 30 minutos a 100 horas, 30 minutos a 48 horas, 30 minutos a 24 horas, 30 minutos a 6 horas, 30 minutos a 2 horas, 30 minutos a 90 minutos, 30 minutos a 60 minutos, 60 minutos a 150 horas, 60 minutos a 100 horas, 60 minutos a 48 horas, 60 minutos a 24 horas,
- 25 60 minutos a 6 horas, 60 minutos a 2 horas, 60 minutos a 90 minutos, 90 minutos a 150 horas, 90 minutos a 100 horas, 90 minutos a 48 horas, 90 minutos a 24 horas, 90 minutos a 6 horas, 90 minutos a 2 horas, 2 horas a 150 horas, 2 horas a 100 horas, 2 horas a 48 horas, 2 horas a 24 horas, 2 horas a 6 horas, 6 horas a 150 horas, 6 horas a 100 horas, 6 horas a 48 horas, 6 horas a 24 horas, 24 horas a 150 horas, 24 horas a 100 horas, 24 horas a 48 horas, 48 horas a 150 horas, 48 horas a 100 horas o 100 horas a 150 horas. En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo a una temperatura entre o entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 37 °C. En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente
- 30 25 °C ± 2,0 °C, 25 °C ± 1,0 °C o 25 °C ± 0,3 °C.

- En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina está unido de manera covalente o no covalente a la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina contiene un grupo químico reactivo y al poner en contacto el colorante de ftalocianina y la molécula de direccionamiento se produce un conjugado que comprende el colorante de ftalocianina unido de manera covalente a un grupo de unión de la molécula de direccionamiento.
- 35

- En algunas realizaciones, el método incluye además desactivar el conjugado, tal como para eliminar el colorante no conjugado. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de desactivación tiene una longitud de onda dentro de un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de desactivación tiene una intensidad inferior a 500 lux.
- 40

- En algunas realizaciones, la etapa de formulación incluye ultrafiltración, diafiltración o diálisis. En algunas realizaciones, el método incluye además la filtración estéril del conjugado.
- 45

- En algunas realizaciones, el método incluye envasar el conjugado, tal como en uno o más recipientes protegidos de la luz. En algunas realizaciones, durante la etapa de envasado, la única luz a la que se expone el conjugado tiene una longitud de onda dentro de un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm. En algunas realizaciones, durante la etapa de envasado, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una intensidad inferior a 500 lux.
- 50

- En algunas realizaciones, los métodos incluyen disolver un colorante de ftalocianina, que, en algunos casos contiene un grupo químico reactivo, en un disolvente a una concentración de aproximadamente 0,1 a 100 mg/ml. En algunas realizaciones, el método incluye además poner en contacto una molécula de direccionamiento con el colorante de ftalocianina en una relación molar de colorante a molécula de direccionamiento de 1:1 a 1000:1, en condiciones para producir un conjugado que contenga el colorante de ftalocianina unido, por ejemplo, unido de manera covalente, a la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el método incluye además formular el conjugado en un
- 55 tampón farmacéuticamente aceptable a una concentración de o de aproximadamente 0,01 a 1000,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el método incluye además envasar el conjugado en uno o más recipientes protegidos de la luz. En algunas realizaciones, antes, durante y/o después de las etapas del método, tal como las etapas de disolución, puesta en contacto, formulación y envasado, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una longitud de onda dentro de un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm o la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una intensidad inferior a 500 lux.
- 60
- 65

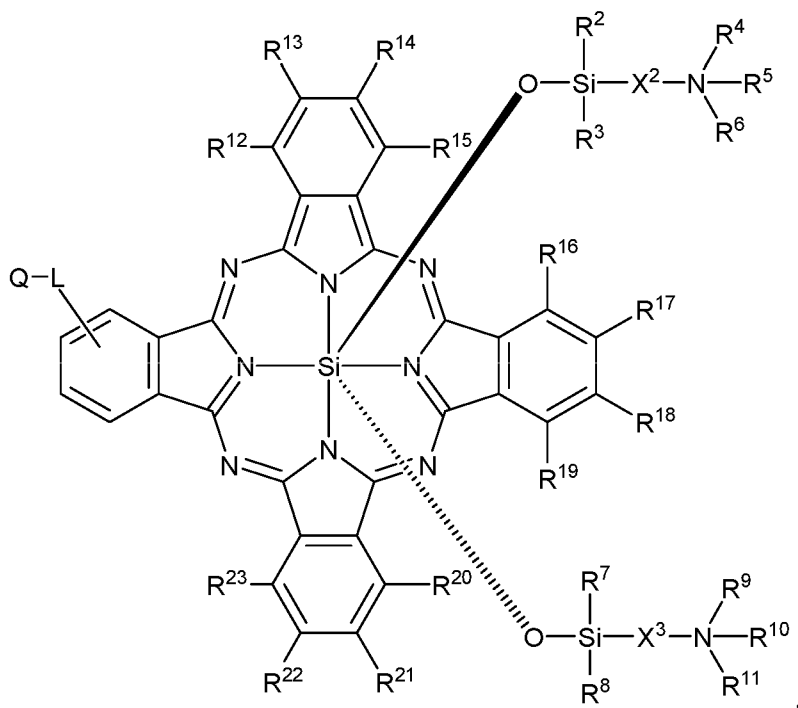
En el presente documento se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un método de fabricación de un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento, que comprende: a) disolver un colorante de ftalocianina en un disolvente a una concentración de aproximadamente 0,1 a 100 mg/ml; b) poner en contacto una molécula de direccionamiento con el colorante de ftalocianina en una relación molar de colorante a molécula de direccionamiento de 1:1 a 1000:1 en condiciones para producir un conjugado que comprende el colorante de ftalocianina unido a la molécula de direccionamiento; c) formular el conjugado en un tampón farmacéuticamente aceptable a una concentración de o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 200,0 mg/ml; y d) envasar el conjugado en uno o más recipientes protegidos de la luz, en donde en cada una de las etapas a) a d): la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una longitud de onda dentro de un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm o la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una intensidad inferior a 500 lux.

En algunas de estas realizaciones, el colorante de ftalocianina está unido de manera covalente o no covalente a la molécula de direccionamiento. En algunas de estas realizaciones, el colorante de ftalocianina incluye un grupo químico reactivo y al poner en contacto el colorante de ftalocianina y la molécula de direccionamiento se produce un conjugado que comprende el colorante de ftalocianina unido de manera covalente a un grupo de unión de la molécula de direccionamiento.

En algunas realizaciones, durante las etapas de los métodos proporcionados, la exposición total del colorante y del conjugado a cualquier luz no es más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas. En algunas realizaciones, durante la etapa de envasado del método proporcionado, la exposición total del conjugado a cualquier luz no es más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas.

En algunas realizaciones, el colorante tiene una longitud de onda de absorción máxima de o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 850 nm. En algunas realizaciones, el colorante tiene una longitud de onda de absorción máxima de o de aproximadamente 650 nm a aproximadamente 850 nm. En algunas realizaciones, el colorante tiene una longitud de onda de absorción máxima de o de aproximadamente 680 nm a aproximadamente 850 nm.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina contiene la fórmula:



en donde:

L es un enlazador;

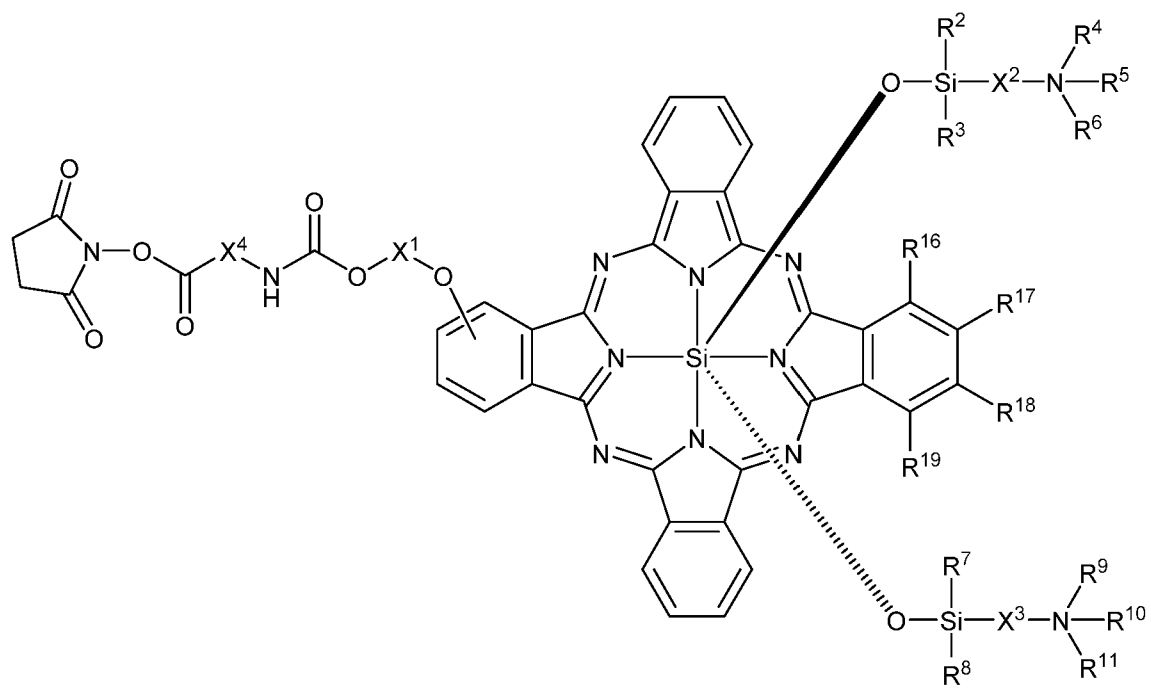
Q es un grupo reactivo para la unión del colorante a la molécula de direccionamiento;

R², R³, R⁷ y R⁸ cada uno se selecciona de manera independiente de entre alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido;

R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, alquilo

opcionalmente sustituido, alcanoilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilo opcionalmente sustituido, alquilcarbamoilo opcionalmente sustituido y un ligando quelante, en donde al menos uno de R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} comprende un grupo soluble en agua; R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} y R^{23} cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, halógeno, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido y alcoxi opcionalmente sustituido; y X^2 y X^3 son cada uno de manera independiente alquilenos C_1-C_{10} , opcionalmente interrumpido por un heteroátomo.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina incluye la fórmula:



en donde:

X^1 y X^4 son cada uno de manera independiente un alquilenos C_1-C_{10} opcionalmente interrumpido por un heteroátomo; R^2 , R^3 , R^7 y R^8 cada uno se selecciona de manera independiente entre alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido; R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcanoilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilo opcionalmente sustituido, alquilcarbamoilo opcionalmente sustituido y un ligando quelante, en donde al menos uno de R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} comprende un grupo soluble en agua; y R^{16} , R^{17} , R^{18} y R^{19} cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, halógeno, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido y alcoxi opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, el grupo reactivo se selecciona de entre un grupo químico reactivo con amina, un grupo químico reactivo con sulfhidrilo, un éster activado, un haluro de acilo, un haluro de alquilo, un anhídrido, un ácido carboxílico, una carbodiimida, un carbonato, un carbamato, una haloacetamida, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un éster de NHS, una fosoramidita, un complejo de platino, un éster sulfonato y un tiocianato. En algunas realizaciones, el grupo químico reactivo es un grupo químico reactivo con sulfhidrilo seleccionado de entre maleimidas, haloacetilos y piridil disulfuros. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina se une de manera covalente a un resto de lisina de la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el grupo reactivo es un grupo químico reactivo con amina. En algunas realizaciones, el grupo químico reactivo es un grupo químico reactivo con amina que es un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS).

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina es IRDye 700DX-NHS (IR700-NHS).

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une a un antígeno o proteína de manera directa o indirecta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una segunda molécula de unión que se une a una primera molécula de unión, siendo dicha primera molécula de unión capaz de unirse al antígeno o proteína. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo secundario.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une a una molécula diana de la superficie celular en la superficie de una célula o patógeno, tal como una célula madre, una célula proliferativa, una célula cancerosa, una célula en una hiperplasia, una célula tumoral, una célula inflamatoria, una neurona, un patógeno o una célula infectada por patógenos. En algunas realizaciones, el patógeno se selecciona de entre virus, bacterias, hongos, biopelículas y otros sistemas de células procariotas. En algunas realizaciones, la célula es una célula cancerosa, una célula tumoral, una célula inflamatoria o una neurona. En algunas realizaciones, la célula está presente en el microambiente de una lesión asociada con una enfermedad o afección. En algunas realizaciones, la lesión es un tumor y la célula es una célula cancerosa o una célula tumoral. En algunas realizaciones, la célula es una célula madre cancerosa o una célula tumoral circulante.

En algunas de dichas realizaciones, la célula inflamatoria es un leucocito tal como un neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, un linfocito o un monocito. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una neurona, tal como una neurona del sistema nervioso periférico o una neurona del sistema nervioso central. En algunas realizaciones, la neurona es un nociceptor tal como un nociceptor, un nociceptor mecánico, un nociceptor químico o un nociceptor polimodal. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une a un patógeno, tal como un virus, bacteria, hongo, biopelícula u otro sistema de células procariotas. En algunas realizaciones, el patógeno es una bacteria gramnegativa o grampositiva.

En algunas realizaciones, la molécula diana de la superficie celular incluye un antígeno, un polipéptido, un lípido o un hidrato de carbono o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la molécula diana de la superficie celular se selecciona de entre los fosfolípidos de la membrana celular, peptidoglucanos procarióticos, proteínas de la envoltura de células bacterianas, proteínas de la cápside vírica, ACTHR, célula endotelial Anxa-1, aminopetidasa N, anti-IL-6R, integrina α -4, integrina α -5- β -3, integrina α -5- β -5, α -fetoproteína (AFP), ANPA, ANPB, APA, APN, APP, 1AR, 2AR, AT1, B1, B2, BAGE1, BAGE2, receptor de linfocitos B BB1, BB2, BB4, receptor de calcitonina, antígeno de cáncer 125 (CA 125), CCK1, CCK2, CD5, CD10, CD11a, CD13, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD45, CD52, CD56, CD68, CD90, CD133, CD7, CD15, CD34, CD44, CD206, CD271, CEA (antígeno carcinoembrionario), CGRP, receptores de quimiocina, anexina-1 de la superficie celular, plectina-1 de la superficie celular, cripto-1, CRLR, CXCR2, CXCR4, DCC, DLL3, glucoproteína E2, EGFR, EGFRvIII, EMR1, endosialina, EP2, EP4, EpCAM, EphA2, receptores de ET, fibronectina, fibronectina ED-B, FGFR, receptores de Frizzled, GAGE1, GAGE2, GAGE3, GAGE4, GAGE5, GAGE6, receptor GLP-1, receptores acoplados a la proteína g de la familia A (similares a la rodopsina), receptores acoplados a la proteína g de la familia B (similares al receptor de secretina), receptores acoplados a la proteína g de la familia C (similar al receptor metabotrópico de glutamato), GD2, GP100, GP120, glipicano-3, hemaglutinina, sulfatos de heparina, HER1, HER2, HER3, HER4, HMFG, antígenos de HPV 16/18 y E6/E7, hTERT, un receptor de interleucina (*por ejemplo*, IL-2R, IL11-R, IL-13R) ITGAM, calecreína-9, Lewis Y, receptor de LH, LHRH-R, LPA1, MAC-1, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MART1, MC1R, mesotelina, MUC1, MUC16, Neu (nucleolina de la superficie celular), neprilisa, neuropilina-1, neuropilina-2, NG2, NK1, NK2, NK3, NMB-R, Notch-1, NY-ESO-1, OT-R, mutante p53, antígeno de melanoma p97, NTR2, NTR3, p32 (p32/gC1q-R/HABP1), p75, PAC1, PAR1, Patched (PTCH), PDGFR, receptores de PDEG, PDT, colágeno IV escindido por proteasa, proteinasa 3, prohibitina, proteína tirosina cinasa 7, PSA, PSMA, familia P2X purinérgica (*por ejemplo*, P2X1-5), mutante Ras, RAMP1, RAMP2, RAMP3 parcheado, receptor de RET, plexinas, smoothened, sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4, sst5, sustancia P, TEMs, receptor CD3 de linfocitos T, TAG72, TGFB1, TGFB2, Tie-1, Tie-2, Trk-A, Trk-B, Trk-C, TR1, TRPA, TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP (*por ejemplo*, TRPV1-6, TRPA1, TRPC1-7, TRPM1-8, TRPP1-5, TRPML1-3), receptor de TSH, receptores de VEGF (VEGFR1 o Flt-1, VEGFR2 o FLK-1/KDR, y VEGF-3 o FLT-4), canales iónicos dependientes de voltaje, VPAC1, VPAC2, tumor 1 de Wilms, Y1, Y2, Y4 y Y5.

En algunas realizaciones, la molécula diana de la superficie celular se selecciona de entre HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (receptor de IL-2R α), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, antígeno de cáncer 125 (CA125), α -fetoproteína (AFP), Lewis Y, TAG72, caprina-1, mesotelina, receptor de PDGF, PD-1, PD-L1, CTLA-4, receptor IL-2, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, glipicano-3, gpA33, mucinas, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, gangliósidos (tales como GD2, GD3, GM1 y GM2), receptor de VEGF (VEGFR), VEGFR2, VEGF-A, integrina α V β 3, integrina α 5 β 1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, tenascina, AFP, complejo BCR, CD3, CD18, CD44, CTLA-4, gp72, HLA-DR 10 β , antígeno HLA-DR, IgE, MUC-1, nuC242, antígeno PEM, metaloproteinasas, receptor de efrina, ligandos de efrina, receptor de HGF, CXCR4, CXCR4, receptor de bombesina, antígeno SK-1, Bcr-abl, RET, MET, TRKB, TIE2, ALK, ROS, EML4-ALK, ROS1, BRAFV600E, SRC, c-KIT, PDGFR, mTOR, TSC1, TSC2, BTK, KIT, BRCA, CDK 4/6, JAK1, JAK2, BRAF, FLT-3, MEK1, MEK2 y SMO. En algunas realizaciones, la molécula diana de la superficie celular es HER1/EGFR, HER2, PD-L1, CD25, EpCAM, EphA2, CD206, CD20, CD44, CD133, mesotelina, glipicano-3 o antígeno carcinoembrionario (CEA).

En algunas realizaciones, al menos parte de la molécula de direccionamiento es, o es una combinación de, una proteína, una glucoproteína, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un antígeno, un fragmento de unión a antígeno, un péptido, un polipéptido, un péptido de asentamiento de tejidos, una molécula pequeña, una molécula sintética polimérica, una nanopartícula polimérica, un liposoma, un sustrato enzimático, una hormona, un neurotransmisor, un metabolito celular, una partícula vírica, una cápside vírica, una nanopartícula vírica, una partícula

bacteriana, un marcador, una célula, un hapteno, una avidina, una estreptavidina, una estreptavidina monomérica, una biotina, un hidrato de carbono, un oligosacárido, un polisacárido, un ácido nucleico, un ácido desoxinucleico, un fragmento de ADN, un fragmento de ARN, un aptámero, trifosfatos de nucleótidos, trifosfatos de terminador de aciclo o PNA.

5 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un péptido de asentamiento específico de tejido. En algunas realizaciones. El péptido de asentamiento tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 52.

10 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un polipéptido RGD, un polipéptido iRGD, un polipéptido Lyp-1, un polipéptido de unión a cripto-1, un polipéptido de unión al receptor de somatostatina, un polipéptido de unión a prohibitina, un polipéptido NGR, un polipéptido iNGR o un péptido de penetración celular activable (ACPP, del inglés "activatable cell penetrating peptide") compuesto por un péptido de penetración celular (CPP, del inglés "cell penetrating peptide") policationico conectado mediante un enlazador escindible a un polianión de neutralización.

15 En algunas realizaciones, el ACPP comprende la estructura: A-X1-B-, en donde B es una porción de péptido de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos básicos, que es adecuado para la captación celular; A es una porción de péptido de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos ácidos, que cuando se une con la porción B es eficaz para inhibir o evitar la captación celular de la porción B; X1 es un enlazador escindible de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos; y uno o más de L-Y están unidos al extremo carboxílico de la porción B de péptido.

25 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se selecciona de entre la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), angiotensina II, factor natriurético auricular (ANF), bombesina, bradiquinina, factor neurotrófico procedente del cerebro (BDNF), proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), calcitonina, cardiotrofina 1 (BMP-2), CD22, CD40, pancreocimina, factor neurotrófico ciliar (CNTF), CCL1-CCL28, CXCL1-CXCL17, XCL1, XCL2, CX3CL1, péptido de unión a cripto 1, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), endotelina 1, endotelina 1/3, ligando FAS, factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF-4), factor de crecimiento de fibroblastos 5 (FGF-5), factor de crecimiento de fibroblastos 6 (FGF-6), factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-7), factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-10), Flt-3, gastrina, péptido liberador de gastrina (GRP), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), péptido similar al glucagón (GLP-1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ (IFN- γ), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), interleucina 11 (IL-11), interleucina 12 (IL-12), interleucina 13 (IL-13), interleucina 15 (IL-15), interleucina 17 (IL-17), interleucina 19 (IL-19), hormona luteinizante (LH), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 3a (MIP-3a), proteína inflamatoria de macrófagos 3b (MIP-3b), factor de crecimiento nervioso (NGF), neuromedina B, neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), neurotensina, neuropéptido Y, oxitocina, péptido activador de adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), factor de crecimiento procedente de plaquetas AA (PDGF-AA), factor de crecimiento procedente de plaquetas AB (PDGF-AB), factor de crecimiento procedente de plaquetas BB (PDGF-BB), factor de crecimiento procedente de plaquetas CC (PDGF-CC), factor de crecimiento procedente de plaquetas DD (PDGF-DD), netrina-1 (NTN1), netrina-2 (NTN2), netrina-4 (NTN4), netrina-G1 (NTNG1) y netrina-G2 (NTNG2), efrina A1 (EFNA1), efrina A2 (EFNA2), efrina A3 (EFNA3), efrina A4 (EFNA4), efrina A5 (EFNA5), semaforina 3A (SEMA3A), semaforina 3B (SEMA3B), semaforina 3C (SEMA3C), semaforina 3D (SEMA3D), semaforina 3F (SEMA3F), semaforina 3G (SEMA3G), semaforina 4A (SEMA4A), semaforina 4B (SEMA4B), semaforina 4C (SEMA4C), semaforina 4D (SEMA4D), semaforina 4F (SEMA4F), semaforina 4G (SEMA4G), semaforina 5A (SEMA5A), semaforina 5B (SEMA5B), semaforina 6A (SEMA6A), semaforina 6B (SEMA6B), semaforina 6D (SEMA6D), semaforina 7A (SEMA7A), SLIT1, SLIT2, SLIT3, familia similar a SLIT y NTRK, miembro 1 (SLITRK1), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 2 (SLITRK2), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 3 (SLITRK3), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 4 (SLITRK4), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 5 (SLITRK5), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 6 (SLITRK6), prostaglandina E2 (PGE2), RANTES, somatostatina-14, somatostatina-28, factor citoblástico (SCF), factor 1 procedente de células estromales (SDF-1), sustancia P, hormona estimulante tiroidea (TSH), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), trombina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15 o Wnt16, Sonic hedgehog, Desert hedgehog e Indian hedgehog.

60 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

65 En algunas realizaciones, el anticuerpo es cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, trastuzumab, ado-trastuzumab emtansina, tositumomab (Bexxar®), rituximab (Rituxan, Mabthera), ibritumomab tiuxetan (Zevalin), daclizumab (Zenapax), gemtuzumab (Mylotarg), alemtuzumab, fragmento Fab de escaneo CEA, anticuerpo monoclonal OC125, ab75705, B72.3, bevacuzimab (Avastin®), afatinib, axitinib, bosutinib, cabozantinib, ceritinib,

crizotinib, dabrafenib, dasatinib, erlotinib, everolimus, ibrutinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, nilotinib, olaparib, palbociclib, pazopanib, pertuzumab, ramucirumab, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, temsirolimus, trametinib, vandetanib, vemurafenib, vismodegib, basiliximab, ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, MPDL3280A, pidilizumab (CT-011), AMP-224, MSB001078C o MEDI4736, o es un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a una molécula diana de la superficie celular, tal como HER1/EGFR, HER2, PD-L1, CD25, EpCAM, EphA2, CD206, CD20, CD44, CD133, mesotelina, glipicano-3 o antígeno carcinoembrionario (CEA). En algunas realizaciones, el anticuerpo es cetuximab, panitumumab, trastuzumab, BMS-935559, MEDI4736, MPDL3280A o MSB0010718C o es un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

10 En algunas realizaciones, el conjugado de colorante y molécula de direccionamiento es cetuximab-IR700, panitumumab-IR700, trastuzumab-IR700, BMS-935559-IR700, MEDI4736-IR700, MPDL3280A-IR700 o MSB0010718C-IR700.

15 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se pone en contacto con el colorante de ftalocianina en una relación molar de colorante a molécula de direccionamiento de 1:1 a 100:1 o de 1:1 a 10:1. En algunas realizaciones, la relación molar de colorante a molécula de direccionamiento es al menos o al menos aproximadamente 4:1 o es al menos o al menos aproximadamente 10:1. En algunas realizaciones, el conjugado incluye de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 moléculas de colorante de ftalocianina por molécula de direccionamiento, de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de colorante de ftalocianina por molécula de direccionamiento
20 o de o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 moléculas de colorante de ftalocianina por molécula de direccionamiento.

En algunas realizaciones, el conjugado se formula a una concentración de o de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0 mg/ml, tal como en un tampón farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el
25 tampón farmacéuticamente aceptable es solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, el tampón farmacológicamente aceptable tiene un pH de o desde aproximadamente pH 6,0 hasta aproximadamente pH 8,0. En algunas realizaciones, el conjugado es estable durante más de 3 meses con más del 90 % del conjugado presente como componente monomérico principal. En algunas realizaciones, el conjugado es estable si retiene más del o más
30 de aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de su potencia, actividad o pureza durante más de 3 meses en comparación con el conjugado antes del almacenamiento durante el tiempo. En algunas realizaciones, el conjugado es estable si está presente más del 90 % del conjugado como componente monomérico principal. En algunas realizaciones, el tampón farmacológicamente aceptable tiene un pH de o desde aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4.

35 En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una longitud de onda dentro de un intervalo de aproximadamente 425 nm a aproximadamente 575 nm. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado tiene una intensidad inferior a 200 lux.

En algunas realizaciones, el recipiente que comprende el conjugado protege de la transmisión de luz que tiene una
40 longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmisión de luz de manera que el porcentaje de transmisión de luz por el recipiente es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas
45 realizaciones, el recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está envuelto en una lámina opaca. En algunas realizaciones, el recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, el recipiente se selecciona de entre un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco y una caja.

50 En algunas realizaciones, el recipiente protegido de la luz es un primer recipiente protegido de la luz y el método incluye además envasar el primer recipiente protegido de la luz en un segundo recipiente protegido de la luz. En algunas realizaciones, el segundo recipiente protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de
55 aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, el segundo recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el segundo recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al
60 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el segundo recipiente se selecciona de entre un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco y una caja.

En algunas realizaciones, el método proporcionado en el presente documento incluye además envasar el segundo
65 recipiente en un tercer recipiente protegido de la luz. En algunas realizaciones, el tercer recipiente protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de

aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, el tercer recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En algunas realizaciones, el tercer recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el tercer recipiente se selecciona de entre un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco y una caja.

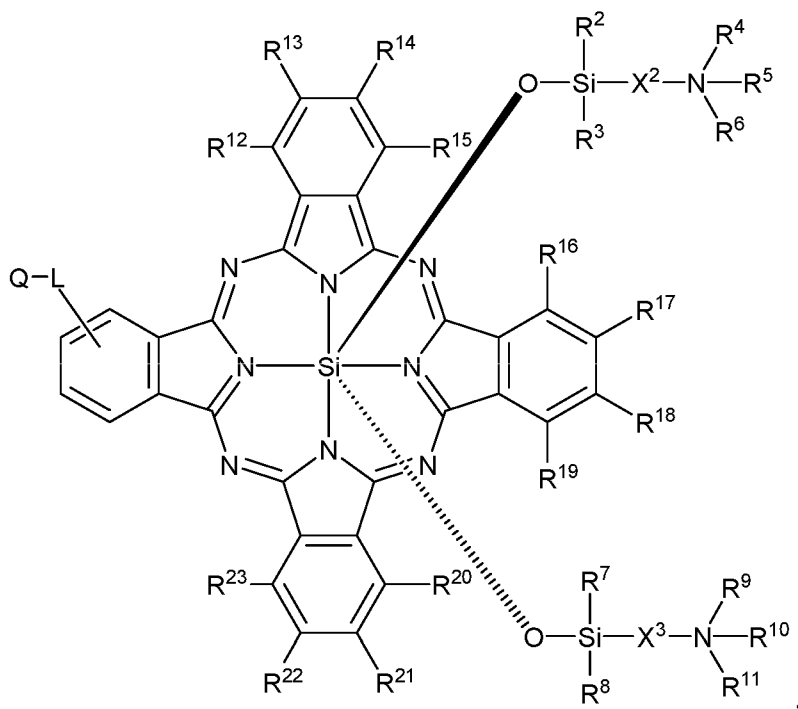
En algunas realizaciones, la cantidad de conjugado producido por el método es mayor de o mayor de aproximadamente 1 gramo, mayor de o mayor de aproximadamente 2 gramos, mayor de o mayor de aproximadamente 3 gramos, mayor de o mayor de aproximadamente 4 gramos, mayor de o mayor de aproximadamente 5 gramos o mayor de o mayor de aproximadamente 10 gramos. En algunas realizaciones, el conjugado se produce utilizando buenas prácticas de fabricación (GMP, del inglés "good manufacturing practice").

Se puede producir formular o envasar un conjugado mediante el método descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el conjugado es estable durante más de tres meses, tal como con más del 90 % del conjugado presente como componente monomérico principal.

Se proporciona un conjugado estable que contiene un colorante de ftalocianina unido a una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el conjugado estable es estable durante más de tres meses, tal como con más del 90 % del conjugado presente como componente monomérico principal. En la composición farmacéutica de la presente invención, más del 90 % o más del 95 % del conjugado está presente como componente monomérico principal.

En algunas realizaciones, el conjugado es estable si retiene más del o más de aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de su potencia, actividad o pureza durante más de 3 meses en comparación con el conjugado antes del almacenamiento durante el tiempo. En algunas realizaciones, el conjugado es estable si más del 90 % del conjugado o del conjugado estable está presente como componente monomérico principal. En algunas realizaciones, el conjugado es estable si más del 95 % del conjugado o del conjugado estable está presente como componente monomérico principal. En algunas realizaciones, el conjugado o conjugado estable es estable durante más de 6 meses o más de 12 meses. En algunas realizaciones, el conjugado o conjugado estable es estable a una temperatura inferior a 30 °C.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina contenido en el conjugado estable incluye la fórmula:



en donde:

L es un enlazador;

Q es un grupo reactivo para la unión del colorante a la molécula de direccionamiento;

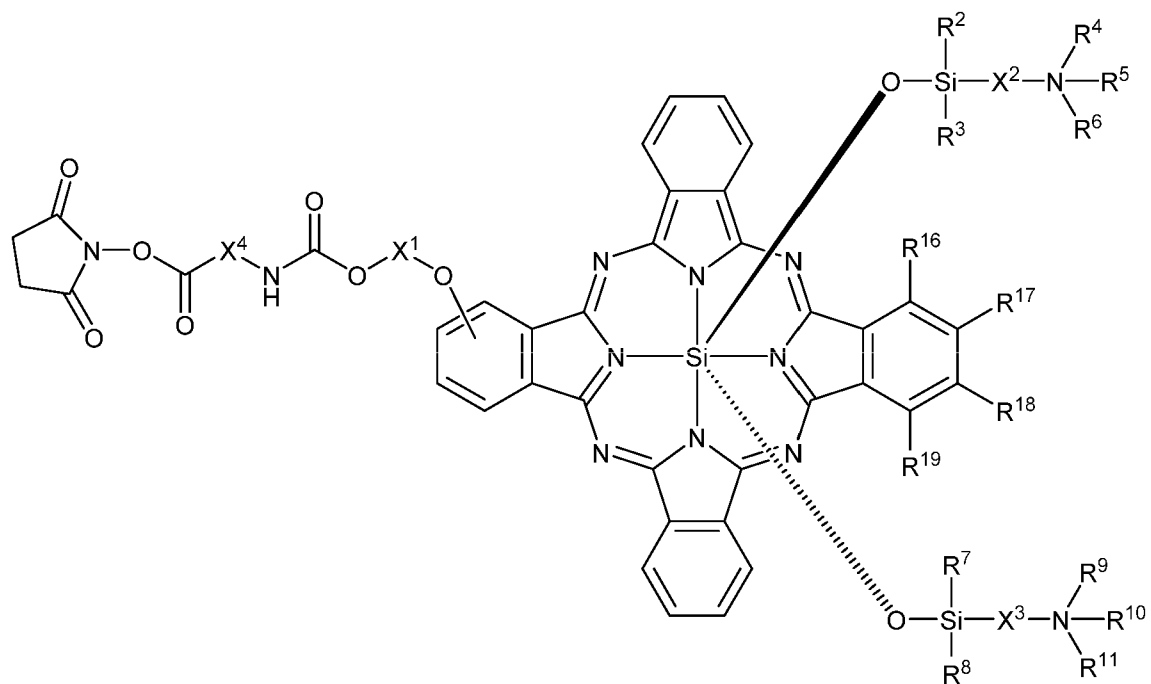
R^2 , R^3 , R^7 y R^8 cada uno se selecciona de manera independiente de entre alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido;

R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcanoilo opcionalmente sustituido, alcóxycarbonilo opcionalmente sustituido, alquilcarbamoilo opcionalmente sustituido y un ligando quelante, en donde al menos uno de R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} comprende un grupo soluble en agua;

R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} y R^{23} cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, halógeno, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido y alcoxi opcionalmente sustituido; y

X^2 y X^3 son cada uno de manera independiente alquileo C_1 - C_{10} , opcionalmente interrumpido por un heteroátomo.

En la presente invención, el colorante de ftalocianina contenido en el conjugado de la composición farmacéutica comprende esta fórmula. En algunas realizaciones, el conjugado estable que contiene el colorante de ftalocianina incluye la fórmula:



en donde:

X^1 y X^4 son cada uno de manera independiente un alquileo C_1 - C_{10} opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

R^2 , R^3 , R^7 y R^8 cada uno se selecciona de manera independiente entre alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido;

R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcanoilo opcionalmente sustituido, alcóxycarbonilo opcionalmente sustituido, alquilcarbamoilo opcionalmente sustituido y un ligando quelante, en donde al menos uno de R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} comprende un grupo soluble en agua; y

R^{16} , R^{17} , R^{18} y R^{19} cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, halógeno, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido y alcoxi opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, el colorante contenido en el conjugado estable tiene una longitud de onda de absorción máxima de o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 850 nm, de o de aproximadamente 650 nm a aproximadamente 850 nm o de o de aproximadamente 680 nm a aproximadamente 850 nm.

En algunas realizaciones, el colorante contenido en el conjugado estable es IRDye 700DX (IR700).

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento contenida en el conjugado estable se une a una molécula diana de la superficie celular en la superficie de una célula o patógeno, tal como una célula proliferativa, una célula cancerosa, una célula en hiperplasia, una célula tumoral, una célula inflamatoria, una neurona o un patógeno. En la presente invención, la molécula de direccionamiento contenida en el conjugado de la composición farmacéutica se une a una molécula diana de la superficie celular en la superficie de una célula o patógeno. En algunas realizaciones, la célula es una célula madre, una célula proliferativa, una célula en una hiperplasia o una célula infectada por

- patógenos. En algunas realizaciones, el patógeno se selecciona de entre virus, bacterias, hongos, biopelículas y otros sistemas de células procariotas. En algunas realizaciones, la célula inflamatoria es un leucocito, tal como un neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, un linfocito o un monocito. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una neurona, tal como una neurona del sistema nervioso periférico o una neurona del sistema nervioso central. En algunas realizaciones, la neurona es un nociceptor tal como un nociceptor, un nociceptor mecánico, un nociceptor químico o un nociceptor polimodal. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une a un patógeno, tal como un virus, bacteria, hongo, biopelícula u otro sistema de células procariotas. En algunas realizaciones, el patógeno es una bacteria gramnegativa o grampositiva.
- En algunas realizaciones, la molécula diana de la superficie celular unida por la molécula de direccionamiento contenida en el conjugado estable incluye un antígeno, un polipéptido, un lípido o un hidrato de carbono o una combinación de los mismos.
- En algunas realizaciones, la molécula diana de la superficie celular se selecciona de entre los fosfolípidos de la membrana celular, peptidoglucanos procarióticos, proteínas de la envoltura de células bacterianas, proteínas de la cápside vírica, ACTHR, célula endotelial Anxa-1, aminopetidasa N, anti-IL-6R, integrina α -4, integrina α -5- β -3, integrina α -5- β -5, α -fetoproteína (AFP), ANPA, ANPB, APA, APN, APP, 1AR, 2AR, AT1, B1, B2, BAGE1, BAGE2, receptor de linfocitos B BB1, BB2, BB4, receptor de calcitonina, antígeno de cáncer 125 (CA 125), CCK1, CCK2, CD5, CD10, CD11a, CD13, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD45, CD52, CD56, CD68, CD90, CD133, CD7, CD15, CD34, CD44, CD206, CD271, CEA (antígeno carcinoembrionario), CGRP, receptores de quimiocina, anexina-1 de la superficie celular, plectina-1 de la superficie celular, cripto-1, CRLR, CXCR2, CXCR4, DCC, DLL3, glucoproteína E2, EGFR, EGFRvIII, EMR1, endosialina, EP2, EP4, EpCAM, EphA2, receptores de ET, fibronectina, fibronectina ED-B, FGFR, receptores de Frizzled, GAGE1, GAGE2, GAGE3, GAGE4, GAGE5, GAGE6, receptor GLP-1, receptores acoplados a la proteína g de la familia A (similares a la rodopsina), receptores acoplados a la proteína g de la familia B (similares al receptor de secretina), receptores acoplados a la proteína g de la familia C (similar al receptor metabotrópico de glutamato), GD2, GP100, GP120, glipicano-3, hemaglutinina, sulfatos de heparina, HER1, HER2, HER3, HER4, HMFG, antígenos de HPV 16/18 y E6/E7, hTERT, un receptor de interleucina (por ejemplo, IL-2R, IL-11R, IL-13R), ITGAM, calecreína-9, Lewis Y, receptor de LH, LHRH-R, LPA1, MAC-1, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MART 1, MC1R, mesotelina, MUC1, MUC16, Neu (nucleolina de la superficie celular), neprilina, neuropilina-1, neuropilina-2, NG2, NK1, NK2, NK3, NMB-R, Notch-1, NY-ESO-1, OT-R, mutante p53, antígeno de melanoma p97, NTR2, NTR3, p32 (p32/gC1q-R/HABP1), p75, PAC1, PAR1, Patched (PTCH), PDGFR, receptores de PDGF, PDT, colágeno IV escindido por proteasa, proteinasa 3, inhibidora, proteína tirosina cinasa 7, PSA, PSMA, familia P2X purinérgica (*por ejemplo*, P2X1-5), mutante Ras, RAMP1, RAMP2, RAMP3 parcheado, receptor de RET, plexinas, smoothened, sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4, sst5, sustancia P, TEMs, receptor CD3 de linfocitos T, TAG72, TGFB1, TGFB2, Tie-1, Tie-2, Trk-A, Trk-B, Trk-C, TR1, TRPA, TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP (*por ejemplo*, TRPV1-6, TRPA1, TRPC1-7, TRPM1-8, TRPP1-5, TRPML1-3), receptor de TSH, receptores de VEGF (VEGFR1 o Flt-1, VEGFR2 o FLK-1/KDR, y VEGF-3 o FLT-4), canales iónicos dependientes de voltaje, VPAC1, VPAC2, tumor 1 de Wilms, Y1, Y2, Y4 e Y5.
- En algunas realizaciones, la molécula diana de la superficie celular se selecciona de entre HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (receptor de IL-2Ra), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, antígeno de cáncer 125 (CA125), α -fetoproteína (AFP), Lewis Y, TAG72, caprina-1, mesotelina, receptor de PDGF, PD-1, PD-L1, CTLA-4, receptor IL-2, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, glipicano-3, gpA33, mucinas, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, gangliósidos (tales como GD2, GD3, GM1 y GM2), receptor de VEGF (VEGFR), VEGFR2, VEGF-A, integrina α V β 3, integrina α 5 β 1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, tenascina, AFP, complejo BCR, CD3, CD18, CD44, CTLA-4, gp72, HLA-DR 10 β , antígeno HLA-DR, IgE, MUC-1, nuC242, antígeno PEM, metaloproteinasas, receptor de efrina, ligandos de efrina, receptor de HGF, CXCR4, CXCR4, receptor de bombesina, antígeno SK-1, Bcr-abl, RET, MET, TRKB, TIE2, ALK, ROS, EML4-ALK, ROS1, BRAFV600E, SRC, c-KIT, PDGFR, mTOR, TSC1, TSC2, BTK, KIT, BRCA, CDK 4/6, JAK1, JAK2, BRAF, FLT-3, MEK1, MEK2 y SMO. En algunas realizaciones, la molécula diana de la superficie celular es HER1/EGFR, HER2, PD-L1, CD25, EpCAM, EphA2, CD206, CD20, CD44, CD133, mesotelina, glipicano-3 o antígeno carcinoembrionario (CEA).
- En algunas realizaciones, al menos parte de la molécula de direccionamiento es, o es una combinación de, una proteína, una glucoproteína, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un antígeno, un fragmento de unión a antígeno, un péptido, un polipéptido, un péptido de asentamiento de tejidos, una molécula pequeña, una molécula sintética polimérica, una nanopartícula polimérica, un liposoma, un sustrato enzimático, una hormona, un neurotransmisor, un metabolito celular, una partícula vírica, una cápside vírica, una nanopartícula vírica, una partícula bacteriana, un marcador, una célula, un hapteno, una avidina, una estreptavidina, una estreptavidina monomérica, una biotina, un hidrato de carbono, un oligosacárido, un polisacárido, un ácido nucleico, un ácido desoxinucleico, un fragmento de ADN, un fragmento de ARN, un aptámero, trifosfatos de nucleótidos, trifosfatos de terminador de acido o PNA.
- En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un péptido de asentamiento específico de tejido. En algunas realizaciones, el péptido de asentamiento tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 52.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un polipéptido RGD, un polipéptido iRGD, un polipéptido Lyp-1, un polipéptido de unión a cripto-1, un polipéptido de unión al receptor de somatostatina, un polipéptido de unión a prohibitina, un polipéptido NGR, un polipéptido iNGR o un péptido de penetración celular activable (ACPP, del inglés "activatable cell penetrating peptide") compuesto por un péptido de penetración celular (CPP, del inglés "cell penetrating peptide") policatiónico conectado mediante un enlazador escindible a un polianión de neutralización.

En algunas realizaciones, el ACPP comprende la estructura: A-X1-B-, en donde B es una porción de péptido de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos básicos, que es adecuado para la captación celular; A es una porción de péptido de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos ácidos, que cuando se une con la porción B es eficaz para inhibir o evitar la captación celular de la porción B; X1 es un enlazador escindible de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos; y uno o más de L-Y están unidos al extremo carboxílico de la porción B de péptido.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se selecciona de entre la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), angiotensina II, factor natriurético auricular (ANF), bombesina, bradiquinina, factor neurotrófico procedente del cerebro (BDNF), proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), calcitonina, cardiotrofina 1 (BMP-2), CD22, CD40, pancroecimina, factor neurotrófico ciliar (CNTF), CCL1- CCL28, CXCL1-CXCL17, XCL1, XCL2, CX3CL1, péptido de unión a cripto 1, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), endotelina 1, endotelina 1/3, ligando FAS, factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF-4), factor de crecimiento de fibroblastos 5 (FGF-5), factor de crecimiento de fibroblastos 6 (FGF-6), factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-7), factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-10), Flt-3, gastrina, péptido liberador de gastrina (GRP), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), péptido similar al glucagón (GLP-1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ (IFN- γ), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), interleucina 11 (IL-11), interleucina 12 (IL-12), interleucina 13 (IL-13), interleucina 15 (IL-15), interleucina 17 (IL-17), interleucina 19 (IL-19), hormona luteinizante (LH), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 3a (MIP-3a), proteína inflamatoria de macrófagos 3b (MIP-3b), factor de crecimiento nervioso (NGF), neuromedina B, neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), neurotensina, neuropéptido Y, oxitocina, péptido activador de adenilato ciclase pituitaria (PACAP), factor de crecimiento procedente de plaquetas AA (PDGF-AA), factor de crecimiento procedente de plaquetas AB (PDGF-AB), factor de crecimiento procedente de plaquetas BB (PDGF-BB), factor de crecimiento procedente de plaquetas CC (PDGF-CC), factor de crecimiento procedente de plaquetas DD (PDGF-DD), netrina-1 (NTN1), netrina-2 (NTN2), netrina-4 (NTN4), netrina-G1 (NTNG1) y netrina-G2 (NTNG2), efrina A1 (EFNA1), efrina A2 (EFNA2), efrina A3 (EFNA3), efrina A4 (EFNA4), efrina A5 (EFNA5), semaforina 3A (SEMA3A), semaforina 3B (SEMA3B), semaforina 3C (SEMA3C), semaforina 3D (SEMA3D), semaforina 3F (SEMA3F), semaforina 3G (SEMA3G), semaforina 4A (SEMA4A), semaforina 4B (SEMA4B), semaforina 4C (SEMA4C), semaforina 4D (SEMA4D), semaforina 4F (SEMA4F), semaforina 4G (SEMA4G), semaforina 5A (SEMA5A), semaforina 5B (SEMA5B), semaforina 6A (SEMA6A), semaforina 6B (SEMA6B), semaforina 6D (SEMA6D), semaforina 7A (SEMA7A), SLIT1, SLIT2, SLIT3, familia similar a SLIT y NTRK, miembro 1 (SLITRK1), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 2 (SLITRK2), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 3 (SLITRK3), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 4 (SLITRK4), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 5 (SLITRK5), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 6 (SLITRK6), prostaglandina E2 (PGE2), RANTES, somatostatina-14, somatostatina-28, factor citoblástico (SCF), factor 1 procedente de células estromales (SDF-1), sustancia P, hormona estimulante tiroidea (TSH), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), trombina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15 o Wnt16, Sonic hedgehog, Desert hedgehog e Indian hedgehog.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, trastuzumab, ado-trastuzumab emtansina, tositumomab (Bexxar®), rituximab (Rituxan, Mabthera), ibritumomab tiuxetan (Zevalin), daclizumab (Zenapax), gemtuzumab (Mylotarg), alemtuzumab, fragmento Fab de escaneo CEA, anticuerpo monoclonal OC125, ab75705, B72.3, bevacuzimab (Avastin®), afatinib, axitinib, bosutinib, cabozantinib, ceritinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, erlotinib, everolimus, ibrutinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, nilotinib, olaparib, palbociclib, pazopanib, pertuzumab, ramucirumab, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, temsirolimus, trametinib, vandetanib, vemurafenib, vismodegib, basiliximab, ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, lambrolizumab, MPDL3280A, pidilizumab (CT-011), MSB001078C, BMS-935559 o MEDI4736, AMP-224, o es un fragmento de unión a antígeno de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a una molécula diana de la superficie celular, tal como HER1/EGFR, HER2, PD-L1, CD25, EpCAM, EphA2, CD206, CD20, CD44, CD133, mesotelina, glipicano-3 o antígeno carcinoembrionario (CEA). En algunas realizaciones, el anticuerpo es cetuximab, panitumumab, trastuzumab, BMS-935559, MEDI4736, MPDL3280A o MSB0010718C o es un fragmento de unión a antígeno de los

mismos.

En algunas realizaciones, el conjugado estable de colorante y molécula de direccionamiento es cetuximab-IR700, panitumumab-IR700, trastuzumab-IR700, BMS-935559-IR700, MEDI4736-IR700, MPDL3280A-IR700 o MSB0010718C-IR700.

En algunas realizaciones, el conjugado estable incluye de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 moléculas de colorante de ftalocianina por molécula de direccionamiento, de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 moléculas de colorante de ftalocianina por molécula de direccionamiento.

En algunas realizaciones se describe una composición que contiene el conjugado o conjugado estable, tal como la composición farmacéutica de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En algunas realizaciones se describe una composición farmacéutica que contiene el conjugado o conjugado estable y un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como la composición farmacéutica de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En algunas realizaciones, la composición se formula en solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, la composición tiene un pH superior a 6,0.

En algunas realizaciones se proporciona una composición farmacéutica que contiene un colorante de ftalocianina unido a una molécula de direccionamiento y un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como la composición farmacéutica de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas de dichas realizaciones, la composición tiene un pH superior a 6,0 y el conjugado en la composición es estable durante más de tres meses, tal como con más del 90 % del conjugado presente como componente monomérico principal. En algunas de dichas realizaciones, el conjugado en la composición es estable si retiene más del o más de aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de su potencia, actividad o pureza durante más de 3 meses en comparación con el conjugado antes del almacenamiento durante el tiempo. En algunas de dichas realizaciones, el conjugado en la composición es estable si está presente más del 90 % del conjugado como componente monomérico principal. En la composición farmacéutica de la presente invención, más del 90 % o más del 95 % del conjugado está presente como componente monomérico principal. En algunas realizaciones, el pH de la composición es superior a 6,0 o es de o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, ambos inclusive.

En algunas realizaciones, la concentración del conjugado en la composición es de o de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del conjugado en la composición es de o de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del conjugado en la composición es de o de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del conjugado en la composición es de o de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 2,1 mg/ml.

En algunas realizaciones, el volumen de la composición es de o de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 100 ml, de o de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 50 ml o de o de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml.

En algunas realizaciones se proporciona un recipiente que comprende el conjugado o conjugado estable, tal como el recipiente de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 500 nm a 725 nm o de 650 nm a 725 nm. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz por el recipiente es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el recipiente está envuelto en una lámina opaca.

En algunas realizaciones se proporciona un sistema de envasado para proteger de la luz un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento, tal como el sistema de envasado de la presente invención, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el sistema de envasado incluye un material de envasado interno que comprende el recipiente descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el material de envasado interno tiene una transmitancia de luz de no más del 5 %. En algunas realizaciones, un material de envasado externo contiene el material de envasado interno. En algunas realizaciones, el material de envasado externo tiene una transmitancia de luz de no más del 5 %. En algunas realizaciones, el material de envasado interno incluye una lámina opaca.

En algunas realizaciones se proporciona un sistema de envasado para proteger de la luz un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento que incluye un primer recipiente, tal como cualquier recipiente proporcionado en el presente documento, y un segundo recipiente que comprende el primer recipiente, en donde el

segundo recipiente protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, el segundo recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el segundo recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el primer y segundo recipiente se seleccionan de manera independiente de entre un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco y una caja.

En algunas realizaciones, cualquiera de los sistemas de envasado proporcionados incluye además un tercer recipiente que comprende el segundo recipiente, en donde el tercer recipiente protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, el tercer recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el tercer recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el tercer recipiente se selecciona de entre un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco y una caja.

En algunas realizaciones se proporciona un kit que incluye cualquiera de los recipientes descritos en el presente documento o cualquiera de los sistemas de envasado descritos en el presente documento; una cubierta protectora de luz capaz de cubrir un dispositivo capaz de administrar una composición que comprende un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento; y, opcionalmente, instrucciones de uso; tal como el kit de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, el dispositivo de administración es una bolsa de infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz protege de la transmisión de luz con una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En el presente documento se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un método para preparar una composición que comprende un conjugado con colorante de ftalocianina para administración que incluye: desembalar uno o más de cualquiera de los recipientes descritos en el presente documento o uno o más de cualquiera de los sistemas de envasado descritos en el presente documento que incluye cualquiera de los recipientes descritos en el presente documento; y transferir la composición presente en uno o más recipientes a un dispositivo capaz de administrar la composición a un sujeto, en donde la única luz a la que se expone la composición tiene una longitud de onda en un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm o la única luz a la que se expone la composición tiene una intensidad inferior a 500 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone la composición tiene una intensidad inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, el método proporcionado se realiza en una cámara de bioseguridad, campana de bioseguridad o un ambiente estéril. En algunas realizaciones, el uno o más recipientes juntos comprenden una dosis terapéuticamente eficaz del conjugado de colorante de ftalocianina. En algunas realizaciones, el uno o más recipientes incluyen al menos o aproximadamente al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 o 24 recipientes. En algunas realizaciones, el método proporcionado se lleva a cabo durante no más de 1 hora, no más de 30 minutos o no más de 15 minutos; o la exposición total de la composición a cualquier luz durante el método no es más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas.

En algunas realizaciones, el dispositivo de administración es una bolsa de infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el dispositivo de administración comprende una cubierta protectora de luz capaz de cubrir el dispositivo. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm.

En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

También se divulga un dispositivo protegido de la luz que incluye la composición preparada utilizando los métodos proporcionados en el presente documento.

Un método para eliminar células o patógenos no deseados en un sujeto incluye: (a) administrar una composición que comprende un conjugado de colorante de ftalocianina de cualquiera de los dispositivos protegidos de la luz proporcionados en el presente documento a un sujeto, en donde antes y durante la etapa de administración, la composición no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y (b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 660 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula no deseada en el sujeto.

Otro método para eliminar células o patógenos no deseados en un sujeto incluye: a) administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los conjugados o composiciones descritas en el presente documento, en donde antes y durante la etapa de administración, la conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 660 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula no deseada en el sujeto.

Otro método para eliminar células o patógenos no deseados en un sujeto incluye: a) administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento capaz de unirse a una célula o patógeno no deseado, en donde antes y durante la etapa de administración, la conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así las células o patógenos no deseados en el sujeto.

Otro método para eliminar células o patógenos no deseados en un sujeto que incluye: a) administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una primera molécula de unión capaz de unirse a una célula o patógeno no deseado; b) administrar al sujeto una molécula conjugada que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento, en donde la molécula de direccionamiento es una segunda molécula de unión que es capaz de unirse a la primera molécula de unión; y c) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así las células o patógenos no deseados en el sujeto.

Un método para eliminar células o patógenos no deseados en una muestra incluye: (a) administrar una composición que comprende un conjugado de colorante de ftalocianina de cualquiera de los dispositivos protegidos de la luz proporcionados en el presente documento a una muestra, en donde antes y durante la etapa de administración, la composición no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y (b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 660 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula no deseada en la muestra.

Otro método para eliminar células o patógenos no deseados en una muestra incluye: a) administrar a una muestra una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los conjugados o composiciones descritas en el presente documento, en donde antes y durante la etapa de administración, la conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 660 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula no deseada en la muestra.

Otro método para eliminar células o patógenos no deseados en una muestra incluye: a) administrar a una muestra una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento capaz de unirse a una célula o patógeno no deseado, en donde antes y durante la etapa de administración, la conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así las células o patógenos no deseados en la muestra.

Otro método para eliminar células o patógenos no deseados en una muestra que incluye: a) administrar a una muestra una cantidad terapéuticamente eficaz de una primera molécula de unión capaz de unirse a una célula o patógeno no deseado; b) administrar a la muestra una molécula conjugada que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento, en donde la molécula de direccionamiento es una segunda molécula de unión que es capaz de unirse a la primera molécula de unión; y c) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así las células o patógenos no deseados en la muestra.

En algunas realizaciones, el método se puede realizar *in vitro* o *ex vivo*. En algunas realizaciones, el método se realiza mediante un dispositivo extracorpóreo.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la primera molécula de unión se administra al sujeto antes que el conjugado o la primera molécula de unión y el conjugado se administran de manera simultánea al sujeto. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo secundario. En algunas realizaciones, antes y durante la administración del conjugado, el conjugado no se expone a una intensidad

de luz ambiental superior a 500 lux.

En algunas realizaciones, la célula es una célula madre, una célula proliferativa, una célula en una hiperplasia, una célula inflamatoria, una célula inmunitaria reguladora negativa, que opcionalmente es un linfocitos T, una célula infectada por patógenos, una neurona, una célula grasa o adipocito. En algunas realizaciones, la célula es una célula cancerosa o una célula tumoral. En algunas realizaciones, la celda está asociada, provoca o contribuye a la etiología de una enfermedad o afección. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un tumor o cáncer, una infección, una enfermedad o afección inflamatoria, o una enfermedad o afección neuronal. En algunas realizaciones, la célula es una neurona y la enfermedad o afección es un trastorno neurológico, que opcionalmente es dolor; la célula es una célula grasa o un adipocito y la enfermedad o afección implica un exceso de grasa; la célula es una célula infectada por patógenos y la enfermedad o condición es una infección; la célula es un patógeno y la enfermedad o condición es una infección; la célula es una célula inflamatoria y la enfermedad o afección es una enfermedad inflamatoria; la célula es una célula inmunitaria, que opcionalmente es un linfocito T regulador, y la enfermedad o afección es un tumor o cáncer; o la célula es una célula tumoral o cancerosa y la enfermedad o afección es un tumor o un cáncer.

En algunas realizaciones, la célula está presente en el microambiente de una lesión asociada con una enfermedad o afección o está en una hiperplasia. En algunas realizaciones, la lesión es un tumor y la enfermedad o afección es un tumor o cáncer. En algunas realizaciones, el método trata la enfermedad o afección. En la composición farmacéutica para su uso de la presente invención, la composición es para su uso en un método para tratar una hiperplasia o un tumor.

Un método para eliminar una célula infectada por patógenos en un sujeto incluye: a) administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula conjugada que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento, en donde la molécula de direccionamiento es capaz de unirse a la célula infectada por patógenos de manera directa o indirecta; y b) irradiar la célula infectada por patógenos a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula infectada por patógenos en el sujeto. En algunas realizaciones, el patógeno es un virus, bacteria, hongo, biopelícula u otro sistema de células procariotas. En algunas realizaciones, antes y durante la administración del conjugado, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux.

Un método para eliminar una célula infectada por patógenos en una muestra incluye: a) administrar a una muestra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula conjugada que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento, en donde la molécula de direccionamiento es capaz de unirse a la célula infectada por patógenos de manera directa o indirecta; y b) irradiar la célula infectada por patógenos a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula infectada por patógenos en la muestra. En algunas realizaciones, el patógeno es un virus, bacteria, hongo, biopelícula u otro sistema de células procariotas. En algunas realizaciones, antes y durante la administración del conjugado, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux.

En algunas realizaciones, el método se puede realizar *in vitro* o *ex vivo*. En algunas realizaciones, el método de irradiación *ex vivo* se realiza utilizando un dispositivo extracorpóreo. En algunas realizaciones de la divulgación se proporciona un método para tratar la hiperplasia o un tumor en un sujeto. En algunas realizaciones, el método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado o conjugado estable o composición, donde antes y durante la etapa de administración, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux. En algunas realizaciones, el método incluye además irradiar la hiperplasia o el tumor a una longitud de onda de 660 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra, tratando así el tumor en el sujeto. Por ejemplo, la composición farmacéutica para su uso de la presente invención es para su uso en un método para tratar una hiperplasia o un tumor en un sujeto humano como se define en las reivindicaciones.

También se describe otro método para tratar la hiperplasia o un tumor en un sujeto. En algunas de dichas realizaciones, el método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado que contiene IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el conjugado se dirige a la hiperplasia o al tumor y antes y durante la etapa de administración, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux. En algunas realizaciones, el método incluye además irradiar el tumor a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra tratando así el tumor en el sujeto.

En algunas realizaciones de la divulgación se proporciona un método para tratar la hiperplasia o un tumor en una muestra. En algunas realizaciones, el método incluye administrar a la muestra cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado o conjugado estable o composición, donde antes y durante la etapa de administración, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux. En algunas realizaciones, el método incluye además irradiar la hiperplasia o el tumor a una longitud de onda de 660 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra, tratando así el tumor en la muestra.

También se describe otro método para tratar la hiperplasia o un tumor en una muestra. En algunas de dichas

realizaciones, el método incluye administrar a la muestra una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado que contiene IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el conjugado se dirige a la hiperplasia o al tumor y antes y durante la etapa de administración, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux. En algunas realizaciones, el método incluye además irradiar el tumor a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra, tratando así el tumor en la muestra.

En algunas realizaciones, el método es para tratar un tumor, en donde la molécula de direccionamiento del conjugado dirige el conjugado al tumor o a un microambiente del tumor. En algunas realizaciones, la irradiación del tumor tiene una longitud de onda de 600 a 800 nm y a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra, tratando así el tumor, por ejemplo, el tumor en el sujeto o en la muestra.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, una proteína, una glucoproteína, un péptido, un polipéptido, un virus, una cápside vírica o una partícula vírica. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En algunas realizaciones, la administración se realiza bajo iluminación fluorescente o iluminación LED y en ausencia de luz solar directa o indirecta.

En algunas realizaciones, cualquier exposición del conjugado a luz inferior a 500 lux es inferior a 20 minutos, inferior a 15 minutos, inferior a 10 minutos o inferior a 5 minutos. En algunas realizaciones, la exposición del conjugado a cualquier luz es luz con una intensidad no superior a 50 lux.

En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer ubicado en la cabeza y el cuello, de mama, hígado, colon, ovario, próstata, páncreas, cerebro, cuello del útero, hueso, piel, ojo, vejiga, estómago, esófago, peritoneo o pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de la sangre.

En algunas realizaciones, el conjugado se dirige a una proteína expresada en el tumor.

En algunas realizaciones, el conjugado se dirige a una proteína expresada en la superficie de una célula presente en el microambiente del tumor. En algunas realizaciones, la célula es una célula tumoral, una célula inmunitaria o una célula madre cancerosa.

En algunas realizaciones, la proteína expresada en el tumor es ACTHR, célula endotelial Anxa-1, aminopetidasa N, anti-IL-6R, integrina α -4, integrina α -5- β -3, integrina α -5- β -5, α -fetoproteína (AFP), ANPA, ANPB, APA, APN, APP, 1AR, 2AR, AT1, B1, B2, BAGE1, BAGE2, receptor de linfocitos B BB1, BB2, BB4, receptor de calcitonina, antígeno de cáncer 125 (CA 125), CCK1, CCK2, CD5, CD10, CD11a, CD13, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD45, CD52, CD56, CD68, CD90, CD133, CD7, CD15, CD34, CD44, CD206, CD271, CEA (antígeno carcinoembrionario), CGRP, receptores de quimiocina, anexina-1 de la superficie celular, plectina-1 de la superficie celular, cripto-1, CRLR, CXCR2, CXCR4, DCC, DLL3, glucoproteína E2, EGFR, EGFRvIII, EMR1, endosialina, EP2, EP4, EpCAM, EphA2, receptores de ET, fibronectina, fibronectina ED-B, FGFR, receptores de Frizzled, GAGE1, GAGE2, GAGE3, GAGE4, GAGE5, GAGE6, receptor GLP-1, receptores acoplados a la proteína g de la familia A (similares a la rodopsina), receptores acoplados a la proteína g de la familia B (similares al receptor de secretina), receptores acoplados a la proteína g de la familia C (similar al receptor metabotrópico de glutamato), GD2, GP 100, GP120, glipicano-3, hemaglutinina, sulfatos de heparina, HER1, HER2, HER3, HER4, HMFG, antígenos de HPV 16/18 y E6/E7, hTERT, IL11-R, IL-13R, ITGAM, calecreína-9, Lewis Y, receptor de LH, LHRH-R, LPA1, MAC-1, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MART1, MC1R, mesotelina, MUC1, MUC16, Neu (nucleolina de la superficie celular), neprilisina, neuropilina-1, neuropilina-2, NG2, NK1, NK2, NK3, NMB-R, Notch-1, NY-ESO-1, OT-R, mutante p53, antígeno de melanoma p97, NTR2, NTR3, p32 (p32/gC1q-R/HABP1), p75, PAC1, PAR1, Patched (PTCH), PDGFR, receptores de PDFG, PDT, colágeno IV escindido por proteasa, proteinasa 3, prohibitina, proteína tirosina cinasa 7, PSA, PSMA, familia P2X purinérgica (*por ejemplo*, P2X1-5), mutante Ras, RAMP1, RAMP2, RAMP3 parcheado, receptor de RET, plexinas, smoothened, sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4, sst5, sustancia P, TEMs, receptor CD3 de linfocitos T, TAG72, TGFB1, TGFB2, Tie-1, Tie-2, Trk-A, Trk-B, Trk-C, TR1, TRPA, TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP (*por ejemplo*, TRPV1-6, TRPA1, TRPC1-7, TRPM1-8, TRPP1-5, TRPML1-3), receptor de TSH, receptores de VEGF (VEGFR1 o Flt-1, VEGFR2 o FLK-1/KDR, y VEGF-3 o FLT-4), canales iónicos dependientes de voltaje, VPAC1, VPAC2, tumor 1 de Wilms, Y1, Y2, Y4 o Y5.

En algunas realizaciones, la proteína expresada en el tumor es HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (receptor de IL-2Ra), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, antígeno de cáncer 125 (CA125), α -fetoproteína (AFP), Lewis Y, TAG72, caprina-1, mesotelina, receptor de PDGF, PD-1, PD-L1, CTLA-4, receptor IL-2, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, glipicano-3, gpA33, mucinas, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, gangliósidos (tales como GD2, GD3, GM1 y GM2), receptor de VEGF (VEGFR), VEGFR2, VEGF-A, integrina α v β 3, integrina α 5 β 1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, tenascina, AFP, complejo BCR, CD3, CD18, CD44, CTLA-4, gp72, HLA-DR 10 β , antígeno HLA-DR, IgE, MUC-1, nuC242, antígeno PEM, metaloproteinasas, receptor de efrina, ligandos de efrina, receptor de HGF, CXCR4, CXCR4, receptor de bombesina, antígeno SK-1, Bcr-abl, RET, MET, TRKB, TIE2, ALK, ROS, EML4-ALK, ROS1, BRAFV600E, SRC, c-KIT, PDGFR, mTOR, TSC1, TSC2, BTK, KIT, BRCA, CDK 4/6, JAK1, JAK2, BRAF, FLT-

3, MEK1, MEK2 o SMO.

En algunas realizaciones, el conjugado se dirige a una proteína expresada en el tumor. En algunas realizaciones, la célula, la hiperplasia o el tumor se irradia a una longitud de onda de o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 850 nm. En algunas realizaciones, el tumor se irradia a una longitud de onda de 690 ± 50 nm o 690 ± 20 nm.

En algunas realizaciones, la célula, la hiperplasia o el tumor se irradia a una dosis de o de aproximadamente 2 J cm^{-2} hasta aproximadamente 400 J cm^{-2} o de o de aproximadamente 2 J/cm de longitud de fibra a aproximadamente 500 J/cm de longitud de fibra. En algunas realizaciones, las células, la hiperplasia o el tumor se irradian a una dosis de al menos o al menos aproximadamente 2 J cm^{-2} , 5 J cm^{-2} , 10 J cm^{-2} , 25 J cm^{-2} , 50 J cm^{-2} , 75 J cm^{-2} , 100 J cm^{-2} , 150 J cm^{-2} , 200 J cm^{-2} , 300 J cm^{-2} , 400 J cm^{-2} o 500 J cm^{-2} ; o las células, el tumor o la hiperplasia se irradian a una dosis de al menos o al menos aproximadamente 2 J/cm de longitud de fibra, 5 J/cm de longitud de fibra, 10 J/cm de longitud de fibra, 25 J/cm de longitud de fibra, 50 J/cm de longitud de fibra, 75 J/cm de longitud de fibra, 100 J/cm de longitud de fibra, 150 J/cm de longitud de fibra, 200 J/cm de longitud de fibra, 250 J/cm de longitud de fibra, 300 J/cm de longitud de fibra, 400 J/cm de longitud de fibra o 500 J/cm de longitud de fibra.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un tumor y el tumor es un tumor superficial. En algunas realizaciones, el tumor se irradia a una dosis de al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 10 J/cm^2 , 25 J/cm^2 , 50 J/cm^2 , 150 J/cm^2 , o 250 J/cm^2 .

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un tumor y el tumor es un tumor intersticial. En algunas realizaciones, el tumor se irradia a una dosis de al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 50 J/cm de longitud de fibra, 100 J/cm de longitud de fibra, 200 J/cm de longitud de fibra o 300 J/cm de longitud de fibra.

En algunas realizaciones, las células, la hiperplasia o el tumor se irradia dentro de o dentro de alrededor de o alrededor de las 12 horas, 24 horas, 36 horas, 72 horas o 96 horas después de la administración del conjugado. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se administra hasta 96 horas antes de la administración del conjugado. En algunas realizaciones, el conjugado se administra en una cantidad de o de aproximadamente $0,5 \text{ mg/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg o de 20 mg/m^2 a aproximadamente 4000 mg/m^2 .

En algunas realizaciones, el conjugado se administra en una cantidad que es al menos o aproximadamente al menos o es o es de aproximadamente $0,5 \text{ mg/kg}$, $2,0 \text{ mg/kg}$, $4,0 \text{ mg/kg}$, $8,0 \text{ mg/kg}$, $16,0 \text{ mg/kg}$, $32,0 \text{ mg/kg}$ o 64 mg/kg ; o el conjugado se administra en una cantidad que es al menos o aproximadamente al menos o es o es de aproximadamente 20 mg/m^2 , 40 mg/m^2 , 160 mg/m^2 , 320 mg/m^2 , 640 mg/m^2 , 1280 mg/m^2 o 2560 mg/m^2 .

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, antes de la administración del conjugado se administra la molécula de direccionamiento, por ejemplo, se administra al sujeto o la muestra. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se administra en una dosis dentro de un intervalo de o de aproximadamente 10 mg/m^2 a aproximadamente 500 mg/m^2 .

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo es cetuximab.

En el presente documento también se describe un conjugado que contiene un colorante de ftalocianina y una molécula de direccionamiento. En algunas de dichas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un péptido de asentamiento específico de tejido, un polipéptido RGD, un polipéptido iRGD, un polipéptido Lyp-1, un polipéptido de unión a cripto-1, un polipéptido de unión al receptor de somatostatina, un polipéptido de unión a prohibitina, un polipéptido NGR, un polipéptido iNGR, un péptido de penetración celular activable (ACPP) compuesto por un péptido de penetración celular (CPP) policatiónico conectado a través de un enlazador escindible a un polianión neutralizante, o un anticuerpo, tal como ado-trastuzumab emtansina, afatinib, axitinib, bosutinib, cabozantinib, ceritinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, everolimus, ibrutinib, imatinib, lenvatinib, nilotinib, olaparib, palbociclib, pazopanib, ramucirumab, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, temsirolimus, trametinib, vandetanib, vemurafenib, vismodegib, ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, MPDL3280A, pidilizumab (CT-011), AMP-224, MSB001078C o MEDI4736, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

En algunas realizaciones, el ACPP comprende la estructura: A-X1-B-, en donde B es una porción de péptido de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos básicos, que es adecuado para la captación celular; A es una porción de péptido de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos ácidos, que cuando se une con la porción B es eficaz para inhibir o evitar la captación celular de la porción B; X1 es un enlazador escindible de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos; y uno o más de L-Y están unidos al extremo carboxílico de la porción B de péptido.

En algunas realizaciones, el péptido de asentamiento tiene una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 52. En algunas realizaciones, el colorante es IR700.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1A** muestra las cantidades relativas de especies de alto peso molecular (agregados) y de la forma monomérica del cetuximab-IRDye 700DX evaluadas mediante cromatografía líquida de alta presión utilizando una columna de exclusión por tamaño (HPLC-SEC) de una muestra en un frasco transparente antes de 24 horas de exposición a la luz.

La **figura 1B** muestra las cantidades relativas de especies de alto peso molecular (agregados) y de la forma monomérica del cetuximab-IRDye 700DX evaluadas mediante análisis de cromatografía líquida de alta presión utilizando una columna de exclusión por tamaño (HPLC-SEC) de una muestra en un frasco transparente después de 24 horas de exposición a la luz.

La **figura 2A** muestra la duración de la exposición de cetuximab-IRDye 700DX a luz blanca fluorescente o luz LED verde de 500 lux y su efecto sobre la formación de agregados solubles.

La **figura 2B** muestra el efecto de la exposición previa de cetuximab-IRDye 700DX a luz blanca fluorescente o luz LED verde sobre la actividad de la PIT en BxPC3 a diversas dosis y duraciones de luz.

La **figura 2C** muestra el efecto del porcentaje de formación de agregados solubles de cetuximab-IRDye 700DX sobre la actividad de la PIT.

La **figura 3** muestra la actividad destructora de la PIT con tinción secuencial utilizando cetuximab y anticuerpo secundario de burro antihumano-IRDye 700DX (DxHu IR700).

La **figura 4A** muestra la destrucción dependiente de la luz de células BxPC3 con cetuximab biotinilado que forma complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX (mSA IR700).

La **figura 4B** muestra la especificidad de la PIT con cetuximab biotinilado que forma complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX (mSA IR700).

La **figura 4C** muestra el efecto de la exposición previa de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX a la luz blanca sobre la actividad de destrucción de la PIT con cetuximab biotinilado en células BxPC3.

La **figura 5A** muestra la destrucción dependiente de la dosis de anticuerpo de células 4T1 con anti-EpCAM-IRDye 700DX conjugado directamente.

La **figura 5B** muestra la especificidad de la actividad destructora de la PIT con anti-EpCAM-IRDye 700DX.

La **figura 6** muestra la destrucción específica del receptor Fc de células THP1 mediante cetuximab-IRDye 700DX.

La **figura 7A** muestra la especificidad de la destrucción dependiente de luz con EGF-IRDye 700DX en células A431.

La **figura 7B** muestra el efecto de la exposición previa a EGF-IRDye 700DX a diferentes tipos de luz sobre la destrucción dependiente de luz en células A431.

La **figura 8A** muestra la destrucción dependiente de la luz de las células BxPC3 utilizando toxina del cólera B-IRDye 700DX.

La **figura 8B** muestra la especificidad de la destrucción activada por luz de toxina del cólera B-IRDye 700DX.

La **figura 8C** muestra el efecto de la exposición previa de toxina del cólera B-IRDye 700DX a diferentes longitudes de onda de luz sobre la destrucción activada por la luz en células BxPC3.

La **figura 9A** muestra la destrucción dependiente de la luz de las células Vero con virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX.

La **figura 9B** muestra el efecto de la exposición previa de virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX a la luz blanca frente a la luz verde sobre la destrucción celular fotoactivada.

La **figura 10A** muestra el efecto de la dosis de luz sobre la actividad destructora de SNA-IRDye 700DX en células BxPC3.

La **figura 10B** muestra el efecto del tratamiento con sialidasa sobre la especificidad de la unión de SNA-IRDye 700DX a las células.

La **figura 11** muestra la destrucción mediante PIT de *S. aureus* mediante cetuximab-IRDye 700DX en combinación con iluminación láser.

La **figura 12** muestra la PIT de las partículas del virus de la gripe utilizando el anticuerpo de ratón antiviral de la gripe (H3N2) que forma complejo previamente con GtxMs Fab-IRDye 700DX.

La **figura 13** muestra la destrucción dependiente de la luz de las células infectadas por el virus de la gripe con el anticuerpo de ratón antiviral de la gripe (H3N2) y el anticuerpo de cabra antirratón IRDye 700DX (GtxMs-IR700).

La **figura 14** muestra la destrucción mediante PIT de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG, del inglés "dorsal root ganglion") embrionarias de rata utilizando toxina del cólera B-IRDye 700DX.

La **figura 15A** muestra el efecto de la exposición previa del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX, el conjugado de cetuximab-IRDye 680RD y el conjugado doble de cetuximab-IRDye 700+IRDye 680RD a luz blanca o luz verde sobre la formación de agregados solubles.

La **figura 15B** muestra el efecto de la exposición previa del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX, el conjugado de cetuximab-IRDye 680RD y el conjugado doble de cetuximab-IRDye 700+IRDye 680RD a luz blanca o luz verde sobre la fluorescencia normalizada al contenido monomérico.

Descripción detallada

I. Métodos para la fabricación de conjugados de colorante de ftalocianina y moléculas de direccionamiento

En algunas realizaciones de la presente divulgación, pero no forman parte de la invención reivindicada, se proporcionan métodos para preparar o fabricar conjugados de colorantes de ftalocianina y molécula de direccionamiento, tales como un conjugado de IRDye 700DX (IR700) y molécula de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpo), que incluye producir,

formular y/o envasar los conjugados. En algunas realizaciones, los métodos se realizan en condiciones para reducir o evitar la agregación o degradación del colorante, tal como mediante la protección del conjugado de la luz que pueda fotoactivar el colorante del conjugado durante los procesos de fabricación. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados también incluyen proteger el conjugado de la exposición a un pH ácido, tal como un pH ácido inferior a 6,0. Los métodos proporcionados producen un conjugado de colorante que es estable durante más de 3 meses, y generalmente más de 6 meses o más de 12 meses, que incluye un conjugado de colorante que es estable en condiciones de almacenamiento.

En algunas realizaciones, los métodos se realizan para producir un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento para su uso en métodos de fotoimmunoterapia. La fotoimmunoterapia es una terapia molecular dirigida que utiliza un fotosensibilizador específico de diana basado en colorante de ftalocianina, tal como un colorante de ftalocianina del infrarrojo cercano (NIR, del inglés "near infrared") (por ejemplo, IR700), conjugado con una molécula de direccionamiento, *por ejemplo*, dirigida a una proteína de la superficie celular en las células tumorales. Por ejemplo, en algunos casos, un conjugado de colorante de ftalocianina utilizado en fotoimmunoterapia puede incluir la conjugación con un anticuerpo monoclonal (AcM) dirigido a proteínas de la superficie celular específicas del tumor, por ejemplo, un receptor de la superficie celular específico del tumor. En algunas realizaciones, la activación del conjugado de colorante mediante irradiación con luz absorbente, tal como la luz NIR, excita el fotosensibilizador y da como resultado la destrucción celular. En algunos casos, el uso de luz en el intervalo de NIR conduce a una penetración más profunda en los tejidos, lo que da como resultado la eliminación exitosa de tumores después de una sola dosis de irradiación de luz NIR externa.

Normalmente, la PIT da como resultado la muerte celular principalmente de aquellas células a las que se une el conjugado de colorante de ftalocianina, tal como el conjugado de IR700 y anticuerpo, después de que las células se irradian con NIR, mientras que las células que no expresan la proteína de la superficie celular reconocida por la molécula de direccionamiento (*por ejemplo*, el anticuerpo) no se destruyen en cantidades significativas. Por tanto, debido a que la terapia está dirigida de manera específica a células enfermas, tales como células tumorales, sus efectos son muy selectivos para el tejido enfermo en comparación con el tejido o las células sanas. Por ejemplo, aunque un fotosensibilizador dirigido puede distribuirse por todo el cuerpo, solo está activo donde se aplica luz intensa, reduciendo la probabilidad de efectos colaterales.

En general, la fototoxicidad dirigida parece depender principalmente de la unión del conjugado de colorante a la membrana celular a través de la molécula de direccionamiento específica (por ejemplo, una macromolécula, tal como un anticuerpo). Por ejemplo, los estudios que utilizan una molécula de anticuerpo-IR700 ilustrativa indican que el conjugado debe estar unido a la membrana celular para que sea activo, y que la destrucción celular no requiere una localización intracelular para ser eficaz (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 8.524.239 y la solicitud publicada de Estados Unidos n.º US20140120119). La fotoactivación de las células unidas al conjugado da como resultado una rápida muerte celular y necrosis.

En general, los colorantes de ftalocianina, y en particular el IRDye 700DX (IR700), son colorantes extremadamente fotoestables. Por ejemplo, se informa que el IR700 es de 45 a 128 veces más fotoestable que otros colorantes del infrarrojo cercano y no tiene agregación (Peng *et al.* (2006) Proc. SPIE 6097, 60970E; véase también www.licor.com/bio/products/reagents/irdye/700dx/photostability.html). También se informa que el colorante IR700 no presenta los mismos problemas de agregación que otros colorantes cuando se formula a pH ácido. De manera análoga, Peng *et al.* informa que cuando el IR700 se conjuga con un anticuerpo, presenta de manera virtual los mismos espectros de excitación y absorción de fluorescencia que el colorante no conjugado, lo que indica que el conjugado conserva sus propiedades fluorescentes. En algunos aspectos, la fotoestabilidad del IR700 puede permitir su uso en aplicaciones en las que el colorante se expone a una excitación continua con luz durante períodos de tiempo prolongados y sin necesidad de protegerlo de la luz. Esto contrasta con otros colorantes fluoróforos que no son fotoestables y no pueden permanecer fluorescentes cuando se exponen a la luz durante un período prolongado.

En el presente documento se encuentra, sin embargo, que la conjugación del colorante a una molécula de direccionamiento, que es necesaria para la actividad de la PIT, reduce la estabilidad del colorante, de manera que el conjugado es más propenso a la agregación y tiene una actividad disminuida (por ejemplo, actividad de PIT). Este efecto se produce a pesar de que el colorante del monómero conserva su fotoestabilidad y sus propiedades fluorescentes. En algunos casos, particularmente para aplicaciones terapéuticas, esto puede reducir la actividad y por tanto limitar la eficacia del conjugado como agente de PIT. Este resultado no se muestra para otros colorantes conjugados (por ejemplo, conjugados IRDye 680) donde dichos colorantes presentan menos fotoestabilidad pero no son propensos a agregarse cuando se conjugan con otra molécula. Por tanto, se encuentra que conjugados de colorantes de ftalocianina, tales como IR700, utilizados para la PIT son particularmente sensibles a la formación de agregados solubles cuando se exponen a la luz en comparación con los conjugados de otros colorantes, que incluyen otros colorantes de 700 nm. En algunos aspectos, esto es un problema porque la fracción de pureza del monómero y la actividad farmacológica (por ejemplo, actividad de PIT) son necesarias para el uso terapéutico del conjugado de colorante de ftalocianina (por ejemplo, conjugado con IR700), ya que los cambios en la pureza o la actividad pueden provocar un impacto significativo en la actividad destructora activada por la luz.

Estas observaciones se basan, en parte, en el análisis de HPLC-SEC de conjugados de colorantes preparados o

expuestos a diferentes condiciones. Por ejemplo, los ejemplos proporcionados en el presente documento demuestran que la agregación de la porción de colorante unida de un conjugado de anticuerpo y colorante puede ocurrir cuando el conjugado se expone a la luz durante períodos de tiempo crecientes como lo demuestra un aumento en una especie de alto peso molecular que es mayor en tamaño que el máximo monomérico principal (compárense las figuras 1A y 1B). Los resultados también muestran que se produce una agregación sustancial de un conjugado de IR700 en presencia de luz blanca, que no se observa para los conjugados de IRDye 680 cuando se conjugan con la misma molécula (véase, por ejemplo, la figura 15A). En algunos casos, la estabilidad reducida del colorante puede significar que el conjugado de colorante es más susceptible a la agregación inducida por la luz que puede minimizar el uso del conjugado de colorante después de haber estado expuesto a la luz durante un tiempo prolongado. También se encuentra que la inestabilidad general del conjugado de colorante también es evidente cuando el conjugado se formula a pH ácido. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos, el conjugado de colorante presenta un aumento de la agregación a un pH inferior a 6,0.

Las observaciones proporcionadas establecen que, en algunos casos, la protección de la luz de los conjugados de colorante de ftalocianina es necesaria para minimizar la agregación y conservar la actividad, en particular para garantizar la coherencia en la fabricación de productos, tal como se utiliza de acuerdo con los métodos de buenas prácticas de fabricación (GMP). Por tanto, en el presente documento se proporcionan métodos para mejorar la estabilidad, por ejemplo, la integridad, la pureza, la actividad o la potencia, del conjugado de colorante. En algunas realizaciones, los métodos incluyen proteger el colorante o el conjugado de colorante de la luz de excitación durante una o más de las etapas de manipulación o preparación del colorante, realizar la conjugación del colorante con una molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo), formular el colorante y/o envasar el colorante. En algunas realizaciones, donde la luz es necesaria, por ejemplo, para visualizar los procesos de fabricación o producción del conjugado, la protección de la luz incluye realizar una o más, y en algunos casos todas, las etapas anteriores solo en presencia de luz verde, tal como en una longitud de onda que no es absorbida por el colorante, por ejemplo, una longitud de onda de o de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm. En algunas realizaciones, cualquier luz que esté presente durante una o más de las etapas anteriores tiene una intensidad inferior a 500 lux, tal como inferior a 200 lux. En algunas realizaciones, la exposición lumínica total a cualquier luz del colorante y el conjugado durante el proceso de elaboración, fabricación o producción del conjugado no es más de 5000 lux horas, tal como no más de 80 lux horas. En algunas realizaciones, la exposición lumínica total a cualquier luz del colorante y el conjugado durante el proceso de envasado del conjugado no es más de 5000 lux horas, tal como no más de 80 lux horas.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen formular el colorante en un tampón farmacéuticamente aceptable a un pH superior a 6,0, tal como generalmente de o de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente 8,0.

En algunas realizaciones, también se proporcionan métodos que incluyen proteger el conjugado de colorante de la luz de excitación mediante el envasado del producto farmacéutico en un recipiente(s) u otro artículo de fabricación que protege de la transmisión de la luz de modo que el recipiente(s) u otro artículo de fabricación no presente más del 40 % de transmisión de luz con una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, el recipiente u otro artículo de fabricación es uno en el que la transmitancia de cualquier luz es inferior al 5 % o no más del 5 %. En algunas realizaciones, dicho recipiente o artículo de fabricación que contiene el producto de conjugado de colorante es un material de envasado interno y se proporcionan uno o más recipientes o artículos de fabricación externos que encierran o revisten el material de envasado interno, tal como para proporcionar una mayor protección de la luz.

En algunas realizaciones, se proporciona un conjugado de colorante que es estable. En algunas realizaciones, mediante la práctica de los métodos proporcionados, la pureza, las impurezas, la integración, la composición y la potencia del conjugado no se modifican más que las especificaciones aceptables para fines de fabricación para respaldar los usos clínicos o comerciales. En las realizaciones, el conjugado es estable y presenta una agregación mínima y conserva la potencia y la actividad, tal como después del procesamiento, fabricación o almacenamiento del colorante. En algunas realizaciones, el conjugado de colorante es estable durante más de tres meses, cuatro meses, cinco meses, tal como generalmente durante más de 6 meses, más de 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más. En algunas realizaciones, dicha estabilidad está presente cuando se almacena durante el tiempo a una temperatura inferior a 30 °C, tal como generalmente a una temperatura de 2 a 8 °C.

Con referencia al conjugado de colorante, el término "estable" se refiere a un conjugado en el que, después del almacenamiento durante más de un tiempo requerido, tal como más de tres meses, por ejemplo, más de o más de aproximadamente 6 meses, 12 meses o 24 meses, más de o más del 90 % del conjugado está presente como componente monomérico principal como porcentaje del peso molecular total del conjugado presente en la muestra, no más del 10,0 % del conjugado existe como componente de alto peso molecular como porcentaje del peso molecular total del conjugado presente en la muestra o el conjugado conserva al menos el 20 % y hasta el 100 % de su integridad, tal como sus cualidades físicas y funcionales, que incluyen uno o más de su pureza (*por ejemplo*, porcentaje de contenido monomérico frente a agregados, tal como el contenido de componentes de mayor peso molecular), identidad (*por ejemplo*, composición química, tal como características estructurales), potencia (*por ejemplo*, concentración o cantidad necesaria para producir una respuesta farmacológica) o actividad (*por ejemplo*, destrucción por PIT) en

comparación con el conjugado antes del almacenamiento durante el tiempo requerido (por ejemplo, $t = 0$).

En algunas realizaciones, un conjugado es estable si, después del almacenamiento durante más de un tiempo requerido, tal como más de tres meses, tal como más de 6 meses, 12 meses o 24 meses, más del 90 % del conjugado existe como componente monomérico principal como porcentaje del peso molecular total del conjugado presente en la muestra, tal como más del 91 %, más del 92 %, más del 93 %, más del 94 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 % o más existe como componente monomérico principal como porcentaje del peso molecular total del conjugado presente en la muestra. En algunas realizaciones, el conjugado de colorante es estable si, después del almacenamiento durante más de tres meses, tal como más de 6 meses, 12 meses o 24 meses, no más del 10,0 % del conjugado existe como componente de alto peso molecular como porcentaje del peso molecular total del conjugado presente en la muestra, y generalmente no más del 9,0 %, no más del 8,0 %, no más del 7,0 %, no más del 6,0 %, no más del 5,0 %, no más del 4,0 % o no más del 3,0 % existe como componente de alto peso molecular como porcentaje del peso molecular total del conjugado presente en la muestra. En algunas realizaciones, la presencia de un componente de alto peso molecular o un componente monomérico principal se puede identificar utilizando cualquier método que pueda separar moléculas en función del tamaño, tal como mediante la realización de HPLC-SEC.

En algunas realizaciones, un conjugado es estable si, después de más de tres meses, tal como más de o más de aproximadamente 6 meses, 12 meses o 24 meses, su integridad, pureza, identidad, potencia o actividad se mantiene al menos o aproximadamente al menos en un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la integridad, pureza, identidad, potencia o actividad, respectivamente, del conjugado antes del almacenamiento durante el tiempo (por ejemplo, conjugado en $t = 0$). En algunas realizaciones, la potencia del conjugado puede relacionarse con la afinidad del conjugado por unirse a su molécula diana. En algunas realizaciones, la potencia se puede evaluar mediante su DE_{50} , es decir, la medida de la dosis o cantidad del conjugado que es farmacológicamente eficaz o que presenta un efecto deseado en el 50 % de los sujetos expuestos al conjugado. En algunas realizaciones, la actividad se relaciona con la actividad biológica, que incluye el efecto terapéutico y la actividad farmacológica, del conjugado que resulta en la administración *in vivo*, tal como la actividad del conjugado para inducir la destrucción por PIT. En algunas realizaciones, la actividad biológica se puede observar en sistemas *in vitro* diseñados para probar dichas actividades. En algunas realizaciones, la pureza del conjugado está relacionada con la presencia de monómeros del conjugado en comparación con los agregados (por ejemplo, componentes de alto peso molecular). En algunas realizaciones, la pureza se puede evaluar basándose en los porcentajes de monómeros (por ejemplo, máximo de monómeros principales) frente a agregados (por ejemplo, componentes de alto peso molecular) en la composición. En algunas realizaciones, la presencia de un componente de alto peso molecular o un componente monomérico principal se puede identificar utilizando cualquier método que pueda separar moléculas en función del tamaño, tal como mediante la realización de HPLC-SEC.

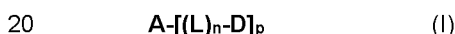
En algunas realizaciones, el principal componente monomérico de un conjugado de colorante generalmente se refiere a una especie de peso molecular del conjugado de colorante que representa el peso molecular combinado del colorante y la molécula de direccionamiento presentes en el conjugado. En general, el principal componente monomérico es la especie presente en mayor cantidad en una muestra de un conjugado de colorante. Por ejemplo, mediante métodos de HPLC-SEC, el principal componente monomérico es generalmente la especie de conjugado de colorante presente como el máximo más grande en una preparación de un conjugado de colorante. Su intervalo de peso molecular exacto en una muestra de conjugado de colorante depende de la muestra particular (por ejemplo, el colorante y la molécula de direccionamiento particular) y de los métodos de preparación (por ejemplo, la relación de colorante a molécula de direccionamiento). El experto en la materia reconocerá dicha especie. Por ejemplo, para un conjugado que contiene un colorante IR700 (que tiene un peso molecular de aproximadamente 1954,22 Da) y un anticuerpo (que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 150.000 Da para un anticuerpo de longitud completa), el intervalo de peso molecular del componente monomérico principal es normalmente de aproximadamente 151.000 Da a 165.000 Da, tal como 154.000 Da a 158.000 Da. En el experimento ilustrativo representado en la figura 1A y 1B, el principal componente monomérico de un conjugado de anticuerpo y colorante ilustrativo incluye los que eluyen mediante HPLC-SEC entre 8 y 9 minutos.

En algunas realizaciones, el componente de alto peso molecular de un conjugado de colorante generalmente se refiere a las especies de peso molecular del conjugado de colorante que presentan un peso molecular que es mayor que el peso molecular del componente monomérico principal. En algunas realizaciones, el peso molecular aumentado o mayor se puede deber a la agregación del colorante. En algunas realizaciones, la agregación se puede deber a la formación de dímeros, trímeros u oligómeros de orden superior. El intervalo de peso molecular exacto de un componente de alto peso molecular en una muestra de conjugado de colorante dependerá de la muestra en particular (por ejemplo, el colorante particular y la molécula de direccionamiento), de los métodos de preparación (por ejemplo, la proporción de colorante a la molécula de direccionamiento) y, en algunos casos, del grado o extensión de la agregación. El experto en la materia reconocerá dicha especie. En algunas realizaciones, para un conjugado de colorante de un anticuerpo completo y un colorante, tal como el colorante IR700, el componente de alto peso molecular se puede deber a la presencia de un dímero, trímero u oligómero de orden superior cualquiera que tenga un peso molecular generalmente superior a 200.000 Da, tal como superior a 300.000 Da, 350.000 Da, 400.000 Da, 450.000 Da, 500.000 Da o más. En el experimento ilustrativo representado en la figura 1A y 1B, los componentes de alto peso molecular de un conjugado de anticuerpo y colorante ilustrativo incluyen aquellos que eluyen mediante HPLC-SEC antes de 8 minutos, tal como entre 6 minutos y 8 minutos.

A. Conjugados que contienen un colorante de ftalocianina y una molécula de direccionamiento

Los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la fabricación de un conjugado que contiene un fotosensibilizador, tal como un colorante de ftalocianina, por ejemplo, IR700, y una molécula de direccionamiento (*por ejemplo*, un anticuerpo), tal como un anticuerpo que se une a una proteína de la superficie celular. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento que está conjugada con el fotosensibilizador, tal como un colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700), permite dirigir el conjugado a una molécula de la superficie celular, por ejemplo, un receptor de la superficie celular, de células implicadas en una enfermedad o afección, tal como un tumor o cáncer, infección, enfermedad o afección inflamatoria, enfermedad o afección neuronal u otra enfermedad o afección. En algunas realizaciones, el direccionamiento celular aumenta la eficacia de la PIT inducida por la irradiación local del sujeto, tal como la irradiación de un tumor en el sujeto, a una longitud de onda que es absorbida por el colorante de ftalocianina, tal como en una longitud de onda del infrarrojo cercano (NIR).

Los conjugados de colorante de ftalocianina para su uso en la terapia de combinación descrita en el presente documento incluyen, en general, una molécula de colorante conjugada con una molécula de direccionamiento a través de un grupo enlazador (cabe destacar que, en la invención reivindicada actualmente, el conjugado es como se define en las reivindicaciones adjuntas). En un aspecto de la presente divulgación general, el conjugado es de fórmula I:



en donde:

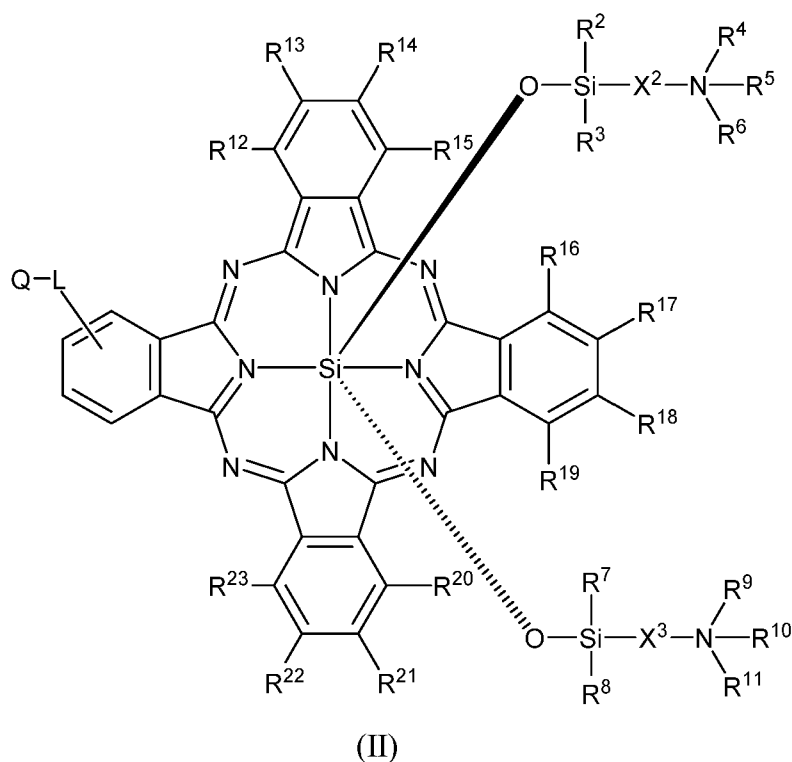
A es una molécula de direccionamiento que puede unirse a células o tejidos;
 L es un enlazador seleccionado de manera independiente para cada p; n es 1 o 2;
 D es un colorante de ftalocianina hidrófilo seleccionado de manera independiente para cada p; y
 p es de manera independiente 1, 2, 3, 4, 5 o mayor que 5, tal como hasta 1000. Por ejemplo, p puede ser de 1 a 1000, tal como generalmente 1 a 10 o 2 a 5.

Las ftalocianinas son un grupo de compuestos fotosensibilizadores que tienen el sistema de anillo de ftalocianina. Las ftalocianinas son azaporfirinas que contienen cuatro grupos benzoindol conectados por puentes de nitrógeno en un anillo de 16 miembros de átomos de carbono y nitrógeno alternos (es decir, $C_{32}H_{16}N_8$) que forman quelatos estables con cationes metálicos y metaloides. En estos compuestos, el centro del anillo está ocupado por un ion metálico (ya sea un ion diamagnético o paramagnético) que puede, dependiendo del ion, llevar uno o dos ligandos. Así mismo, la periferia del anillo puede estar sustituida o sin sustituir. La síntesis y el uso de una amplia variedad de ftalocianinas en la terapia fotodinámica se describen en la publicación internacional WO 2005/099689 y en la patente de Estados Unidos n.º 7.005.518.

En algunas realizaciones, las ftalocianinas absorben fuertemente la radiación roja o cercana al infrarrojo con máximos de absorción comprendidos entre aproximadamente 600 y 810 nm, que, en algunos casos, permite la penetración profunda de la luz en los tejidos. Las ftalocianinas generalmente son fotoestables. Normalmente, esta fotoestabilidad es ventajosa en pigmentos y colorantes y en muchas de las otras aplicaciones de las ftalocianinas.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina es soluble en agua y contiene una fracción de fluoróforo luminiscente que tiene al menos una fracción solubilizante en agua. En algunas realizaciones, la fracción solubilizante acuosa contiene silicio. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina tiene un átomo central tal como Si, Ge, Sn o Al. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina existe como un isómero de un solo núcleo, esencialmente sin otros isómeros. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina contiene un enlazador que tiene un grupo reactivo o activable, que es capaz de formar un enlace entre el enlazador y la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina se puede adaptar para que produzca fluorescencia a una longitud de onda particular.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina contiene un enlazador, es decir, es una fracción de colorante de ftalocianina y enlazador (L-D). En algunas realizaciones, el enlazador contiene un grupo reactivo. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina es de fórmula II:



en donde

- 5 L se selecciona de un enlace directo o un enlace covalente;
 Q es un grupo reactivo o un grupo activable que puede ser parte del enlazador L, y es cualquier grupo que pueda reaccionar para formar un enlace entre L y la molécula de direccionamiento A;
 R², R³, R⁷ y R⁸ cada uno se selecciona de manera independiente entre alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido;
 10 R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰ y R¹¹, si están presentes, cada uno se selecciona de manera independiente entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcanilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilo opcionalmente sustituido, alquilcarbamoilo opcionalmente sustituido o un ligando quelante, en donde al menos uno de R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ comprende un grupo soluble en agua;
 R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²² y R²³ son cada uno de los grupos funcionales que se pueden seleccionar de manera independiente de hidrógeno, halógeno, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido;
 15 o en una realización alternativa, al menos uno de i) R¹³ y R¹⁴, y los carbonos a los que están unidos, o ii) R¹⁷ y R¹⁸, y los carbonos a los que están unidos, o iii) R²¹ y R²², y los carbonos a los que están unidos, se unen para formar un anillo fusionado; y
 20 X² y X³ son cada uno de manera independiente alquileno C₁-C₁₀, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo.

En algunas realizaciones, L es un enlace covalente. En algunas realizaciones, el enlace covalente es lineal o ramificado, cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 60 átomos, tal como de 1 a 45 átomos o de 1 a 25 átomos. En algunos casos, dichos átomos se pueden seleccionar de C, N, P, O y S. En algunas realizaciones, L puede tener átomos de hidrógeno adicionales para llenar valencias (además de los 1 a 60 átomos). En general, el enlace contiene cualquier combinación de enlaces éter, tioéter, amina, éster, carbamato, urea, tiourea, oxi o amida; o enlaces simples, dobles, triples o aromáticos carbono-carbono; o enlaces de fósforo-oxígeno, fósforo-azufre, nitrógeno-nitrógeno, nitrógeno-oxígeno o nitrógeno-platino; o enlaces aromáticos o heteroaromáticos.

30 En algunas realizaciones, L es de fórmula -R¹-Y-X¹-Y¹-, en donde R¹ es un enlace directo o radical bivalente; Y e Y¹ se seleccionan cada uno de manera independiente de t un enlace directo, oxígeno, un nitrógeno opcionalmente sustituido o azufre; y X¹ se selecciona de t un enlace directo y alquileno C₁-C₁₀ opcionalmente interrumpido por un átomo. Los radicales bivalentes incluyen, pero sin limitación, alquileno opcionalmente sustituido, alquilenoxicarbonilo opcionalmente sustituido, alquilencarbamoilo opcionalmente sustituido, alquilenosulfonilo opcionalmente sustituido y arileno opcionalmente sustituido.

Los sustituyentes R¹ ilustrativos incluyen, pero sin limitación, alquileno opcionalmente sustituido, alquilenoxicarbonilo opcionalmente sustituido, alquilencarbamoilo opcionalmente sustituido, alquilenosulfonilo opcionalmente sustituido, alquilenosulfonilcarbamoilo opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, arilenosulfonilo opcionalmente

sustituido, arilenoxycarbonilo opcionalmente sustituido, arilenocarbamoilo opcionalmente sustituido, arilenosulfonilcarbamoilo opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido, carbamoilo opcionalmente sustituido, carbonilo opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, heteroarilenoxycarbonilo opcionalmente sustituido, heteroarilenocarbamoilo opcionalmente sustituido, heteroarilenosulfonilcarbamoilo opcionalmente sustituido, sulfonilcarbamoilo opcionalmente sustituido, tiocarbonilo opcionalmente sustituido, un sulfonilo opcionalmente sustituido y sulfinilo opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, Q contiene un grupo reactivo para la unión opcional a un material, tal como una molécula de direccionamiento. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "grupo reactivo" o "grupo químico reactivo" significa una fracción en el compuesto que es capaz de reaccionar de manera química con el grupo funcional en un material diferente (*por ejemplo*, molécula de direccionamiento) para formar un enlace, tal como un enlace covalente. Normalmente, el grupo reactivo es un electrófilo o nucleófilo que puede formar un enlace covalente mediante la exposición al grupo funcional correspondiente que es un nucleófilo o electrófilo, respectivamente. Como alternativa, el grupo reactivo es un grupo fotoactivable y se vuelve químicamente reactivo solo después de la iluminación con luz de una longitud de onda adecuada. Normalmente, la reacción de conjugación entre el colorante reactivo y la molécula de direccionamiento a conjugar da como resultado uno o más átomos del grupo reactivo Q incorporados en un nuevo enlace que une el colorante a la molécula de direccionamiento conjugada.

En algunas realizaciones, Q contiene un grupo reactivo que es reactivo con un grupo carboxilo, una amina o un grupo tiol en la molécula de direccionamiento. Los grupos reactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, un grupo químico reactivo con amina, un grupo químico reactivo con sulfhidrilo, un éster activado, un haluro de acilo, un haluro de alquilo, un anhídrido, un ácido carboxílico, una carbodiimida, un carbonato, un carbamato, una haloacetamida (*por ejemplo*, yodoacetamida), un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un éster de NHS, una fosforamida, un complejo de platino, un éster sulfonato y un tiocianato para la unión opcional a la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, los grupos reactivos son reactivos con un grupo carboxilo, una amina o un grupo tiol en una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el grupo reactivo es un grupo químico reactivo con sulfhidrilo tal como maleimida, haloacetilo y disulfuro de piridilo. En algunas realizaciones, el grupo reactivo es reactivo con amina. En algunas realizaciones, el grupo reactivo es un éster de NHS.

En algunas realizaciones, R^2 , R^3 , R^7 y R^8 son cada uno alquilo opcionalmente sustituido, tal como grupos metilo, etilo o isopropilo opcionalmente sustituidos.

En algunas realizaciones, al menos uno de R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} contiene un grupo soluble en agua. Por ejemplo, la porción alquilo de R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} está sustituida con un sustituyente soluble en agua. Como se utiliza en el presente documento, "grupo soluble en agua" se refiere a un grupo que comprende uno o más sustituyentes polares y/o iónicos que mejora la solubilidad de la molécula global en medios acuosos. En algunos casos, al menos dos de R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} comprenden grupos solubles en agua. En otras realizaciones, tres o más comprenden grupos solubles en agua. Los grupos solubles en agua incluyen, pero sin limitación, un grupo carboxilato ($-\text{CO}_2^-$), un grupo sulfonato ($-\text{SO}_3^-$), un grupo sulfonilo ($-\text{SO}_2^-$), un grupo sulfato ($-\text{SO}_4^{2-}$), un grupo hidroxilo ($-\text{OH}$), un grupo fosfato ($-\text{OPO}_3^{2-}$), un grupo fosfonato ($-\text{PO}_3^{2-}$), un grupo amina ($-\text{NH}_2$) y un nitrógeno cuaternizado opcionalmente sustituido, cada uno de los cuales tiene un contraión opcional.

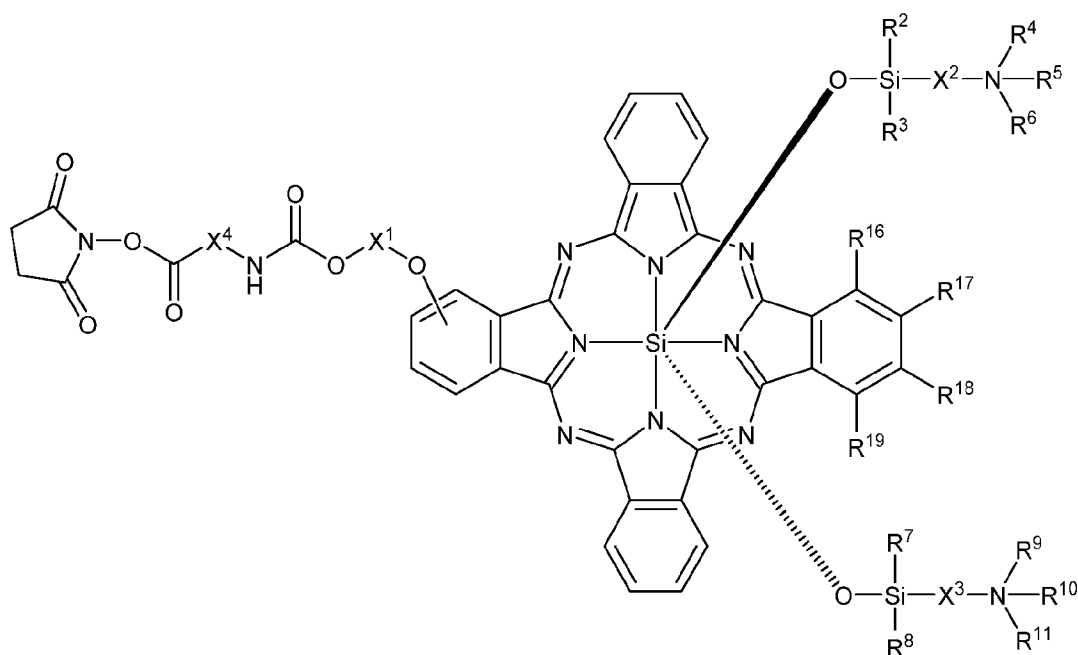
Los contraiones adecuados incluyen, pero sin limitación, sodio, potasio, calcio, amonio, sal amino orgánica o sal de magnesio o una sal similar. Preferentemente, el contraión es un contraión biológicamente aceptable.

En algunas realizaciones, el átomo o átomos de nitrógeno al que R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} y R^{11} se unen pueden ser trivalentes o tetravalentes.

En algunas realizaciones, R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} y R^{23} son cada uno hidrógeno.

En algunas realizaciones, X^2 y X^3 se seleccionan cada uno de manera independiente de alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ opcionalmente interrumpido por un átomo. En algunas realizaciones, los nitrógenos añadidos a X^2 y/o X^3 se pueden opcionalmente cuaternizar.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina es de fórmula III:



(III)

en donde

- 5 X¹ y X⁴ son cada uno de manera independiente un alquileo C₁-C₁₀ opcionalmente interrumpido por un heteroátomo; y
 R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, X² y X³ son como se define en el presente documento.

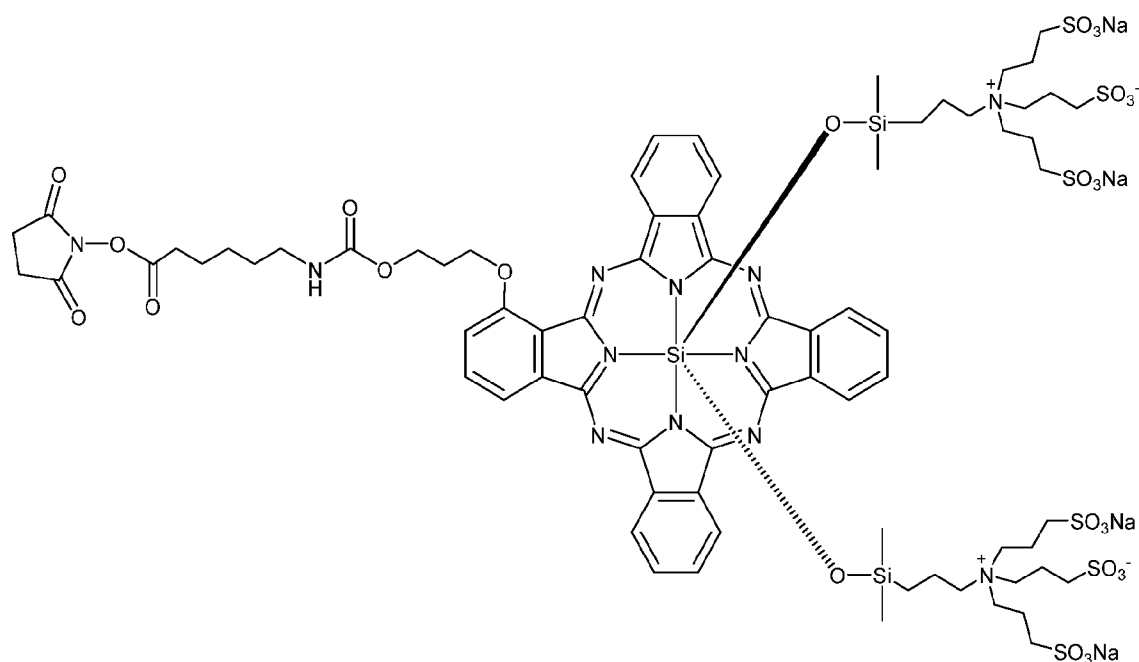
10 En algunas realizaciones, el grupo reactivo es un éster de NHS. En algunas realizaciones, la reactividad del éster de NHS se puede ajustar mediante la variación de la longitud del grupo alquileo de X⁴, entre el éster de NHS y la funcionalidad carbamato. En algunas realizaciones, la longitud del grupo alquileo de X⁴ entre el éster de NHS y la funcionalidad carbamato es inversamente proporcional a la reactividad del éster de NHS. En algunas realizaciones, X⁴ es alquileo C₅. En otras realizaciones, X⁴ es alquileo C₃. En algunas realizaciones, X¹ es alquileo C₆. En otras realizaciones, X¹ es alquileo C₃.

15 En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina tiene una carga electrónica total de cero. Esta neutralidad de carga puede, en determinados casos, obtenerse con uno o más contraiones opcionales o nitrógenos cuaternizados.

20 En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina tiene suficiente solubilidad en soluciones acuosas que una vez que se une a una molécula de direccionamiento soluble, la molécula de direccionamiento conserva su solubilidad. En algunas realizaciones, el colorante también es soluble en medios orgánicos (por ejemplo, DMSO o DMF).

25 En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina tiene una absorción de luz máxima en el infrarrojo cercano (intervalo NIR). En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina tiene una longitud de onda de absorción de luz máxima entre 600 nm y 850 nm, tal como entre 680 nm y 850 nm, por ejemplo, a aproximadamente 690 nm ± 50 nm o 690 ± 20 nm. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina se puede excitar de manera eficaz mediante diodos láser disponibles comercialmente que emiten luz en estas longitudes de onda.

30 En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina que contiene el grupo reactivo es el éster IR700 NHS, tal como el éster IRDye 700DX NHS (LiCor 929-70010, 929-70011). Por tanto, en algunas realizaciones, el colorante es un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



Fórmula química: $C_{74}H_{96}N_{12}Na_4O_{27}S_6Si_3$

Masa exacta: 1952,37

Peso molecular: 1954,22

Éster IRDye 700DX NHS

5

A efectos del presente documento, el término "IR700", "IRDye 700DX", o variaciones del mismo se refieren a la fórmula anterior cuando el colorante se conjuga con una molécula de direccionamiento, por ejemplo, a través de un grupo reactivo. En general, IR700 tiene varias propiedades químicas favorables. El IR700 reactivo con amino es un colorante relativamente hidrófilo y se puede conjugar de manera covalente con un anticuerpo utilizando el éster de NHS del IR700. Normalmente, el IR700 también tiene un coeficiente de extinción más de 5 veces superior ($2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ al máximo de absorción de 689 nm) al de los fotosensibilizadores convencionales tales como el derivado de la hematoporfirina Photofrin® ($1,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 630 nm), la metatetrahidroxifenilclorina; Foscan® ($2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 652 nm) y la mono-L-aspartilclorina e6; NPe6/Laserphyrin® ($4,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 654 nm).

10

15

Los colorantes de ftalocianina descritos en el presente documento se pueden preparar con material de partida disponible comercialmente. La estructura del núcleo se sintetiza mediante la condensación de dos o más diiminoisindolinas diferentes. Las estrategias sintéticas que utilizan diferentes dinitrilos o diiminoisindolinas pueden conducir a varios grados de sustitución de la ftalocianina y/o distribución de regioisómeros. Los esquemas sintéticos ilustrativos para generar los colorantes se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7.005.518.

20

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina se conjuga con una molécula de direccionamiento a través de un grupo reactivo de la molécula de colorante. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es aquella que puede dirigir el conjugado a una célula o patógeno, por ejemplo, mediante la unión a una molécula de la superficie celular (por ejemplo, un receptor de la superficie celular) en la célula o patógeno. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento, por ejemplo, una macromolécula, se puede unir de manera selectiva a un tipo de célula deseada, células con un fenotipo particular o células que presentan uno o más marcadores de la superficie celular o antígenos. En algunos casos, la molécula de direccionamiento se une a una célula que es una célula cancerosa, una célula tumoral, una célula inflamatoria, una célula inmunitaria, una neurona, una célula madre, una célula proliferativa o una célula en una hiperplasia. En algunos casos, la molécula de direccionamiento se une a un patógeno o una célula infectada por patógenos. En algunas realizaciones, la célula es una célula inflamatoria, tal como un leucocito, por ejemplo, un neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, un linfocito o un monocito. En algunas realizaciones, la célula es una célula inmunitaria, tal como un linfocito T, un linfocito B, un linfocito citolítico natural (NK), una célula dendrítica, un macrófago o un neutrófilo. En algunas realizaciones, la célula es una neurona que es una neurona del sistema nervioso periférico o una neurona del sistema nervioso central, tal como un nociceptor, por ejemplo, nociceptores térmicos, nociceptores mecánicos, nociceptores químicos o nociceptores polimodales. En algunos casos, la molécula de direccionamiento se une a un patógeno o una célula patógena, tal como un virus, bacteria, hongo, biopelícula u otro sistema de células procariotas. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une a un patógeno que es una bacteria gramnegativa o grampositiva.

30

35

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento (*por ejemplo*, un anticuerpo) del conjugado de colorante de ftalocianina se une a una proteína en la superficie de una célula o células presentes en un microambiente de una lesión que está asociada o presente como resultado de una enfermedad o afección. Por ejemplo, en algunas

realizaciones, el conjugado se une a una proteína en la superficie de una célula o células presentes en un microambiente tumoral asociado o presente en un tumor. En algunas realizaciones, el conjugado se une a una proteína presente en la matriz extracelular en el microambiente del tumor.

5 Como se utiliza en el presente documento, una "célula presente en el microambiente de una lesión" se refiere a cualquier célula presente en el entorno celular asociada con una lesión, una enfermedad o un trastorno, tal como cualquier célula presente en un tumor o inmediatamente adyacente a él, tal como las células presentes en un microambiente tumoral o la matriz extracelular en el microambiente tumoral.

10 Como se utiliza en el presente documento, una "célula presente en un microambiente tumoral" se refiere a cualquier célula presente en el entorno celular en el que existe el tumor, tal como cualquier célula presente en el tumor o inmediatamente adyacente a él, que incluye las células tumorales en proliferación (por ejemplo, células cancerosas), el estroma tumoral, vasos sanguíneos, células inflamatorias infiltrantes (*por ejemplo*, células inmunitarias) y una variedad de células tisulares asociadas (*por ejemplo*, fibroblastos). Por tanto, se entiende que la referencia al tumor se refiere no solo a las células tumorales, que pueden incluir células cancerosas o malignas, sino también a otras células presentes en el microambiente tumoral que regulan el crecimiento del tumor, que incluyen las células inmunitarias. En algunos casos, las células inmunitarias presentes en un microambiente tumoral pueden incluir linfocitos T, que incluyen linfocitos T reguladores (Treg), células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos B, macrófagos y otras células inmunitarias (Whiteside (2008) *Oncogene*, 27:5904-5912). Se reconoce que, en algunos aspectos, muchas células no cancerosas presentes dentro y alrededor del tumor pueden regular la proliferación, angiogénesis, invasión y/o metástasis de células tumorales, promoviendo así el crecimiento del tumor. Por tanto, en algunos casos, dirigirse a dichas células no cancerosas, tales como las células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T, tales como los linfocitos T reguladores), presentes en un tumor puede ser una terapia eficaz para destruir un tumor mediante PIT.

25 En general, las células cancerosas contienen antígenos específicos de tumores que son reconocidos por el sistema inmunitario. Normalmente, en un sistema inmunitario activo, las células inmunitarias, tales como los linfocitos T citotóxicos, atacan y eliminan estas células cancerosas. En condiciones fisiológicas normales, la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T se inicia mediante el reconocimiento de antígenos por el receptor de linfocitos T (TCR, del inglés "T cell receptor") y se regula mediante un equilibrio de señales estimuladoras e inhibitoras juntas (*por ejemplo*, proteínas de punto de control inmunitario). En particular, los linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan un TCR pueden activarse tras el reconocimiento de péptidos antigénicos presentados en células presentadoras de antígenos en moléculas de clase I o clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés "major histocompatibility complex"), respectivamente. En algunos aspectos, las células CD8+ activadas o linfocitos T citotóxicos, puede destruir las células tumorales que expresan el antígeno, que puede ser ayudado por la presencia de linfocitos T CD4+.

30 En el caso de los tumores, sin embargo, el microambiente tumoral tiene mecanismos para inhibir el sistema inmunitario, evadiendo así el reconocimiento inmunitario y evitando o reduciendo la destrucción de las células tumorales. Por ejemplo, en algunos casos, las proteínas de punto de control inmunitario se pueden desregular en los tumores, lo que da como resultado una supresión de la respuesta inmunitaria en el microambiente del tumor como un mecanismo para evadir el sistema inmunitario. En algunos casos, los linfocitos que infiltran el tumor pueden incluir Treg (por ejemplo, linfocitos T CD4+CD25+), que son células capaces de suprimir la proliferación de otros linfocitos T en el microambiente (Whiteside, T. L. (2008) *Oncogene*, 27:5904-5912). En algunos casos, otros mecanismos pueden actuar para inhibir el acceso de las células inmunitarias a los antígenos tumorales, contribuyendo también así a la capacidad de los tumores para evadir el sistema inmunitario.

40 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una molécula que se une a una proteína de la superficie celular en un tumor o célula cancerosa. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une a una proteína de la superficie celular en la superficie de un linfocito T, tal como un Treg, una célula dendrítica, un linfocito citolítico natural (NK), un linfocito B, un macrófago u otra célula inmunitaria que está presente en un microambiente tumoral. Por ejemplo, el tumor o la célula cancerosa puede estar asociada con un cáncer ubicado en la cabeza y el cuello, de mama, hígado, colon, ovario, próstata, páncreas, cerebro, cuello del útero, hueso, piel, ojo, vejiga, estómago, esófago, peritoneo o pulmón. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une a una célula, que es una célula madre cancerosa o una célula tumoral circulante.

55 Ejemplos de moléculas de direccionamiento, tales como macromoléculas, que incluyen las que se dirigen a un tumor o cáncer, incluyen, pero sin limitación, cualquiera como se describe en las solicitudes de publicación internacional PCT n.º WO2014120974, WO2014176284, WO2015042325, la patente de Estados Unidos n.º 8.524.239 o la publicación de patente de Estados Unidos n.º US20140120119.

60 Las moléculas de direccionamiento ilustrativas incluyen, pero sin limitación, una proteína, una glucoproteína, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un antígeno, un fragmento de unión a antígeno, un péptido, un polipéptido, una molécula pequeña, una molécula sintética polimérica, una nanopartícula polimérica, un liposoma, un sustrato enzimático, una hormona, un neurotransmisor, un metabolito celular, una partícula vírica, una cápside vírica, una nanopartícula vírica, una partícula bacteriana, un marcador, una célula, un hapteno, una avidina, una estreptavidina, una estreptavidina monomérica, una biotina, un hidrato de carbono, un oligosacárido, un polisacárido, un ácido

nucleico, un ácido desoxinucleico, un fragmento de ADN, un fragmento de ARN, trifosfatos de nucleótidos, trifosfatos de terminador de aciclo o PNA.

- En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un aminoácido, péptido, proteína, tiramina, polisacárido, fracción que forma complejos de iones, nucleósido, nucleótido, oligonucleótido, psoraleno, fármaco, hormona, lípido, conjunto lipídico, polímero, micropartícula polimérica, una célula biológica o un virus. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un antígeno, esteroide, vitamina, fármaco, metabolito, toxina, contaminación ambiental, polímero de ácidos nucleicos, hidrato de carbono, lípido o vidrio, plástico u otro polímero no biológico. En algunas realizaciones, las moléculas de direccionamiento es una célula, sistema celular, fragmento celular o partícula subcelular, por ejemplo, una partícula vírica, partícula bacteriana, componente vírico, célula biológica (tal como célula animal, célula vegetal, bacteria, levadura o protista) o componente celular. En algunas realizaciones, los colorantes reactivos pueden marcar grupos funcionales en la superficie celular, en las membranas celulares, orgánulos o citoplasma.
- En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se puede unir de manera selectiva a un tipo de célula deseado, células con un fenotipo particular o células que presentan uno o más marcadores de la superficie celular o antígenos. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una molécula de direccionamiento tumoral. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se puede unir a células tumorales o cancerosas. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se dirige o se une a un marcador o antígeno en la superficie celular, por ejemplo, una superficie celular de una célula tumoral.

- En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se dirige o se une a un antígeno, tal como cualquier sustancia estructural que sirva como diana capaz de unirse a la molécula. En algunas realizaciones, el antígeno es o está compuesto como parte de una molécula de la superficie celular, tal como una proteína, por ejemplo, un receptor, que se expresa en una superficie celular. En algunas realizaciones, por ejemplo, el antígeno es o está compuesto como parte de una molécula expresada en la superficie celular presente en un tumor, que incluye cualquier célula presente en el microambiente tumoral. Ejemplos de moléculas de la superficie celular a las que se puede unir una molécula de direccionamiento, incluyen, pero sin limitación, un antígeno, péptidos, lípidos, polisacáridos, hidratos de carbono o ácidos nucleicos que contienen determinantes antigénicos, tales como los reconocidos por una célula inmunitaria. En algunos ejemplos, un antígeno incluye un péptido específico de tumor (tal como uno que se encuentra en la superficie de una célula cancerosa) o un fragmento inmunogénico del mismo.

- En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un miembro de unión, tal como un ligando, capaz de unirse a una molécula de la superficie celular, tal como una proteína de la superficie celular, por ejemplo, un receptor de la superficie celular. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se selecciona de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), angiotensina II, factor natriurético auricular (ANF), bombesina, bradiquinina, factor neurotrófico procedente del cerebro (BDNF), proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), calcitonina, cardiotrofina 1 (BMP-2), CD22, CD40, pancreocimina, factor neurotrófico ciliar (CNTF), CCL1-CCL28, CXCL1-CXCL17, XCL1, XCL2, CX3CL1, péptido de unión a cripto 1, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), endotelina 1, endotelina 1/3, ligando FAS, factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF-4), factor de crecimiento de fibroblastos 5 (FGF-5), factor de crecimiento de fibroblastos 6 (FGF-6), factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-7), factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-10), Flt-3, gastrina, péptido liberador de gastrina (GRP), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), péptido similar al glucagón (GLP-1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ (IFN- γ), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), interleucina 11 (IL-11), interleucina 12 (IL-12), interleucina 13 (IL-13), interleucina 15 (IL-15), interleucina 17 (IL-17), interleucina 19 (IL-19), hormona luteinizante (LH), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 3a (MIP-3a), proteína inflamatoria de macrófagos 3b (MIP-3b), factor de crecimiento nervioso (NGF), neuromedina B, neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), neurotensina, neuropéptido Y, oxitocina, péptido activador de adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), factor de crecimiento procedente de plaquetas AA (PDGF-AA), factor de crecimiento procedente de plaquetas AB (PDGF-AB), factor de crecimiento procedente de plaquetas BB (PDGF-BB), factor de crecimiento procedente de plaquetas CC (PDGF-CC), factor de crecimiento procedente de plaquetas DD (PDGF-DD), netrina-1 (NTN1), netrina-2 (NTN2), netrina-4 (NTN4), netrina-G1 (NTNG1) y netrina-G2 (NTNG2), efrina A1 (EFNA1), efrina A2 (EFNA2), efrina A3 (EFNA3), efrina A4 (EFNA4), efrina A5 (EFNA5), semaforina 3A (SEMA3A), semaforina 3B (SEMA3B), semaforina 3C (SEMA3C), semaforina 3D (SEMA3D), semaforina 3F (SEMA3F), semaforina 3G (SEMA3G), semaforina 4A (SEMA4A), semaforina 4B (SEMA4B), semaforina 4C (SEMA4C), semaforina 4D (SEMA4D), semaforina 4F (SEMA4F), semaforina 4G (SEMA4G), semaforina 5A (SEMA5A), semaforina 5B (SEMA5B), semaforina 6A (SEMA6A), semaforina 6B (SEMA6B), semaforina 6D (SEMA6D), semaforina 7A (SEMA7A), SLIT1, SLIT2, SLIT3, familia similar a SLIT y NTRK, miembro 1 (SLITRK1), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 2 (SLITRK2), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 3 (SLITRK3), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 4 (SLITRK4), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 5 (SLITRK5), familia similar a SLIT y NTRK, miembro 6 (SLITRK6), prostaglandina E2 (PGE2),

RANTES, somatostatina-14, somatostatina-28, factor citoblástico (SCF), factor 1 procedente de células estromales (SDF-1), sustancia P, hormona estimulante tiroidea (TSH), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), trombina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Ent10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15 o Wnt16, Sonic hedgehog, Desert hedgehog e Indian hedgehog, o es un fragmento de unión al mismo que es capaz de unirse a su molécula de la superficie celular afín, tal como una proteína de la superficie celular, por ejemplo, un receptor de la superficie celular.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento puede ser un agente inmunomodulador, que se puede unirse a una molécula de la superficie celular o a una proteína en una célula inmunitaria para inhibir o activar la respuesta inmunitaria del cuerpo. En algunas realizaciones, la unión del agente inmunomodulador a la molécula o proteína de la superficie celular puede estimular una respuesta inmunitaria a un tumor y/o un patógeno, tal como mediante la inhibición de la inmunosupresión o mediante la mejora de la inmunoestimulación. En algunas realizaciones, la molécula o proteína de la superficie celular puede ser CD25, PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274, B7-H1), PD-L2 (CD273, B7-DC), CTLA-4, LAG3 (CD223), TIM3 (HAVCR2), 4-1BB (CD137, TNFRSF9), CXCR2, CXCR4 (CD184), CD27, CEACAM1, Galectina 9, BTLA, CD160, VISTA (homólogo de PD1), B7-H4 (VCTN1), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD28, HHLA2 (B7-H7), CD28H, CD155, CD226, TIGIT, CD96, Galectina 3, CD40, CD40L, CD70, LIGHT (TNFSF14), HVEM (TNFRSF14), B7-H3 (CD276), Ox40L (TNFSF4), CD137L (TNFSF9, GITRL), B7RP1, ICOS (CD278), ICOSL, KIR, GAL9, NKG2A (CD94), GARP, TL1A, TNFRSF25, TMIGD2, BTNL2, familia de la butirofilina, CD48, CD244, familia Siglec, CD30, CSF1R, MICA (secuencia A relacionada con el polipéptido MHC de clase I), MICB (secuencia B relacionada con el polipéptido MHC de clase I), NKG2D, familia KIR (receptor similar a la inmunoglobulina de células citotóxicas, familia LILR (receptores similares a la inmunoglobulina leucocitaria, CD85, ILTs, LIRs), SIRPA (proteína reguladora de señales α), CD47 (IAP), neuropilina 1 (NRP-1), un VEGFR o VEGF.

En algunas realizaciones, la molécula de la superficie celular puede ser un fosfolípido de la membrana celular, un peptidoglucano procariota, una proteína de envoltura de células bacterianas, una proteína de la cápside vírica, ACTHR, célula endotelial Anxa-1, aminopetidasa N, anti-IL-6R, integrina α -4, integrina α -5- β -3, integrina α -5- β -5, α -fetoproteína (AFP), ANPA, ANPB, APA, APN, APP, 1AR, 2AR, AT1, B1, B2, BAGE1, BAGE2, receptor de linfocitos B BB1, BB2, BB4, receptor de calcitonina, antígeno de cáncer 125 (CA 125), CCK1, CCK2, CD5, CD10, CD11a, CD13, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD45, CD52, CD56, CD68, CD90, CD133, CD7, CD15, CD34, CD44, CD206, CD271, CEA (antígeno carcinoembrionario), CGRP, receptores de quimiocina, anexina-1 de la superficie celular, plectina-1 de la superficie celular, cripto-1, CRLR, CXCR2, CXCR4, DCC, DLL3, glucoproteína E2, EGFR, EGFRvIII, EMR1, endosialina, EP2, EP4, EpCAM, EphA2, receptores de ET, fibronectina, fibronectina ED-B, FGFR, receptores de Frizzled, GAGE1, GAGE2, GAGE3, GAGE4, GAGE5, GAGE6, receptor GLP-1, receptores acoplados a la proteína g de la familia A (similares a la rodopsina), receptores acoplados a la proteína g de la familia B (similares al receptor de secretina), receptores acoplados a la proteína g de la familia C (similar al receptor metabotrópico de glutamato), GD2, GP100, GP120, glipicano-3, hemaglutinina, sulfatos de heparina, HER1, HER2, HER3, HER4, HMFG, antígenos de HPV 16/18 y E6/E7, hTERT, un receptor de interleucina (por ejemplo, IL-2R, IL11-R, IL-13R), ITGAM, calecreína-9, Lewis Y, receptor de LH, LHRH-R, LPA1, MAC-1, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MART1, MC1R, mesotelina, MUC1, MUC16, Neu (nucleolina de la superficie celular), neprilisina, neuropilina-1, neuropilina-2, NG2, NK1, NK2, NK3, NMB-R, Notch-1, NY-ESO-1, OT-R, mutante p53, antígeno de melanoma p97, NTR2, NTR3, p32 (p32/gC1q-R/HABP1), p75, PAC1, PAR1, Patched (PTCH), PDGFR, receptores de PDGF, PDT, colágeno IV escindido por proteasa, proteinasa 3, prohibitina, proteína tirosina cinasa 7, PSA, PSMA, familia P2X purinérgica (por ejemplo, P2X1-5), mutante Ras, RAMP1, RAMP2, RAMP3 parcheado, receptor de RET, plexinas, smoothened, sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4, sst5, sustancia P, TEMs, receptor CD3 de linfocitos T, TAG72, TGFB1, TGFB2, Tie-1, Tie-2, Trk-A, Trk-B, Trk-C, TR1, TRPA, TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP (por ejemplo, TRPV1-6, TRPA1, TRPC1-7, TRPM1-8, TRPP1-5, TRPM1, 1-3), receptor de TSH, receptores de VEGF (VEGFR1 o Flt-1, VEGFR2 o FLK-1/KDR, y VEGF-3 o FLT-4), canales iónicos dependientes de voltaje, VPAC1, VPAC2, tumor 1 de Wilms, Y1, Y2, Y4 o Y5.

En algunas realizaciones, la molécula de la superficie celular puede ser HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (receptor de IL-2R α), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, antígeno de cáncer 125 (CA125), α -fetoproteína (AFP), Lewis Y, TAG72, caprina-1, mesotelina, receptor de PDGF, PD-1, PD-L1, CTLA-4, receptor IL-2, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, glipicano-3, gpA33, mucinas, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, gangliósidos (tales como GD2, GD3, GM1 y GM2), receptor de VEGF (VEGFR), integrina α V β 3, integrina α 5 β 1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, tenascina, AFP, complejo BCR, CD3, CD18, CD44, CTLA-4, gp72, HLA-DR 10 β , antígeno HLA-DR, IgE, MUC-1, nuC242, antígeno PEM, metaloproteinasas, receptor de efrina, ligandos de efrina, receptor de HGF, CXCR4, CXCR4, receptor de bombesina o antígeno SK-1.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une de manera específica a un antígeno, tal como una molécula de la superficie celular en una célula tumoral. Entre dichos anticuerpos se incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos capaces de unirse a una molécula de la superficie celular, tal como una proteína de la superficie celular, por ejemplo, un receptor de la superficie celular, descritos en el presente documento. En algunos casos, el anticuerpo se puede unir a un antígeno de una proteína expresada en una célula en un tumor, que incluye una proteína específica del tumor.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une a un antígeno o proteína de manera directa o indirecta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una segunda molécula de unión que se une a una primera molécula de unión que es capaz de unirse al antígeno o proteína. Por ejemplo, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo secundario, que se une a una primera molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo primario, capaz de unirse a la proteína o al antígeno, por ejemplo, una proteína de la superficie celular o un receptor de la superficie celular. Por tanto, en algunas realizaciones, el colorante se conjuga con un anticuerpo secundario.

Un "anticuerpo" es un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o de cadena pesada que reconoce de manera específica, y se une, a un epítipo de un antígeno, tal como una proteína específica del tumor. En general, los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominadas región variable pesada (V_H) y región variable ligera (V_L). En conjunto, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo.

Los anticuerpos incluyen inmunoglobulinas inalteradas y fragmentos de anticuerpos que presentan unión a antígenos, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab)_2$, proteínas Fv monocaténarias ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"). Una proteína de scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un enlazador, mientras que en dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas modificadas de manera genética tales como anticuerpos quiméricos, por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, tales como anticuerpos biespecíficos. Véanse también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J. Immunology, 3.^a ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Normalmente, una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas pesadas (H) y ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadenas pesadas, o isotipos, que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, también conocidas como "dominios". En combinación, las regiones variables de la cadena pesada y ligera generalmente se unen de manera específica al antígeno. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada pueden contener una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". La extensión de la región marco y las CDR se han definido (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., 1991). La base de datos de Kabat actualmente se encuentra en línea. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, tales como en seres humanos. La región marco de un anticuerpo, esto es, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son responsables normalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente empezando desde el extremo N, y generalmente también se identifican por la cadena en la que está ubicada la CDR particular. Por tanto, una CDR3 V_H está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Anticuerpos con diferentes especificidades, tales como con diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos, tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solamente un número limitado de posiciones de los aminoácidos de las CDR están directamente implicadas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan restos determinantes de la especificidad (SDR, del inglés "specificity determining residues").

Las referencias a " V_H " o " VH " se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye la de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a " V_L " o una " VL " se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, que incluye la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Entre los anticuerpos proporcionados se encuentran fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une al antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab)_2$; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocaténario (*por ejemplo*, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Otros fragmentos de anticuerpo o anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo incluyen un scFv multivalente, un scFv biespecífico o un dímero de scFv y CH3. Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante diversas técnicas, que incluyen, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado, así como producción mediante células hospedadoras recombinantes.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de la cadena ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se

producen mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la preparación de células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

- 5 Un "anticuerpo quimérico" tiene restos marco de una especie, tal como de seres humanos y CDR, que generalmente confieren unión a antígenos, de otra especie, tal como un anticuerpo murino que se une de manera específica a mesotelina.

10 Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante", y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptor". En algunas realizaciones, las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que estén presentes las regiones constantes, pero en caso de haberlas, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, tales como al menos aproximadamente del 85 al 90 %, tal como aproximadamente un 95 % o más idénticas. Por lo tanto, partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. El marco aceptor de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante. Los anticuerpos humanizados u otros monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras de aminoácidos adicionales que no tengan sustancialmente ningún efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones de las inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas humanizadas se pueden construir mediante ingeniería genética (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.585.089).

25 Un anticuerpo "humano" (también llamado anticuerpo "completamente humano") es un anticuerpo que incluye regiones marco humanas y CDR de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, el marco y las CDR son de la misma secuencia de aminoácidos de cadena ligera y/o pesada humana originaria. Sin embargo, las partes de un anticuerpo humano se pueden genomanipular para incluir CDR de un anticuerpo humano diferente. Partes de una inmunoglobulina humana pueden ser sustancialmente idénticas a partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana natural.

35 "Se une de manera específica" se refiere a la capacidad de una molécula, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, para unirse de manera específica a un antígeno, tal como un antígeno específico de tumor, en relación con la unión a proteínas no relacionadas, tales como proteínas no tumorales, por ejemplo, β -actina. En algunas realizaciones, una molécula, tal como un anticuerpo o un fragmento, que incluye una molécula, tal como un anticuerpo o un fragmento, unido a una molécula de colorante de ftalocianina, se une específicamente a una diana, tal como una proteína de la superficie celular, con una constante de unión que es al menos 10^3 M^{-1} mayor, 10^4 M^{-1} mayor o 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra o sujeto. En algunas realizaciones, una molécula, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, tiene una constante de asociación de equilibrio (K_A) mayor o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} , mayor o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} , mayor o igual a aproximadamente 10^8 M^{-1} o mayor o igual a aproximadamente 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o 10^{12} M^{-1} . Los anticuerpos también se pueden caracterizar por una constante de disociación de equilibrio (K_D) de 10^{-6} M , 10^{-7} M , 10^{-8} M , 10^{-10} M , 10^{-11} M o 10^{-12} M o menor. En algunas realizaciones, una constante de disociación de equilibrio (K_D) puede ser de 1 nM o menos. Las constantes de afinidad, tales como K_D o K_A , se pueden estimar de manera empírica o las afinidades se pueden determinar de manera comparativa, por ejemplo, mediante la comparación de la afinidad de un anticuerpo y otro anticuerpo por un antígeno particular. Por ejemplo, dichas afinidades se pueden determinar fácilmente utilizando técnicas conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) competitivo o utilizando un dispositivo de resonancia de plasmón de superficie, tal como el Biacore T100 (disponible en Biacore, Inc., Piscataway, N.J.), un radioinmunoensayo que utiliza antígeno diana radiomarcado o mediante otro método conocido por el experto en la materia.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) se conjuga con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. Por ejemplo, en algunos aspectos, el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento es un conjugado de IR700 y anticuerpo. Los anticuerpos ilustrativos a los que se puede conjugar el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) incluyen, pero sin limitación, cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, trastuzumab, ado-trastuzumab emtansina, tositumomab (Bexxar®), rituximab (Rituxan, Mabthera), ibritumomab tiuxetan (Zevalin), daclizumab (Zenapax), gemtuzumab (Mylotarg), alemtuzumab, fragmento Fab de escaneo CEA, anticuerpo monoclonal OC125, ab75705, B72.3, bevacuzimab (Avastin®), afatinib, axitinib, bosutinib, cabozantinib, ceritinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, erlotinib, everolimus, ibrutinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, nilotinib, olaparib, palbociclib, pazopanib, pertuzumab, ramucirumab, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, temsirolimus, trametinib, vandetanib, vemurafenib, vismodegib, basiliximab, ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, MPDL3280A, pidilizumab (CT-011), MK-3475, BMS-936559, MPDL3280A, tremelimumab, IMP321, BMS-986016, LAG525, urelumab, PF-05082566, TRX518, MK-4166, dacetuzumab, lucatumumab, SEQ-CD40, CP-870, CP-893, MEDI6469, MEDI6383, MOXR0916, AMP-224, MSB0010718C, MEDI4736, PDR001, rHIgM12B7, ulocuplumab, BKT140, varlilumab (CDX-1127), ARGX-110,

MGA271, lirilumab (BMS-986015, IPH2101), IPH2201, AGX-115, emactuzumab, CC-90002 y MNRP1685A o un fragmento de unión a anticuerpo de los mismos.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un péptido de asentamiento específico de tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido de asentamiento puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 52. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un polipéptido RGD, tal como un polipéptido iRGD, un polipéptido Lyp-1, un polipéptido de unión a cripto-1, un polipéptido de unión al receptor de somatostatina o un polipéptido de unión a prohibitina, un polipéptido NGR o un polipéptido iNGR.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un péptido de penetración celular activable (ACPP) compuesto por un péptido de penetración celular (CPP) policatiónico conectado mediante un enlazador escindible a un polianión de neutralización. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ACPP comprende la estructura: A-X1-B-, en donde B es una porción de péptido de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos básicos, que es adecuado para la captación celular; A es una porción de péptido de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos ácidos, que cuando se une con la porción B es eficaz para inhibir o evitar la captación celular de la porción B; X1 es un enlazador escindible de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos; y uno o más de L-Y están unidos al extremo carboxílico de la porción B de péptido.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una partícula vírica, tal como una partícula de tipo vírica, una nanopartícula de tipo vírica o una cápside vírica. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una nanopartícula de tipo vírica. En algunas realizaciones, la nanopartícula de tipo vírica se ensambla a partir de proteínas de la cápside L1. En algunas realizaciones, la nanopartícula de tipo vírica se ensambla a partir de una combinación de proteínas de la cápside L1 y L2. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une e infecta a las células. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una descrita en el documento WO2015042325.

En algunas realizaciones, una partícula de tipo vírica (VLP, del inglés "virus-like particle") se refiere a una estructura organizada similar a una cápside, tal como de forma aproximadamente esférica o cilíndrica, que comprende matrices ordenadas de autoensamblaje de capsómeros L1 o L1 y L2 y no incluye un genoma vírico. En algunas realizaciones, las partículas de tipo víricas son morfológicamente y antigénicamente similares a los viriones auténticos, pero carecen de material genético vírico, tal como el ácido nucleico vírico, lo que hace que las partículas no sean infecciosas. Se puede utilizar una VLP para administrar a una célula receptora un agente, tal como agente profiláctico, agente terapéutico o agente de diagnóstico, o una molécula de ADN o ARN circular o lineal encerrada.

En algunas realizaciones, las VLP pueden tener inmunogenia y/o antigenicidad modificadas con respecto a las VLP de tipo silvestre. Las VLP pueden, por ejemplo, ensamblarse a partir de capsómeros que tienen una proteína de la cápside variante con inmunogenia y/o antigenicidad modificadas. En algunas realizaciones, una proteína de la cápside variante con inmunogenia y/o antigenicidad modificada es aquella que se modifica de manera natural o sintética, tal como se muta, sustituye, elimina, pega o inserta, en un aminoácido para reducir o evitar el reconocimiento de la proteína de la cápside mediante la existencia previa, tal como los anticuerpos endógenos específicos de serotipo vírico. Una proteína de la cápside variante puede ser una variante L1 del papilomavirus humano (VPH), una variante L1 del papilomavirus no humano o una variante L1 del papilomavirus basada en una combinación de aminoácidos de diferentes serotipos del VPH.

En algunas realizaciones, una VLP es una VLP del papilomavirus. La VLP puede ser una VLP del papilomavirus humano, tal como procedente de un virus que puede infectar a seres humanos, mientras que, en otras realizaciones, la VLP puede ser una VLP del papilomavirus no humano. Los ejemplos de VLP no humanas incluyen las procedentes de, sin limitación, papilomavirus bovino, papilomavirus murino, papilomavirus del conejo de cola de algodón y partículas de papilomavirus macaco o macaco de la India. En algunas realizaciones, las VLP son nanopartículas de tipo víricas del papilomavirus bovino, tal como nanopartículas de tipo víricas de tipo 1, tales como las ensambladas a partir de proteínas de la cápside L1 del BPV o una combinación de proteínas de la cápside L1 del BPV y L2 del BPV.

En algunas realizaciones, una proteína de la cápside se refiere a un monómero de proteína, varios de los cuales forman un oligómero capsomérico. En algunas realizaciones, un capsómero se refiere a la unidad estructural oligomérica básica de una cápside vírica, que es una cubierta externa de proteína que protege el material genético de un virus. En algunas realizaciones, las proteínas de la cápside pueden incluir, proteínas de la cápside principal L1 del papilomavirus y proteínas de la cápside menor L2 del papilomavirus. En algunas realizaciones, las VLP contienen solo proteínas de la cápside L1, mientras que, en otras realizaciones, las VLP contienen una mezcla o combinación, de proteínas de la cápside L1 y L2.

En algunas realizaciones, el porcentaje de proteínas de la cápside L1 en una partícula de tipo vírica es mayor que el porcentaje de proteínas de la cápside L2 en la partícula de tipo vírica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el porcentaje de proteínas de la cápside L1 en una partícula de tipo vírica es del 80 % al 100 % del número total de proteínas de la cápside en la partícula de tipo vírica. En algunas realizaciones, el porcentaje de proteínas de la cápside L1 en una partícula de tipo vírica es al menos o es aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de proteínas de la cápside L2 en una partícula de tipo vírica es del 1 % al 25 % del número total de proteínas de la cápside en la partícula de tipo vírica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el porcentaje de proteínas de la cápside L2 en una partícula de tipo vírica es al menos o aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 %.

En algunas realizaciones, una partícula de tipo vírica contiene de 12 a 72 proteínas L2. En algunas realizaciones, una partícula de tipo vírica contiene 360 proteínas L1 y de 12 a 72 proteínas L2. En algunas realizaciones, las proteínas de la cápside se ensamblan en nanopartículas de tipo víricas que tienen un diámetro de 20 a 60 nm. Por ejemplo, las proteínas de la cápside pueden ensamblarse en nanopartículas de tipo víricas que tienen un diámetro de al menos o aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 nm.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una DARPin (proteína de repetición de anquirina genomanipulada). Normalmente, las DARPins proceden de proteínas de repetición de anquirina naturales y se unen a proteínas que incluyen, *por ejemplo*, receptores humanos, citocinas, cinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana (Molecular Partners AG Zurich Suiza; véase el Capítulo 5. "Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPins): From Research to Therapy", Methods in Enzymology, vol 503: 101-134 (2012); y "Efficient Selection of DARPins with Sub-nanomolar Affinities using SRP Phage Display", J. Mol. Biol. (2008) 382, 1211-1227. En algunas realizaciones, la DARPin es una proteína mimética de anticuerpos que tiene alta especificidad y alta afinidad de unión a una proteína diana, que se prepara mediante ingeniería genética. En algunas realizaciones, las DARPins tienen una estructura que comprende al menos 2 motivos de repetición de anquirina, por ejemplo, que comprenden al menos 3, 4 o 5 motivos de repetición de anquirina. Las DARPins pueden tener cualquier peso molecular adecuado dependiendo del número de motivos repetidos. Por ejemplo, las DARPins que incluyen 3, 4 o 5 motivos de repetición de anquirina pueden tener un peso molecular de aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 14 kDa o aproximadamente 18 kDa, respectivamente.

En algunas realizaciones, la DARPin incluye una parte central que proporciona estructura y una parte de unión a la diana que reside fuera del núcleo y se une a una diana. En algunas realizaciones, el núcleo estructural incluye una secuencia de aminoácidos conservada y la porción de unión a la diana incluye una secuencia de aminoácidos que difiere dependiendo de la diana.

En algunas realizaciones, el conjugado contiene una cantidad de restos de colorante por molécula de direccionamiento que es de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000, tal como de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 100, de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5. En algunas realizaciones, la proporción de moléculas de colorante a la molécula de direccionamiento es o es aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 50:1, 75:1, 100:1, 150:1, 200:1, 250:1, 300:1, 350:1, 400:1, 450:1, 500:1, 550:1, 600:1, 650:1, 700:1, 750:1, 800:1, 850:1, 900:1, 950:1 o 1000:1, o se encuentra entre o entre aproximadamente dos de dichos valores. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento puede contener hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 moléculas de colorante. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento puede contener más de 1000 moléculas de colorante o menos de 10 moléculas de colorante.

En algunas realizaciones, como cuando la molécula de direccionamiento es un polipéptido, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, el número de moléculas de colorante por molécula de direccionamiento puede ser de o de aproximadamente 2 a 5, tal como de o de aproximadamente 2 a 4, por ejemplo, aproximadamente 3 o 3. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando la molécula de direccionamiento es una nanopartícula, tal como una partícula de tipo vírica (VLP), el número de moléculas de colorante a la molécula de direccionamiento puede ser de o de aproximadamente 10 a 1000, de 10 a 500, de 50 a 500 o de 50 a 1000. Por tanto, en algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento puede contener de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 moléculas de colorante.

En algunas realizaciones, como cuando la molécula de direccionamiento es una VLP, más de una molécula de colorante se puede conjugar con una sola proteína de la cápside. Por ejemplo, una sola proteína de la cápside, tal como la proteína de la cápside L1 o L2, puede conjugarse a de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5, moléculas de colorante. Por tanto, más de un aminoácido de una proteína de la cápside puede conjugarse con una molécula de colorante. En algunas realizaciones, una sola proteína de la cápside puede conjugarse con 1 a 2, 1 a 3 o 2 a 3 moléculas de colorante. Por tanto, una molécula de colorante puede conjugarse con 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos diferentes, tales como lisina, arginina y/o histidina, u otro aminoácido, de una sola proteína de la cápside.

B. Preparación del conjugado de colorante y molécula de direccionamiento protegida de la luz

En el presente documento se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un método o proceso para preparar un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento, tal como un conjugado de IR700 y molécula de direccionamiento (por ejemplo, IR700-anticuerpo), en condiciones de protección contra la luz. En algunas realizaciones, el método incluye 1) preparar o proporcionar un colorante de ftalocianina y una molécula de

direccionamiento; 2) poner en contacto la molécula diana y el colorante de ftalocianina en condiciones para producir o generar el conjugado con una exposición mínima del colorante; y 3) formular, purificar y/o aislar el conjugado para producir una composición que contenga la sustancia farmacéutica, donde una o más de las etapas, tal como, en algunos casos, todas las etapas, se realizan con una exposición mínima del colorante o el conjugado que contiene el colorante a la luz ambiental.

En algunas realizaciones, antes, durante y después de la preparación del colorante y/o el conjugado no está expuesto a ninguna luz ambiental o no está expuesto a luz con una intensidad superior a 700 lux, superior a 600 lux, superior a 500 lux, superior a 400 lux, superior a 300 lux, superior a 200 lux o superior a 100 lux. En algunas realizaciones, el colorante y/o el conjugado no se expone a luz con una intensidad superior a 700 lux durante más de 20 minutos, durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos. En algunas realizaciones, el colorante y/o el conjugado no se expone a luz con una intensidad superior a 200 lux durante más de 20 minutos, durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos.

En algunas realizaciones, antes, durante o después de una o más etapas del método o todas las etapas del método, el colorante y/o conjugado están protegidos de la luz ambiental, tal como luz en el intervalo del infrarrojo (IR) cercano. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la preparación del conjugado tiene una longitud de onda que no es absorbida por el colorante o que no es absorbida de manera sustancial por el colorante. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la preparación de la sustancia farmacéutica hay luz verde. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la preparación de la sustancia farmacéutica tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 650 nm, tal como de 400 nm a 600 nm, 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm.

En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el colorante y/o el conjugado durante una o más o todas las etapas del método tiene una longitud de onda que no es absorbida por el colorante o que no es absorbida de manera sustancial por el colorante y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el colorante y/o el conjugado durante una o más o todas las etapas del método es la luz verde que tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado durante una o más o todas las etapas del método tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 650 nm, tal como de 400 nm a 600 nm, 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux.

En algunas realizaciones, antes, durante y después de la preparación, producción, formulación y/o envasado del colorante y/o conjugado no está expuesto a ninguna luz ambiental o tiene una exposición total a la luz de no más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas. En algunas realizaciones, en los métodos proporcionados en el presente documento, el colorante y/o el conjugado no está expuesto a ninguna luz ambiental o tiene una exposición total a la luz de no más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas, durante la realización de todo el método. Por ejemplo, la exposición total a la luz del colorante y/o conjugado durante todo el método o antes, durante y después de la preparación, producción, formulación y/o envasado del colorante y/o conjugado es no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas. La exposición total a la luz se determina multiplicando la intensidad de la iluminación (lux) por el tiempo de exposición (horas).

En algunas realizaciones, durante una o más o todas las etapas de los métodos proporcionados en el presente documento, la exposición total del colorante y/o conjugado a cualquier luz es no más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas. Por ejemplo, la exposición total a la luz del colorante y/o conjugado durante la etapa de envasado no es más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas.

En algunas realizaciones, el colorante y/o el conjugado se protege de la luz durante una o más o todas las etapas del método mediante la realización de los procedimientos del método utilizando uno o más recipientes que protegen el contenido de la luz o determinadas longitudes de onda o intensidades de luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, en los métodos se utilizan uno, dos o tres o más recipientes protegidos de la luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el recipiente tiene una transmitancia de luz de no más del 50 %, no más del 40 %, no más del 30 %, no más del 20 %, no más del 10 %, no más del 5 % o no más del 1 %. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmitancia de luz que tiene una longitud de onda entre o entre aproximadamente 250 nm y 800 nm, tal como entre o entre aproximadamente 250 nm y 450 nm, 400 nm y 800 nm, 450 nm y 650 nm, 500 nm y 725 nm, 600 nm y 720 nm o 650 nm y 725 nm, o no transmite ninguna intensidad de luz superior a 700 lux, 600 lux, 500 lux, 400 lux, 300 lux, 200 lux o 100 lux. En algunas realizaciones, el colorante y/o conjugado se prepara en un recipiente translúcido u opaco. En algunas realizaciones, el recipiente es verde, azul o ámbar. En algunas realizaciones, el recipiente está

cubierto con una sustancia opaca, tal como una lámina, tal como una lámina de aluminio. En algunas realizaciones, el recipiente está cubierto con material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el recipiente es un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco y/o una caja.

5 En algunas realizaciones, los métodos de fabricación de un conjugado incluyen una etapa de preparación o producción del conjugado. En algunas realizaciones, dichos métodos incluyen proporcionar un colorante de ftalocianina. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina se proporciona en forma acuosa, tal como una solución acuosa. En algunas realizaciones, el colorante se proporciona en forma liofilizada, tal como un polvo liofilizado, y se reconstituye
10 o se disuelve en un disolvente para formar una solución acuosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina que contiene el grupo reactivo, por ejemplo, éster de NHS IR 700, se disuelve en un disolvente. En algunas realizaciones, los métodos incluyen una etapa de disolución del colorante de ftalocianina en un disolvente, tal como antes de la conjugación del colorante a una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el disolvente es un disolvente orgánico, tal como dimetilsulfóxido (DMSO) o DMF. En algunos ejemplos, el disolvente es
15 un disolvente basado en agua. En algunas realizaciones, el colorante se disuelve en disolvente a una concentración en un intervalo de o de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, de 1 mg/ml a 50 mg/ml, de 1 mg/ml a 15 mg/ml, o se disuelve en disolvente a una concentración de, o de aproximadamente, 10 mg/ml.

20 En algunas realizaciones, durante las etapas de preparación del colorante para su uso en el método, el colorante de ftalocianina, tal como el éster de NHS IR700, está protegido de la exposición a la luz ambiental. En algunas realizaciones, antes, durante y después de la preparación del colorante de ftalocianina, el colorante no se expone a la luz, tal como la luz ambiental, o solo se expone a luz con una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 650 nm, tal como de o de aproximadamente 425 nm a 475 nm. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina no se expone a la luz con una intensidad superior a 700 lux, o no se expone a la luz con
25 una intensidad superior a 700 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina no se expone a la luz con una intensidad superior a 200 lux, o no se expone a la luz con una intensidad superior a 200 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos.

30 En algunas realizaciones, las etapas de preparación o producción de un conjugado incluyen proporcionar una molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo) para la conjugación con el colorante de ftalocianina, tal como IR700. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se prepara antes de la conjugación con el colorante de ftalocianina. En algunas realizaciones, la preparación de la molécula de direccionamiento incluye concentrar o diluir la molécula de direccionamiento a una cantidad o concentración particular antes de la reacción de conjugación. En algunas realizaciones, la preparación de la molécula de direccionamiento incluye el intercambio de la molécula de
35 direccionamiento en un tampón, tal como un tampón que sea compatible o adecuado para la reacción de conjugación. En algunas realizaciones, la preparación de las moléculas de direccionamiento incluye ajustar el pH a un pH adecuado para su uso en la reacción de conjugación. Por ejemplo, la molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo, se prepara a un pH entre o entre aproximadamente 6 y 10, tal como entre o entre aproximadamente 8 y 9, tal como aproximadamente 8,5, tal como de 8,46.

40 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo, se intercambia tampón en un tampón, tal como el uso de ultrafiltración/diafiltración, tal como el uso de filtración de flujo tangencial (TFF, del inglés "tangential flow filtration"). En algunas realizaciones, la TFF comprende una membrana regenerada, tal como una membrana de celulosa regenerada. En algunas realizaciones, el tampón en el que se intercambia la molécula de
45 direccionamiento es un tampón de fosfato de sodio, tal como fosfato de sodio 100 mM, tal como con un pH de 8,5 o pH 8,65. En algunas realizaciones, se realiza la filtración de flujo tangencial hasta que se alcanza el pH deseado del filtrado. En algunas realizaciones, el pH deseado está entre o entre aproximadamente 6 y 10, tal como entre o entre aproximadamente 8 y 9, tal como aproximadamente 8,5, tal como de 8,46.

50 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se proporciona en una cantidad que está entre o entre aproximadamente 0,01 g y 100 g, entre o entre aproximadamente 1 g y 50 g, entre o entre aproximadamente 1 g y 25 g, entre o entre aproximadamente 5 g y 15 g, o es o es aproximadamente 12 g. En algunas realizaciones, el volumen de preparación de la molécula de direccionamiento está entre o entre aproximadamente 0,01 l y 100 l, entre o entre aproximadamente 1 l y 50 l, entre o entre aproximadamente 1 l y 15 l, o es o es aproximadamente 6 l. En algunas
55 realizaciones, la concentración de la molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo, es inferior a 0,01 mg/ml o está entre o entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 100,0 mg/ml, entre o entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 50 mg/ml, entre o entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, o entre o entre aproximadamente 1 mg/ml y 5 mg/ml, o es o es aproximadamente 5 mg/ml o 4,5 mg/ml, o es o es aproximadamente 2 mg/ml. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento, tal como un anticuerpo, está diluida, tal como a una concentración entre o entre aproximadamente
60 0,1 mg/ml y 100,0 mg/ml, entre o entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 50 mg/ml, entre o entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, entre o entre aproximadamente 1 mg/ml y 5 mg/ml, o entre o entre aproximadamente 1,8 mg/ml y 2,4 mg/ml, o se diluye a una concentración de, o de aproximadamente, 2 mg/ml.

65 En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento, por ejemplo, un anticuerpo, se filtra a través de un filtro estéril, tal como un filtro de 0,2 µm o un filtro de 0,22 µm. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento preparada se almacena, tal como a una temperatura inferior a 30 °C, tal como generalmente inferior a 26 °C, 20 °C,

15 °C, 10 °C, tal como generalmente entre o entre aproximadamente 2 y 8 °C. En algunas realizaciones, se determina el peso de la molécula de direccionamiento.

5 En algunas realizaciones, los métodos de fabricación de un conjugado incluyen una etapa de poner en contacto una molécula de direccionamiento, tal como cualquiera de las descritas anteriormente (por ejemplo, un anticuerpo), con un colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700). En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina y la molécula de direccionamiento se mezclan en un recipiente, tal como un vaso de reacción. En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo en un recipiente o vaso, tal como un vaso de reacción. En algunas realizaciones, el vaso es un tubo, una botella o una garrafa. En algunas realizaciones, el vaso tiene un volumen máximo de
10 aproximadamente o al menos 1 l, 2 l, 5 l, 10 l, 15 l, 20 l, 30 l, 40 l, 50 l o 100 l. En algunas realizaciones, el vaso es una garrafa de 40 l. En algunas realizaciones, el vaso tiene un volumen máximo de aproximadamente o al menos 100 µl, 500 µl, 1 ml, 1,5 ml, 5 ml, 15 ml, 50 ml, 250 ml o 500 ml. En algunas realizaciones, el recipiente o vaso es translúcido u opaco, es verde o ámbar, y/o está cubierto, tal como envuelto, en una lámina opaca, tal como de aluminio.

15 En algunas realizaciones, la cantidad de colorante utilizado para poner en contacto la molécula de direccionamiento se calcula en base al peso de la molécula de direccionamiento presente en el recipiente o vaso. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se añade una cantidad de colorante tal que la proporción molar final de colorante a molécula de direccionamiento sea de o de aproximadamente 1:1 a 1000:1, de o de aproximadamente 1:1 a 100:1, de o de aproximadamente 1:1 a 10:1, de o de aproximadamente 1:1 a 4:1 o aproximadamente 4:1 o 4:1.

20 En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando la molécula de direccionamiento es una partícula de tipo vírica (VLP), la proporción de moléculas de colorante a molécula de direccionamiento está entre o entre aproximadamente 10:1 y 1000:1, 10:1 y 500:1, 50:1 y 500:1 o 50:1 y 1000:1. Por tanto, en algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento puede comprender de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 moléculas de colorante. En
25 algunas realizaciones, la proporción de moléculas de colorante a la molécula de direccionamiento es o es aproximadamente o 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 50:1, 75:1, 100:1, 150:1, 200:1, 250:1, 300:1, 350:1, 400:1, 450:1, 500:1, 550:1, 600:1, 650:1, 700:1, 750:1, 800:1, 850:1, 900:1, 950:1 o 1000:1 o se encuentra entre o entre aproximadamente dos de dichos valores. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento puede comprender hasta 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 moléculas
30 de colorante. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento puede comprender más de 1000 moléculas de colorante o menos de 10 moléculas de colorante.

En algunas realizaciones, la proporción de colorante a molécula de direccionamiento se elige de modo que se incorpore un número deseado de restos de colorante por molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el
35 número deseado de restos de colorante por molécula de direccionamiento es de o de aproximadamente 1 a 50, de o de aproximadamente 1 a 25, de o de aproximadamente 1 a 10, de o de aproximadamente 1 a 5, de o de aproximadamente 2 a 5, de o de aproximadamente 2 a 3 o es aproximadamente 3 o 3.

40 En algunas realizaciones, como cuando la molécula de direccionamiento es una VLP, más de una molécula de colorante se puede conjugar con una sola proteína de la cápside. Por ejemplo, una sola proteína de la cápside, tal como la proteína de la cápside L1 o L2, puede conjugarse a de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5, moléculas de colorante. Por tanto, más de un aminoácido de una proteína de la cápside puede conjugarse con una molécula de colorante. En algunas realizaciones, una sola proteína de la cápside puede conjugarse con 1 a 2, 1 a 3 o 2 a 3 moléculas de colorante. Por tanto, una molécula de colorante puede conjugarse con 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos diferentes, tales como
45 lisina, arginina y/o histidina, u otro aminoácido, de una sola proteína de la cápside.

En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se realiza en condiciones en las que el colorante y la molécula de direccionamiento se asocian de manera covalente o no covalente, tal como reaccionan o de otro modo se asocian o unen entre sí.

50 En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina comprende un grupo químico reactivo y al poner en contacto el colorante de ftalocianina y la molécula de direccionamiento se produce un conjugado que comprende el colorante de ftalocianina unido de manera covalente a un grupo de unión de la molécula de direccionamiento.

55 En algunas realizaciones, el colorante y la molécula de direccionamiento se ponen en contacto a una temperatura controlada o se ponen en contacto en una unidad con una temperatura controlada, tal como una incubadora o un frigorífico. En algunas realizaciones, el método implica poner en contacto el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) y la molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo) a una temperatura en un intervalo de o de aproximadamente 4 °C a 37 °C, tal como de o de aproximadamente 10 °C a 30 °C, de o de aproximadamente 20 °C
60 a 30 °C, o de o de aproximadamente 23 °C a 27 °C, o es aproximadamente 25 °C ± 2,0 °C, 25 °C ± 1,0 °C o 25 °C ± 0,3 °C, tal como es o es aproximadamente 25 °C. En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo a temperatura ambiente, tal como entre 21 °C y 25 °C, tal como aproximadamente 23 °C.

65 En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto incluye incubar, tal como hacer reaccionar, el colorante y la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, la puesta en contacto se puede realizar en un vaso de reacción. En algunas realizaciones, la puesta en contacto incluye mezclar, por ejemplo, mediante agitación en batido,

las composiciones combinadas de colorante y molécula de direccionamiento para al menos una parte del contacto. En algunas realizaciones, se agita el contenido, tal como en un placa de agitación. En algunas realizaciones, el contenido se agita durante aproximadamente o al menos 5 a 30 minutos, tal como aproximadamente de 5 a 20 minutos, tal como aproximadamente de 10 a 15 minutos.

5 En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo durante al menos 5 minutos, al menos 15 minutos, al menos 30 minutos, al menos 60 minutos, al menos 90 minutos, al menos 120 minutos, al menos 240 minutos, al menos 360 minutos, al menos 24 horas, al menos 72 horas o al menos 120 horas. En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo durante 5 minutos a 150 horas, 5 minutos a 100 horas, 10 5 minutos a 48 horas, 5 minutos a 24 horas, 5 minutos a 6 horas, 5 minutos a 2 horas, 5 minutos a 90 minutos, 5 minutos a 60 minutos, 5 minutos a 30 minutos, 30 minutos a 150 horas, 30 minutos a 100 horas, 30 minutos a 48 horas, 30 minutos a 24 horas, 30 minutos a 6 horas, 30 minutos a 2 horas, 30 minutos a 90 minutos, 30 minutos a 60 minutos, 60 minutos a 150 horas, 60 minutos a 100 horas, 60 minutos a 48 horas, 60 minutos a 24 horas, 60 minutos a 6 horas, 60 minutos a 2 horas, 60 minutos a 90 minutos, 90 minutos a 150 horas, 90 minutos a 100 horas, 90 minutos a 48 horas, 90 minutos a 24 horas, 90 minutos a 6 horas, 90 minutos a 2 horas, 2 horas a 150 horas, 2 horas a 100 horas, 2 horas a 48 horas, 2 horas a 24 horas, 2 horas a 6 horas, 6 horas a 150 horas, 6 horas a 100 horas, 6 horas a 48 horas, 6 horas a 24 horas, 24 horas a 150 horas, 24 horas a 100 horas, 24 horas a 48 horas, 48 horas a 150 horas, 48 horas a 100 horas o 100 horas a 150 horas. En algunas realizaciones, la puesta en contacto se lleva a cabo durante un tiempo que es de 5 minutos a 6 horas, tal como de 5 minutos a 4 horas, 20 5 minutos a 2 horas, 5 minutos a 60 minutos, 5 minutos a 30 minutos, tal como aproximadamente de 5 minutos a 20 minutos, tal como aproximadamente de 10 minutos a 15 minutos. En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto, tal como mediante una incubación del colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) y la molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo), durante al menos o aproximadamente 15 minutos, al menos o aproximadamente 30 minutos, al menos o aproximadamente 60 minutos, al menos o aproximadamente 90 minutos, al 25 menos o aproximadamente 120 minutos o al menos o aproximadamente 150 minutos. En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto, tal como hacer reaccionar el colorante y la molécula de direccionamiento durante entre o entre aproximadamente 90 y 150 minutos, tal como 120 minutos.

30 En algunas realizaciones, el colorante y la molécula de direccionamiento se mezclan en un tampón acuoso que puede incluir un disolvente orgánico, tal como DMSO o DMF. En algunas realizaciones, el disolvente es un disolvente basado en agua. En algunas realizaciones, el pH del tampón está entre o entre aproximadamente 6 y 10, tal como entre o entre aproximadamente 7 y 10, entre o entre aproximadamente 8 y 10 o entre o entre aproximadamente 8 y 9.

35 En algunas realizaciones, la etapa de puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones de protección contra la luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, durante la etapa de puesta en contacto, el colorante y el conjugado no se exponen a ninguna luz ambiental o no se exponen a la luz con una intensidad superior a 700 lux, superior a 600 lux, superior a 500 lux, superior a 400 lux, superior a 300 lux, superior a 200 lux o superior a 100 lux. En algunas realizaciones, el colorante y el conjugado no se exponen a la luz con una intensidad superior a 700 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos. En algunas realizaciones, el colorante y/o el conjugado no se expone a la 40 luz con una intensidad superior a 200 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos.

En algunas realizaciones, durante la etapa de puesta en contacto, el colorante y el conjugado están protegidos de la luz ambiental, tal como luz en el intervalo del infrarrojo (IR) cercano. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la etapa de puesta en contacto tiene una longitud de 45 onda que no es absorbida por el colorante o que no es absorbida sustancialmente por el colorante. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la etapa de puesta en contacto hay luz verde. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la etapa de puesta en contacto tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm, tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm.

50 En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado durante la etapa de puesta en contacto tiene una longitud de onda que no es absorbida por el colorante o que no es absorbida sustancialmente por el colorante y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado durante la etapa de puesta en contacto tiene una longitud de onda en un intervalo de o de 55 aproximadamente 400 nm a 600 nm, tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado durante la etapa de puesta en contacto es luz verde, tal como luz con una longitud de onda de 425 nm a 575 nm, que tiene una intensidad inferior a 60 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la exposición total del colorante y/o conjugado a cualquier luz durante la etapa de puesta en contacto no es más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas.

65 En algunas realizaciones, el colorante y el conjugado se protegen de la luz durante la etapa de puesta en contacto

utilizando recipientes que protegen el contenido de la luz o de determinadas longitudes de onda o intensidades de luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el recipiente tiene una transmitancia de luz de no más del 50 %, no más del 40 %, no más del 30 %, no más del 20 %, no más del 10 %, no más del 5 % o no más del 1 %. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmitancia de luz que tiene una longitud de onda entre o entre aproximadamente 500 nm y 725 nm, tal como entre o entre aproximadamente 650 nm y 725 nm, o no transmite una intensidad de luz superior a 700 lux, 600 lux, 500 lux, 400 lux, 300 lux, 200 lux o 100 lux. En algunas realizaciones, el colorante y/o conjugado se prepara en un recipiente translúcido u opaco. En algunas realizaciones, el recipiente es verde, azul o ámbar. En algunas realizaciones, el recipiente está cubierto con una sustancia opaca, tal como una lámina, tal como una lámina de aluminio.

En algunas realizaciones, en cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo) está unida de manera directa o indirecta al colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700). En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo) está unida, de manera directa o indirecta, al colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) a través de un enlace covalente o una interacción no covalente. En algunas realizaciones, las interacciones o enlaces covalentes o no covalentes son directos o indirectos. En algunas realizaciones, la unión incluye un enlace indirecto, tal como a través de un enlazador (por ejemplo, tal como cualquiera de los enlazadores ilustrativos descritos anteriormente), una fracción o dominio de unión o un grupo reactivo. En algunas realizaciones, el enlace incluye una interacción directa entre la molécula de direccionamiento y un colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700). En otras realizaciones, una o ambas de la molécula de direccionamiento y el colorante de ftalocianina están unidos a uno o más enlazadores, y la interacción es indirecta, por ejemplo, entre un enlazador unido a una de las moléculas y otra molécula, o entre dos enlazadores, cada uno unido a la molécula de direccionamiento o al colorante de ftalocianina.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina está unido o asociado de manera no covalente a la molécula de direccionamiento. Por ejemplo, el colorante de ftalocianina forma un complejo con la molécula de direccionamiento a través de una interacción no covalente. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) contiene una fracción o dominio capaz de interactuar de manera no covalente con un grupo de unión de la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el método incluye incubar o unir el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) con la molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo) para formar una interacción no covalente entre el colorante y la molécula de direccionamiento. En algunos ejemplos, la interacción no covalente entre la molécula de direccionamiento y el colorante de ftalocianina incluye, por ejemplo, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas, π -efectos, interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, enlaces halógenos y/o combinaciones de los mismos, o cualquier interacción que dependa de una o más de las fuerzas. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento y el colorante de ftalocianina se enlazan utilizando interacciones que imitan interacciones moleculares no covalentes tales como, por ejemplo, interacción de ligando y receptor, interacción de anticuerpo y antígeno, interacción de avidina y biotina, interacción de estreptavidina y biotina, interacción de histidina e ion metálico divalente (por ejemplo, Ni, Co, Cu y Fe), interacciones entre dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización), interacción de glutatión S-transferasa (GST) y glutatión y/o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, una fracción o dominio de interacción no covalente está unido a la molécula de direccionamiento o es parte de ella, y forma una interacción no covalente, *por ejemplo*, un complejo, con el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700). En otras realizaciones, la molécula o dominio de interacción no covalente está unido a la molécula de colorante de ftalocianina o es parte de ella y forma una interacción no covalente, *por ejemplo*, un complejo, con la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el método incluye incubar o poner en contacto una molécula de direccionamiento conjugada con biotina (por ejemplo, anticuerpo y biotina, tal como cetuximab y biotina) y el colorante de ftalocianina conjugado con una avidina o un análogo de la misma o una estreptavidina o un análogo de la misma, que incluye sus formas monoméricas (por ejemplo, avidina monomérica-IR700 o estreptavidina monomérica-IR700). En virtud de la interacción no covalente entre avidina, estreptavidina o análogos de las mismas y biotina, en algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) forma un complejo no covalente con la molécula de direccionamiento.

En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina está enlazado de manera covalente, *por ejemplo*, unido de manera covalente, a la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) contiene un grupo reactivo para unirlo a la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo) con el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700), tal como un colorante que contiene el grupo químico reactivo, produce un conjugado que contiene el colorante unido a un grupo de unión de la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, la unión incluye un enlace indirecto, tal como a través de un enlazador. Los enlazadores ilustrativos se describieron anteriormente. En algunas realizaciones, la unión incluye un enlace directo o un enlace covalente, en donde el enlace covalente es lineal o ramificado, cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 60 átomos, tal como seleccionado de entre C, N, P, O y S. En algunas realizaciones, la unión puede contener cualquier combinación de enlaces éter, tioéter, amina, éster, carbamato, urea, tiourea, oxi o amida. En algunas realizaciones, la unión puede incluir enlaces carbono-carbono individuales, dobles, triples o aromáticos, enlaces de fósforo-oxígeno, fósforo-azufre nitrógeno-nitrógeno, nitrógeno-oxígeno, nitrógeno-platino, o enlaces aromáticos o heteroaromáticos.

- En algunas realizaciones, el método incluye hacer reaccionar el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) con la molécula de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo) para formar un enlace covalente entre el colorante y la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el enlace es, por ejemplo, una amida, una amina secundaria o terciaria, un carbamato, un éster, un éter, una oxima, un éster de fosfato, una sulfonamida, un tioéter, una tiourea o una urea. En algunas realizaciones, el enlace es covalente, tal como un enlace amida o carbamato. En algunas realizaciones, el enlace covalente es un fosfato u otro grupo de enlace. En algunas realizaciones, el enlace es un enlace de diéster de fosfato (por ejemplo, para ADN, ARN).
- En algunas realizaciones, el grupo reactivo del colorante reacciona con el grupo de unión de la molécula de direccionamiento, por ejemplo, un tiol, un hidroxilo, un carboxilo o un grupo amino, que forma la unión entre el colorante y la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el grupo de unión de la molécula de direccionamiento es un resto de lisina. Por tanto, en algunas realizaciones, el colorante de ftalocianina (por ejemplo, IR700) se une de manera covalente a un resto de lisina de la molécula de direccionamiento.
- En algunas realizaciones, después de la etapa de puesta en contacto, la reacción se desactiva, por ejemplo, mediante la adición de un agente de desactivación, tales como glicina. El término "desactivación" se refiere al proceso mediante el cual un grupo reactivo que no ha reaccionado se hace reaccionar con un exceso de agente de desactivación no específico (también llamado desactivador), tal como para detener la reacción entre el colorante y la molécula de direccionamiento. El agente o desactivador particular que se utiliza depende del grupo reactivo particular asociado con el colorante. Por ejemplo, las reacciones de reticulación del éster de NHS se pueden desactivar en presencia de tampones que contienen aminas, tales como tampones que contienen Tris o glicina.
- En algunas realizaciones, la etapa de desactivación elimina cualquier colorante que no haya reaccionado. En algunas realizaciones, la cantidad de agente de desactivación añadido es al menos o aproximadamente 200 mM, al menos o aproximadamente 500 mM, al menos o aproximadamente 1 M, al menos o aproximadamente 2 M, al menos o aproximadamente 5 M o al menos o aproximadamente 10 M. En algunas realizaciones, la reacción de desactivación implica la adición de glicina 1 M. En algunas realizaciones, la concentración final del reactivo de desactivación después de que se añade a la reacción de conjugación es al menos o aproximadamente 1 mM, al menos o aproximadamente 2 mM, al menos o aproximadamente 3 mM, al menos o aproximadamente 4 mM, al menos o aproximadamente 5 mM o al menos o aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración final del agente de desactivación, tal como glicina, es o es aproximadamente 4,2 mM.
- En algunas realizaciones, durante la etapa de desactivación, el contenido del vaso de reacción se mezcla, tal como se agita, tal como en un placa de agitación. En algunas realizaciones, el contenido del vaso de reacción se agita entre o entre aproximadamente 100 rpm y 1000 rpm, entre o entre aproximadamente 200 rpm y 500 rpm o se agitan a 300 ± 50 rpm o a 300 rpm. En algunas realizaciones, la reacción de desactivación se mezcla durante al menos o aproximadamente 5 minutos, al menos o aproximadamente 10 minutos o al menos o aproximadamente 15 minutos. En algunas realizaciones, la reacción de desactivación se mezcla durante aproximadamente 10 a 12 minutos.
- En algunas realizaciones, después de la mezcla de la reacción de desactivación, el recipiente, tal como el vaso de reacción, vuelve a una temperatura controlada, tal como en una incubadora. En algunas realizaciones, se incuban los contenidos del vaso, tal como de o de aproximadamente 21 °C a 30 °C, tal como de o de aproximadamente 23 °C a 27 °C, tal como a o aproximadamente 25 °C. En algunas realizaciones, la incubación, tal como una incubación adicional después de mezclar el reactivo de desactivación con el contenido del vaso de reacción, de la etapa de desactivación se lleva a cabo durante al menos o aproximadamente 10 minutos, al menos o aproximadamente 15 minutos, al menos o aproximadamente 20 minutos, al menos o aproximadamente 25 minutos o al menos o aproximadamente 30 minutos. En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante o durante aproximadamente 20 a 25 minutos.
- En algunas realizaciones, la etapa de desactivación se lleva a cabo en condiciones de protección contra la luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, durante la etapa de desactivación, el conjugado no se expone a ninguna luz ambiental o no se expone a luz con una intensidad superior a 700 lux, superior a 600 lux, superior a 500 lux, superior a 400 lux, superior a 300 lux, superior a 200 lux o superior a 100 lux. En algunas realizaciones, el conjugado no se expone a la luz con una intensidad superior a 700 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos. En algunas realizaciones, el conjugado no se expone a la luz con una intensidad superior a 200 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos.
- En algunas realizaciones, durante la etapa de desactivación, el conjugado está protegido de la luz ambiental, tal como luz en el intervalo del infrarrojo (IR) cercano. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de desactivación tiene una longitud de onda que no es absorbida por el colorante o conjugado o que no es absorbida de manera sustancial por el colorante o conjugado. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de desactivación es la luz verde. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de desactivación tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm, tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm.
- En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de desactivación tiene una

longitud de onda que no es absorbida por el conjugado o que no es absorbida de manera sustancial por el conjugado y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de desactivación tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm, tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de desactivación es luz verde, tal como luz con una longitud de onda de 425 nm a 575 nm, que tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la exposición total del colorante y/o conjugado a cualquier luz durante la etapa de desactivación no es más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas.

En algunas realizaciones, el conjugado se protege de la luz durante la etapa de desactivación utilizando recipientes que protegen el contenido de la luz o de determinadas longitudes de onda o intensidades de luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el recipiente tiene una transmitancia de luz de no más del 50 %, no más del 40 %, no más del 30 %, no más del 20 %, no más del 10 %, no más del 5 % o no más del 1 %. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmitancia de luz que tiene una longitud de onda entre o entre aproximadamente 500 nm y 725 nm, tal como entre o entre aproximadamente 650 nm y 725 nm, o no transmite una intensidad de luz superior a 700 lux, 600 lux, 500 lux, 400 lux, 300 lux, 200 lux o 100 lux. En algunas realizaciones, el conjugado se prepara en un recipiente translúcido u opaco. En algunas realizaciones, el recipiente es verde, azul o ámbar. En algunas realizaciones, el recipiente está cubierto con una sustancia opaca, tal como una lámina, tal como una lámina de aluminio.

En algunas realizaciones, los métodos de fabricación proporcionados en el presente documento incluyen una etapa o etapas en las que se formula el conjugado, se purifica o se aísla para producir una sustancia farmacéutica. En algunas realizaciones, el conjugado se formula a una concentración dentro de un intervalo de o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1000 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml o de 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

En algunas realizaciones, los métodos para formular el conjugado pueden incluir concentrar o diluir el conjugado, intercambiar el conjugado en un tampón farmacéuticamente aceptable o procesamiento estéril.

En algunas realizaciones, la etapa de formulación incluye concentrar el conjugado. En algunas realizaciones, la etapa de concentración incluye reducir el volumen del conjugado. En algunas realizaciones, la reducción de volumen se consigue mediante un sistema de ultrafiltración/diafiltración. En algunas realizaciones, el volumen del conjugado se reduce de o de aproximadamente 10 l, 15 l, 20 l, 25 l, 30 l, 40 l o 50 l a o hasta aproximadamente 5 l, 8 l, 9 l, 10 l, 12 l o 15 l. En algunas realizaciones, el volumen final después de la concentración está entre o entre aproximadamente 8 l y 10 l. En algunas realizaciones, el conjugado se concentra a una concentración dentro de un intervalo de o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1000 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o de 1,8 mg/ml a aproximadamente 2,1 mg/ml. En algunas realizaciones, el conjugado se concentra hasta, o hasta aproximadamente, 2,0 mg/ml.

En algunas realizaciones, la etapa de formulación incluye diluir el conjugado. En algunas realizaciones, la dilución del conjugado implica aumentar el volumen del tampón que comprende el conjugado, tal como de o de aproximadamente 5 l, 10 l, 15 l, 20 l, 30 l, 40 l o 50 l a o hasta aproximadamente 20 l, 30 l, 40 l, 50 l o 75 l. En algunas realizaciones, el conjugado se diluye a una concentración dentro de intervalo de o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1000 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml o de 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml o de 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

En algunas realizaciones, la etapa de formulación incluye purificar el conjugado. En algunas realizaciones, el conjugado se purifica mediante cromatografía de permeación en gel utilizando un equipo tal como una columna SEPHADEX G-50 o mediante diálisis para eliminar el colorante no conjugado. En algunas realizaciones, el conjugado está ultrafiltrado o diafiltrado, tal como mediante el uso de filtración de flujo tangencial (TFF). En algunas realizaciones, la ultrafiltración/diafiltración se realiza en condiciones oscuras o protegidas de la luz para evitar la exposición del conjugado a la luz ambiental.

En algunas realizaciones, la etapa de formulación incluye el intercambio del conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento (por ejemplo, conjugado de IR700 y molécula de direccionamiento, tal como conjugado de IR700 y anticuerpo) del tampón de reacción a un tampón farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el intercambio de tampón puede realizarse mediante ultrafiltración/diafiltración.

En algunas realizaciones, el conjugado está formulado en un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como el que

contiene un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, los transportadores o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como los presentes en el tampón farmacéuticamente aceptable, pueden ser cualquiera de los conocidos en la materia. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19.^a edición (1995) describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más compuestos terapéuticos.

En algunas realizaciones, el pH de la composición está entre o entre aproximadamente 6 y 10, tal como entre o entre aproximadamente 6 y 8, entre o entre aproximadamente 6,9 y 7,3, tal como aproximadamente pH 7,1. En algunas realizaciones, el pH del tampón farmacéuticamente aceptable es al menos o aproximadamente 5, al menos o aproximadamente 6, al menos o aproximadamente 7, al menos o aproximadamente 8, al menos o aproximadamente 9 o al menos o aproximadamente 10, o es 7,1.

En algunas realizaciones, la naturaleza del tampón farmacéuticamente aceptable o del transportador, depende del modo particular de administración que se utilice. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las formulaciones parenterales pueden comprender líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéuticos y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa o glicerol como vehículo. En algunas realizaciones, para composiciones sólidas, por ejemplo, polvo, píldora, comprimido o cápsula, los transportadores sólidos no tóxicos pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los transportadores biológicamente neutros, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o agentes tamponantes de pH, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

En algunas realizaciones, el tampón farmacéuticamente aceptable es solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés "phosphate buffered saline"). En algunas realizaciones, la PBS tiene un pH de, o de aproximadamente, 7,1.

En algunas realizaciones, la etapa de formulación incluye filtrado del conjugado, tal como mediante filtrado estéril. En algunas realizaciones, el conjugado se filtra a través de un filtro estéril, tal como a través de un filtro de aproximadamente 0,2 μm , tal como un filtro de 0,22 μm .

En algunas realizaciones, durante la etapa de formulación, el conjugado está protegido de longitudes de onda de la luz que son fuertemente absorbidas por el conjugado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración se realiza en un frigorífico protegido de la luz.

En algunas realizaciones, la etapa de formulación se lleva a cabo en condiciones de protección contra la luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, durante la etapa de formulación, el conjugado no se expone a ninguna luz ambiental o no se expone a luz con una intensidad superior a 700 lux, superior a 600 lux, superior a 500 lux, superior a 400 lux, superior a 300 lux, superior a 200 lux o superior a 100 lux. En algunas realizaciones, el conjugado no se expone a la luz con una intensidad superior a 700 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos. En algunas realizaciones, el conjugado no se expone a la luz con una intensidad superior a 200 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos.

En algunas realizaciones, durante la etapa de formulación, el conjugado está protegido de la luz ambiental, tal como luz en el intervalo del infrarrojo (IR) cercano. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de formulación tiene una longitud de onda que no es absorbida por el conjugado o que no es absorbida de manera sustancial por el conjugado. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de formulación es luz verde. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de formulación tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm, tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm.

En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de formulación tiene una longitud de onda que no es absorbida por el conjugado o que no es absorbida de manera sustancial por el conjugado y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de formulación tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm, tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado durante la etapa de formulación es luz verde, tal como luz con una longitud de onda de 425 nm a 575 nm, que tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la exposición total del colorante y/o conjugado a cualquier luz durante la etapa de formulación no es más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas.

En algunas realizaciones, el conjugado se protege de la luz durante la etapa de formulación mediante la colocación del recipiente en el que se produce la reacción en un lugar protegido de la luz, tal como una zona oscura. Por ejemplo,

en algunas realizaciones, la ultrafiltración/diafiltración se realiza en la oscuridad, tal como mediante la colocación del aparato de ultrafiltración/diafiltración, tal tales como una TFF, en una zona oscura, tal como un frigorífico. En algunas realizaciones, el conjugado se protege de la luz durante la etapa de formulación utilizando recipientes que protegen el contenido de la luz o de determinadas longitudes de onda o intensidades de luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el recipiente tiene una transmitancia de luz de no más del 50 %, no más del 40 %, no más del 30 %, no más del 20 %, no más del 10 %, no más del 5 % o no más del 1 %. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmitancia de luz que tiene una longitud de onda entre o entre aproximadamente 500 nm y 725 nm, tal como entre o entre aproximadamente 650 nm y 725 nm, o no transmite una intensidad de luz superior a 700 lux, 600 lux, 500 lux, 400 lux, 300 lux, 200 lux o 100 lux. En algunas realizaciones, el conjugado se prepara en un recipiente translúcido u opaco. En algunas realizaciones, el recipiente es verde, azul o ámbar. En algunas realizaciones, el recipiente está cubierto con una sustancia opaca, tal como una lámina, tal como una lámina de aluminio. En algunas realizaciones, el recipiente está cubierto por material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En algunas realizaciones, la sustancia farmacéutica formulada se almacena antes del envasado, tal como el envasado en frascos, del medicamento. En algunas realizaciones, el conjugado formulado se almacena en la oscuridad y/o se almacena en un recipiente opaco o translúcido, tal como un recipiente verde o ámbar, o se almacena en un recipiente cubierto, tal como envuelto, en una lámina opaca, tal como una lámina de aluminio. En algunas realizaciones, la sustancia farmacéutica formulada se almacena en un frigorífico, tal como entre o entre aproximadamente 2 y 8 °C, tal como a 4 °C o aproximadamente.

Envasado de la sustancia farmacéutica para producir un medicamento

En algunas realizaciones, el método incluye envasar el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento (por ejemplo, conjugado de IR700 y molécula de direccionamiento, por ejemplo, conjugado de IR700 y anticuerpo), tal como envasar la sustancia farmacéutica preparada como se describe anteriormente para dar como resultado un medicamento envasado. En algunas realizaciones, la sustancia farmacéutica está envasada, tal como en uno o más recipientes, dentro de las 4 semanas posteriores a la preparación, tal como dentro de 1 semana, 2 semanas o 3 semanas posteriores a la preparación. En algunas realizaciones, el recipiente es un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco o una caja o combinaciones de los mismos.

También se proporcionan en el presente documento recipientes, tales como recipientes protegidos contra la luz y/o dispositivos, tales como dispositivos protegidos contra la luz, que contienen cualquiera de los conjugados o composiciones descritas en el presente documento, o cualquier conjugado o composición producida o generada utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento sistemas de envasado para proteger cualquiera de los conjugados o composiciones descritas en el presente documento, o cualquier conjugado o composición producida o generada utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, dichos sistemas de envasado comprenden uno o más de los recipientes descritos en el presente documento.

También se proporcionan kits o artículos de fabricación que contienen el recipiente, dispositivo y/o sistema de embalaje proporcionado, para la protección de los conjugados o composiciones y para el almacenamiento y/o administración. El kit puede incluir un recipiente y/o un sistema de envasado, una cubierta protegida de la luz capaz de cubrir un dispositivo capaz de administrar una composición que comprende un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento y, opcionalmente, instrucciones de uso. El kit también puede contener una etiqueta o un prospecto sobre o asociado con el contenido del kit. El kit o artículo de fabricación puede incluir además un prospecto que indique las instrucciones de uso, almacenamiento o administración del conjugado o composición contenidos en el recipiente y/o sistema de envasado.

En algunas realizaciones, el conjugado está envasado en uno o más recipientes, tales como un recipiente protegido de la luz. En algunas realizaciones, el recipiente es un frasco, tal como un frasco de vidrio despirogenado. En algunas realizaciones, el recipiente, tal como un frasco, bloquea la luz de una longitud de onda particular, tal como una longitud de onda de luz que es absorbida por el colorante o por el conjugado de colorante y molécula de direccionamiento. Por tanto, en algunas realizaciones, el recipiente protege el conjugado contenido en él de la luz con una longitud de onda inferior a o inferior a aproximadamente 250 nm o entre o entre aproximadamente 550 nm y 750 nm. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmitancia de luz que tiene una longitud de onda entre o entre aproximadamente 500 nm y 725 nm, tal como entre o entre aproximadamente 650 nm y 725 nm. En algunas realizaciones, el recipiente solo permite la transmitancia de determinadas longitudes de onda de luz, tales como de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm, tales como de o de aproximadamente 425 nm a 575 nm o de o de aproximadamente 450 nm a 550 nm. En algunas realizaciones, el recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está envuelto en un material opaco, tal como una lámina, tal como una lámina de aluminio. En algunas realizaciones, el recipiente es estéril o despirogenado. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En algunas realizaciones, el recipiente tiene un volumen máximo de al menos o aproximadamente 5 ml, al menos o

aproximadamente 10 ml, al menos o aproximadamente 25 ml, al menos o aproximadamente 50 ml, tal como 51 ± 1 ml, al menos o aproximadamente 100 ml, en al menos o aproximadamente 250 ml, al menos o aproximadamente 500 ml o al menos o aproximadamente 1 l.

- 5 En algunas realizaciones, tales como donde los recipientes son frascos, los frascos se tapan y se engarzan antes del llenado. En algunas realizaciones, se determina el peso medio del frasco vacío y se utiliza para determinar el intervalo de peso de los frascos llenos.

- 10 En algunas realizaciones, el envasado incluye un llenado aséptico semiautomático. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el conjugado se llena en los recipientes, por ejemplo, frascos, utilizando una bomba peristáltica y un conjunto de aguja de llenado. En algunas realizaciones, el conjugado se filtra de manera aséptica antes del llenado, tal como a través de un filtro de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$, tal como un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. En algunas realizaciones, se pesa el filtrado estéril para determinar el número aproximado de recipientes, *por ejemplo*, frascos, para ser llenados.

- 15 En algunas realizaciones, el método incluye llenar un frasco con una cantidad de volumen de sustancia farmacéutica conjugada y colorante que es de al menos 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml, 20,0 ml, 30,0 ml, 40,0 ml, 50,0 ml o más, tal como, generalmente, de 0,5 ml a 50 ml o de 1 ml a 10 ml. En algunas realizaciones, todos los frascos que están llenos se llenan para contener el mismo volumen y cantidad de conjugado de colorante. En algunas realizaciones, el método de fabricación da como resultado el llenado de una pluralidad de
20 frascos, tal como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más frascos.

En algunas realizaciones, una sola cantidad de dosificación del conjugado está contenida en un solo recipiente. En algunas realizaciones, se proporciona una única cantidad de dosificación en una pluralidad de recipientes, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más recipientes.

- 25 En algunas realizaciones, después de la etapa de llenado, los recipientes, por ejemplo, frascos, se taponan, sellan y engarzan. En algunas realizaciones, los recipientes se almacenan protegidos de la luz, tal como en un contenedor no transparente, tal como a una temperatura inferior o igual o de aproximadamente 26°C , tal como inferior o igual o de aproximadamente 20°C , 15°C , 8°C , 0°C , -20°C , o -80°C . En algunas realizaciones, la temperatura es de o de
30 aproximadamente 20 a 26°C , tal como $23 \pm 3^\circ\text{C}$ o de o de aproximadamente 2 a 8°C , tal como $5 \pm 3^\circ\text{C}$, tal como a o aproximadamente 4°C o a o aproximadamente de 5°C , o inferior a 0°C , tal como aproximadamente -20 o -80°C .

- 35 En algunas realizaciones, los recipientes, tales como frascos, están etiquetados. En algunas realizaciones, el etiquetado se realiza a temperatura ambiente y se tiene cuidado de evitar el tiempo de exposición del conjugado a temperatura ambiente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los recipientes se exponen a temperatura ambiente durante menos de o aproximadamente 30 minutos, tal como menos de o aproximadamente 20 minutos, menos de o aproximadamente 10 minutos, menos de o aproximadamente 2 minutos o menos de o aproximadamente 1 minuto.

- 40 En algunas realizaciones, los recipientes se envasan además para proteger el contenido de la luz. En algunas realizaciones, se proporciona un sistema de envasado que incluye un material de envasado interno que comprende un recipiente que comprende el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento (por ejemplo, conjugado de IR700 y molécula de direccionamiento, tal como conjugado de IR700 y anticuerpo). En algunas realizaciones, el material de envasado interno tiene una transmitancia de luz inferior al 20 %, tal como inferior al 15 %, inferior al 10 %, inferior al 5 % o inferior al 1 %. En algunas realizaciones, el sistema de envasado incluye un material
45 de envasado externo que comprende el material de envasado interno. En algunas realizaciones, el material de envasado externo tiene una transmitancia de luz inferior al 20 %, tal como inferior al 15 %, inferior al 10 %, inferior al 5 % o inferior al 1 %. En algunas realizaciones, el material de envasado interno o externo incluye una lámina opaca, tal como una lámina de aluminio. En algunas realizaciones, el recipiente está cubierto por material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas
50 realizaciones, el material de envasado secundario es un saco de aluminio. En algunas realizaciones, el material de envasado externo comprende cartón.

- 55 En algunas realizaciones, el material de envasado interno y/o externo es adecuado para el almacenamiento del conjugado. En algunas realizaciones, el material de envasado interno y/o externo es adecuado para el envío del conjugado.

- 60 También se proporciona un sistema de envasado para proteger de la luz un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento que incluye uno o más recipientes, tal como uno, dos, tres o más recipientes. Todos o cada uno de los recipientes del sistema de envasado proporcionados en el presente documento pueden ser recipientes protegidos de la luz, tal como cualquier recipiente protegido de la luz descrito en el presente documento.

- 65 En algunas realizaciones, el sistema de envasado incluye dos recipientes: un primer recipiente que comprende cualquiera de los recipientes descritos en el presente documento y un segundo recipiente que comprende el primer recipiente, en donde el segundo recipiente protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o

de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm.

En algunas realizaciones, el segundo recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

5 En algunas realizaciones, el segundo recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el primer y segundo recipiente se seleccionan de manera independiente de entre un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco y una caja.

10 En algunas realizaciones, cualquiera de los sistemas de envasado proporcionados incluye además un tercer recipiente que comprende el segundo recipiente, en donde el tercer recipiente protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, el

15 tercer recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el tercer recipiente es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, el tercer recipiente se selecciona de entre un frasco, un tubo, una jeringa, una bolsa, un saco y una caja.

20 En algunas realizaciones, los recipientes o envases o sistemas de envasado que comprenden el conjugado, tales como un solo recipiente o una pluralidad de recipientes que comprenden una única cantidad de dosificación, están envasados en un kit. Por tanto, en algunas realizaciones, el kit incluye una o más dosis únicas. En algunas realizaciones, el kit incluye instrucciones, tales como para administrar el conjugado, tales como en condiciones de protección contra la luz. En algunas realizaciones, el kit contiene materiales que se utilizarán para la protección contra la luz del conjugado, tales como una lámina opaca, recipientes opacos, bolsas intravenosas (i.v.) opacas o mangas opacas, tales como para cubrir la bolsa i.v.

30 Por ejemplo, en algunas realizaciones, el kit incluye cualquiera de los recipientes descritos en el presente documento o cualquiera de los sistemas de envasado descritos en el presente documento; una cubierta protectora de luz capaz de cubrir un dispositivo capaz de administrar una composición que comprende un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento; y, opcionalmente, instrucciones de uso. En algunas realizaciones, el dispositivo de administración es una bolsa de infusión intravenosa o una jeringa. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de la luz protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

45 En algunas realizaciones, antes, durante y después del envasado del conjugado, el conjugado está protegido de la luz ambiental, tal como luz en el intervalo del infrarrojo (IR) cercano. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la preparación de la sustancia farmacéutica hay luz verde. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la preparación de la sustancia farmacéutica tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm, tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm. En algunas realizaciones, la única luz a la que se exponen el colorante y el conjugado antes, durante y después de la preparación de la sustancia farmacéutica tiene una longitud de onda que no es absorbida por el colorante o que no es absorbida de manera sustancial por el colorante.

50 En algunas realizaciones, antes, durante y después de la preparación de la sustancia farmacéutica, el colorante y el conjugado no se exponen a ninguna luz ambiental o no se exponen a luz con una intensidad superior a 700 lux, superior a 600 lux, superior a 500 lux, superior a 400 lux, superior a 300 lux, superior a 200 lux o superior a 100 lux. En algunas realizaciones, la exposición total del colorante y/o conjugado a cualquier luz durante la etapa de envasado no es más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas.

Características del conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento

60 En el presente documento se describe un conjugado estable de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento, tal como un conjugado de colorante IR700 y molécula de direccionamiento, por ejemplo, un conjugado de IR700 y anticuerpo. También se proporcionan conjugados, por ejemplo, conjugados estables, producidos, formulados o envasados de acuerdo con cualquiera de los métodos de fabricación descritos en el presente documento. De manera específica, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado que contiene un colorante de ftalocianina unido a una molécula de direccionamiento, como se define en

las reivindicaciones adjuntas, así como un recipiente, sistema de envasado y kit como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

5 En algunas realizaciones, el conjugado tiene una proporción molar de colorante a molécula de direccionamiento (por ejemplo, IR700 a molécula de direccionamiento) de o de aproximadamente 1:1 a 1000:1, de o de aproximadamente 1:1 a 100:1, de o de aproximadamente 1:1 a 10:1, de o de aproximadamente 1:1 a 4:1 o aproximadamente 4:1 a 4:1.

10 En algunas realizaciones, el conjugado (por ejemplo, IR700 y molécula de direccionamiento, por ejemplo, IR700 y anticuerpo) tiene una concentración dentro de un intervalo de o de aproximadamente 0,1 mg/ml a 1000 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 500 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 200 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 50 mg/ml, de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml, de 0,5 mg/ml a 10 mg/ml, de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml o de 1,8 mg/ml a 2,1 mg/ml. En algunas realizaciones, el conjugado tiene una concentración de aproximadamente 2,0 mg/ml o tiene una concentración de 2,0 mg/ml.

15 En algunas realizaciones, la cantidad de conjugado producido por el método es mayor de o mayor de aproximadamente 1 gramo, mayor de o mayor de aproximadamente 2 gramos, mayor de o mayor de aproximadamente 3 gramos, mayor de o mayor de aproximadamente 4 gramos, mayor de o mayor de aproximadamente 5 gramos o mayor de o mayor de aproximadamente 10 gramos. En algunas realizaciones, el conjugado se produce utilizando buenas prácticas de fabricación (GMP, del inglés "good manufacturing practice").

20 En algunas realizaciones, el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento proporcionado (por ejemplo, conjugado de IR700 y molécula de direccionamiento, por ejemplo, conjugado de IR700 y anticuerpo) es estable y muestra una agregación mínima, tal como la agregación inducida por la luz, durante o después del almacenamiento, tal como durante 3 meses o más. Por tanto, en algunas realizaciones, el conjugado es estable durante al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 meses, o es estable durante aproximadamente o al menos un año o más. En
25 algunas realizaciones, el conjugado es estable durante más de 1 año.

En algunas realizaciones, la estabilidad del conjugado se puede medir mediante la evaluación del porcentaje de contenido monomérico del conjugado. En algunas realizaciones, el conjugado muestra un contenido monomérico superior al 90 %, tal como al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de contenido monomérico a los 3 meses o más después de la preparación o almacenamiento. En algunas realizaciones, la
30 estabilidad del conjugado está presente si el conjugado muestra menos del 10 % de especies de alto peso molecular (HMW), tal como menos del 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del HMW a los 3 meses o más después de la preparación o almacenamiento.

35 En algunas realizaciones, la potencia o actividad del conjugado se puede medir mediante la evaluación de la DE50 del conjugado o mediante la evaluación de la capacidad del conjugado para inducir o mediar la destrucción por PIT. En algunas realizaciones, el conjugado muestra más del o más de aproximadamente un 30 % de la potencia o actividad, tal como más del o más de aproximadamente un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la potencia o actividad, en 3 meses o más después del almacenamiento en comparación con el conjugado antes del
40 almacenamiento, por ejemplo, comparado con un conjugado en $t = 0$.

En algunas realizaciones, el conjugado estable de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento, tal como un conjugado de colorante IR700 y molécula de direccionamiento (por ejemplo, conjugado de IR700 y anticuerpo), es estable como resultado de preparar, producir o almacenar el colorante o el conjugado de colorante en condiciones de
45 protección contra la luz, tal y como se ha descrito con anterioridad.

En algunas realizaciones, un factor que influye en la estabilidad del conjugado es la protección del conjugado de la luz y, por lo tanto, la agregación inducida por la luz. Por tanto, en algunas realizaciones, la estabilidad del conjugado se confiere mediante la protección contra la luz o de determinadas longitudes de onda o intensidades de luz. Por ejemplo,
50 en algunas realizaciones, el conjugado no se expone a ninguna luz ambiental o no se expone a luz con una intensidad superior a 700 lux, superior a 600 lux, superior a 500 lux, superior a 400 lux, superior a 300 lux, superior a 200 lux o superior a 100 lux. En algunas realizaciones, el conjugado no se expone a la luz con una intensidad superior a 700 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos. En algunas realizaciones, el conjugado no se expone a la luz con una intensidad superior a 200 lux durante más de 10 minutos o durante más de 5 minutos. En algunas
55 realizaciones, durante las etapas de los métodos proporcionados, la exposición total del colorante y del conjugado a cualquier luz no es más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas.

En algunas realizaciones, el conjugado está protegido de la luz ambiental, tal como luz en el intervalo del infrarrojo (IR) cercano. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado tiene una longitud de onda que no es absorbida por el conjugado o que no es absorbida de manera sustancial por el conjugado. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado es la luz verde. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm,
60 tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm.

65 En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado tiene una longitud de onda que no es absorbida

por el conjugado o que no es absorbida de manera sustancial por el conjugado y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado tiene una longitud de onda en un intervalo de o de aproximadamente 400 nm a 600 nm, tal como de 425 nm a 575 nm o 450 nm a 550 nm y tiene una intensidad inferior a 700 lux, inferior a 600 lux, inferior a 500 lux, inferior a 400 lux, inferior a 300 lux, inferior a 200 lux o inferior a 100 lux.

En algunas realizaciones, la estabilidad del conjugado está presente después del almacenamiento en un recipiente protegido de la luz. En algunas realizaciones, el conjugado se protege de la luz mediante recipientes que protegen el contenido de la luz, o de determinadas longitudes de onda o intensidades de luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el recipiente tiene una transmitancia de luz de no más del 50 %, no más del 40 %, no más del 30 %, no más del 20 %, no más del 10 %, no más del 5 % o no más del 1 %. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmitancia de luz que tiene una longitud de onda entre o entre aproximadamente 500 nm y 725 nm, tal como entre o entre aproximadamente 650 nm y 725 nm, o no transmite una intensidad de luz superior a 700 lux, 600 lux, 500 lux, 400 lux, 300 lux, 200 lux o 100 lux. En algunas realizaciones, el conjugado se almacena en un recipiente translúcido u opaco. En algunas realizaciones, el recipiente es verde o ámbar. En algunas realizaciones, el recipiente está cubierto con una sustancia opaca, tal como una lámina, tal como una lámina de aluminio.

En algunas realizaciones, la estabilidad del conjugado está presente después del almacenamiento del conjugado a una temperatura inferior o igual o de aproximadamente 26 °C, tal como inferior o igual o de aproximadamente 20 °C, 15 °C, 8 °C, 0 °C, -20 °C, o -80 °C. En algunas realizaciones, la temperatura es de o de aproximadamente 20 a 26 °C, tales como 23 ± 3 °C, o de o desde aproximadamente 2 a 8 °C, tal como 5 ± 3 °C, tal como a o aproximadamente 4 °C o a o aproximadamente 5 °C, o es inferior a 0 °C, tal como aproximadamente -20 o -80 °C.

En algunas realizaciones, pH del conjugado, *por ejemplo*, el pH de un tampón farmacéuticamente aceptable en el que se formula el conjugado, confiere estabilidad al conjugado. En algunas realizaciones, el pH es superior a 6,0, tal como superior o aproximadamente 7,0, superior o aproximadamente 8,0 o superior o aproximadamente 9,0. En algunas realizaciones, el pH es de 6,0 a 9,0, tal como de 6,0 a 8,0, de 6,5 a 7,4, tal como aproximadamente $7,1 \pm 3,0$.

En algunas realizaciones, el conjugado estable de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento (por ejemplo, conjugado de IR700 y molécula de direccionamiento, por ejemplo, conjugado de IR700 y anticuerpo) se produce mediante los métodos proporcionados en el presente documento, tales como los métodos de protección contra la luz descritos en la subsección C.

En algunas realizaciones, se proporciona un conjugado estable que es estable durante más de 3 meses, tal como cuando se fabrica y almacena en condiciones de protección contra la luz como se describe anteriormente, a una temperatura inferior a 26 °C, tal como de 2 a 8 °C, y cuando se formula a un pH superior a 6,0, tal como un pH de 6,0 a 8,0.

II. Métodos de tratamiento

En el presente documento se describen métodos para utilizar y el uso de un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento (por ejemplo, conjugado de IR700 y molécula de direccionamiento, por ejemplo, conjugado de IR700 y anticuerpo) que se dirige a una célula o patógeno asociado con una enfermedad o afección, tal como mediante la unión a una molécula de la superficie celular, proteína de la superficie celular o receptor de la superficie celular expresado en una célula. Dichos métodos y usos incluyen métodos y usos terapéuticos, por ejemplo, que implican la administración de las moléculas a un sujeto que padece una enfermedad, afección o trastorno seguido de irradiación para lograr la fotoinmunoterapia, dando como resultado la fotólisis de dichas células o patógenos para efectuar el tratamiento de la enfermedad o trastorno. Los usos incluyen la utilización de los conjugados en dichos métodos y tratamientos, y en la preparación de un medicamento para llevar a cabo dichos métodos terapéuticos. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para utilizar y los usos de dichas moléculas para tratar un tumor en un sujeto con un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento (por ejemplo, conjugado de IR700 y molécula de direccionamiento, por ejemplo, un conjugado de IR700 y anticuerpo) para tratar un tumor en un sujeto. En algunas realizaciones, el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento es un conjugado estable, tal como cualquiera descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento se produce utilizando los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los métodos de ese modo tratan la enfermedad o afección o trastorno en el sujeto. De manera específica, en la presente invención se proporciona una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método para tratar una hiperplasia o un tumor en un sujeto humano, en donde el tratamiento comprende: a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, en donde antes de la etapa de administración, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y b) irradiar la hiperplasia o el tumor a una longitud de onda de 600 a 740 nm a una dosis de al menos 1 Jcm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra, tratando así la hiperplasia o el tumor en el sujeto.

También se describen, en el presente documento, métodos para preparar una composición que contiene cualquiera

de los conjugados descritos en el presente documento, o conjugados preparados utilizando los métodos proporcionados en el presente documento, para la administración, a un sujeto, tal como cualquiera de los conjugados de colorante de ftalocianina (por ejemplo, conjugado de IR700 y anticuerpo). En algunas realizaciones, la preparación de los conjugados tiene lugar en condiciones de protección contra la luz. En algunas realizaciones, el método de preparación incluye: desembalar uno o más de cualquiera de los recipientes descritos en el presente documento o uno o más de cualquiera de los sistemas de envasado descritos en el presente documento que incluye cualquiera de los recipientes descritos en el presente documento; y transferir la composición presente en uno o más recipientes a un dispositivo capaz de administrar la composición a un sujeto, en donde la única luz a la que se expone la composición tiene una longitud de onda dentro de un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 650 nm, o la única luz a la que se expone la composición tiene una intensidad inferior a 500 lux, tal como inferior a 200 lux o inferior a 100 lux.

En algunas realizaciones, el método proporcionado se realiza en una cámara de bioseguridad, campana de bioseguridad o un ambiente estéril. En algunas realizaciones, el uno o más recipientes juntos comprenden una dosis terapéuticamente eficaz del conjugado de colorante de ftalocianina. En algunas realizaciones, el uno o más recipientes incluyen al menos o aproximadamente al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 o 24 recipientes.

En algunas realizaciones, el método proporcionado para preparar los conjugados de colorante de ftalocianina (por ejemplo, conjugado de anticuerpo-IR700) se lleva a cabo durante no más de 1 hora, no más de 30 minutos o no más de 15 minutos; o la exposición total de la composición a cualquier luz durante el método no es más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas.

También se proporcionan dispositivos protegidos de la luz que incluyen la composición preparada mediante los métodos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, el dispositivo protector de luz se utiliza para la administración de las composiciones o conjugados descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, el dispositivo de administración es una bolsa de infusión intravenosa o una jeringa. En algunas realizaciones, el dispositivo de administración comprende una cubierta protectora de luz capaz de cubrir el dispositivo. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz protege de la transmisión de luz con una longitud de onda de o de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 650 nm o de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 720 nm. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de la luz protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %. En algunas realizaciones, la cubierta protectora de luz es verde, azul, ámbar, translúcido, opaco o está cubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la administración de un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento al sujeto en condiciones en las que, en general, el conjugado entra en contacto con una célula a la que se quiere destruir. En algunas realizaciones, los métodos dan como resultado la unión de la parte de la molécula de direccionamiento (*por ejemplo*, un anticuerpo) del conjugado a una proteína de la superficie celular asociada con un tumor o cáncer. Después de poner en contacto o administrar el conjugado, una zona local del sujeto que contiene las células diana, por ejemplo, el tumor, se expone o irradia con la luz absorbida por el colorante, generalmente luz NIR, activando así el conjugado para llevar a cabo la destrucción celular específica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos incluyen además la irradiación local de la región de la enfermedad en el sujeto, tal como la irradiación local del tumor. En algunas realizaciones, la irradiación se realiza a una longitud de onda de 600 a 850 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} . En algunas realizaciones, el conjugado se dirige a la célula enferma, tal como un tumor, y la irradiación da como resultado la destrucción de las células, tal como mediante fotoinmunoterapia (PIT). En algunas realizaciones, los métodos incluyen métodos descritos en la patente de Estados Unidos n.º 8.524.239 o en la publicación de Estados Unidos n.º US2014/0120119.

En algunas realizaciones, la administración del conjugado tiene lugar en condiciones de protección contra la luz. En algunas realizaciones, la administración se realiza bajo iluminación fluorescente o iluminación LED. En algunas realizaciones, la administración se realiza en ausencia de luz solar directa o indirecta.

En algunas realizaciones, antes y durante la administración, el conjugado no se expone a la luz ambiental o no se expone a la luz ambiental con una intensidad superior a 700 lux, superior a 600 lux, superior a 500 lux, superior a 400 lux, superior a 300 lux, superior a 200 lux o superior a 100 lux o superior a 50 lux. En la composición farmacéutica para su uso de la presente invención, de manera específica, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux antes de la etapa de administración.

En algunas realizaciones, el conjugado no se expone a luz con una intensidad superior a 700 lux, superior a 600 lux, superior a 500 lux, superior a 400 lux, superior a 300 lux, superior a 200 lux o superior a 100 lux o superior a 50 lux durante más de 20 minutos, 10 minutos o durante más de 5 minutos. En algunas realizaciones, el colorante y/o el conjugado no se expone a la luz con una intensidad superior a 200 lux durante más de 10 minutos o durante más de

5 minutos. En algunas realizaciones, antes y durante la administración, cualquier exposición del conjugado a la luz es inferior a 20 minutos, inferior a 15 minutos, inferior a 10 minutos, inferior a 5 minutos, inferior a 4 minutos, inferior a 3 minutos, inferior a 2 minutos o inferior a 1 minuto. En algunas realizaciones, la exposición total del colorante y/o conjugado a cualquier luz antes o durante la administración no es más de 5000 lux horas, no más de 2500 lux horas, no más de 1000 lux horas, no más de 500 lux horas, no más de 250 lux horas, no más de 100 lux horas o no más de 80 lux horas, no más de 50 lux horas o no más de 25 lux horas.

En algunas realizaciones, el conjugado está protegido de la luz ambiental, tal como luz en el intervalo del infrarrojo (IR) cercano. En algunas realizaciones, la única luz a la que se expone el conjugado tiene una longitud de onda que no es absorbida por el conjugado o que no es absorbida de manera sustancial por el conjugado.

En algunas realizaciones, antes de la administración al sujeto, el conjugado se protege de la luz mediante recipientes que protegen el contenido de la luz, o de determinadas longitudes de onda o intensidades de luz. El recipiente puede ser un tubo, jeringa, bolsa de infusión u otro recipiente que sea compatible con la inyección o la transferencia del conjugado al sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el recipiente tiene una transmitancia de luz de no más del 50 %, no más del 40 %, no más del 30 %, no más del 20 %, no más del 10 %, no más del 5 % o no más del 1 %. En algunas realizaciones, el recipiente protege de la transmitancia de luz que tiene una longitud de onda entre o entre aproximadamente 500 nm y 725 nm, tal como entre o entre aproximadamente 650 nm y 725 nm, o no transmite una intensidad de luz superior a 700 lux, 600 lux, 500 lux, 400 lux, 300 lux, 200 lux o 100 lux. En algunas realizaciones, el conjugado se administra desde o en un recipiente translúcido u opaco. En algunas realizaciones, el recipiente es verde o ámbar. En algunas realizaciones, el recipiente está cubierto con una sustancia opaca, tal como una lámina, tal como una lámina de aluminio. En algunas realizaciones, el recipiente es una bolsa intravenosa (i.v.) y la bolsa está cubierta con una funda opaca, tal como una lámina, tal como una lámina de aluminio.

La célula diana puede ser una célula que no se desea o cuyo crecimiento no se desea, tal como una célula tumoral. En algunas realizaciones, las células pueden estar creciendo en cultivo o presentes en un mamífero que se va a tratar, tal como un sujeto con cáncer. Cualquier célula diana se puede tratar con los métodos reivindicados. En algunas realizaciones, la célula diana expresa una proteína de la superficie celular que no se encuentra de manera sustancial en la superficie de otras células normales. En algunas realizaciones, se puede seleccionar un anticuerpo que se une de manera específica a dicha proteína y se puede generar un conjugado de colorante de ftalocianina y anticuerpo para esa proteína. En algunas realizaciones, la proteína de la superficie celular es una proteína específica de tumor. En algunas realizaciones, la proteína de la superficie celular es CD25, que se puede utilizar para atacar a células asociadas con el rechazo no deseado de trasplantes.

También se describen en el presente documento métodos para eliminar células o patógenos no deseados, tales como una célula enferma o una célula infectada por patógenos, de un sujeto, utilizando cualquiera de los conjugados o composiciones descritas en el presente documento, o cualquiera de los conjugados o composiciones producidos utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células no deseadas pueden incluir una célula madre, una célula proliferativa, una célula en una hiperplasia, una célula inflamatoria, una célula inmunitaria reguladora negativa, que opcionalmente es un linfocitos T, una célula infectada por patógenos, una neurona, una célula grasa o adipocito. En algunas realizaciones, la célula no deseada es una célula cancerosa o una célula tumoral. En algunas realizaciones, la célula no deseada es una célula madre cancerosa o una célula tumoral circulante. En algunas realizaciones, el patógeno no deseado puede ser un virus, una célula bacteriana o una célula fúngica.

En el presente documento también se describen métodos para eliminar células o patógenos no deseados, tales como una célula enferma o una célula infectada por patógenos, a partir de una muestra, utilizando cualquiera de los conjugados o composiciones descritas en el presente documento, o cualquiera de los conjugados o composiciones producidos utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, las células o patógenos no deseados se eliminan de una muestra biológica de un sujeto, tal como una muestra de sangre o una muestra de médula ósea o una biopsia. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre o una muestra de tejido. En algunas realizaciones, las células o patógenos no deseados se eliminan de un tejido, tal como un tejido extraído temporalmente de un sujeto durante una cirugía o tratamiento. En algunas realizaciones, las células no deseadas se eliminan de una muestra asociada con un dispositivo, tal como una biopelícula en dispositivos médicos.

En algunas realizaciones, se realiza la irradiación para la eliminación o el tratamiento *in vivo*, por ejemplo, se administra directamente al sujeto. En algunas realizaciones, el método se puede realizar *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, fuera del cuerpo del sujeto. En algunas realizaciones, el método se realiza mediante un dispositivo extracorpóreo. Los dispositivos extracorpóreos ilustrativos incluyen dispositivos utilizados para hemodiálisis, oxigenación extracorpórea, eliminación de CO₂ y aféresis, o instrumentos que reciben sangre extraída de un sujeto, procesan (por ejemplo, filtran, purifican, tratan, administran agentes terapéuticos, etc.) la sangre y después devuelven la sangre al sujeto.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la eliminación de células o patógenos no deseados de una muestra, tal como una muestra de sangre o una muestra de tejido, incluye métodos de tratamiento, tal como el tratamiento de una hiperplasia, un tumor o una infección.

En algunas realizaciones, la célula no deseada está asociada con, provoca o contribuye a la etiología de una enfermedad o afección. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un tumor o cáncer, una infección, una enfermedad o afección inflamatoria, o una enfermedad o afección neuronal. En algunas realizaciones, la célula es una neurona y la enfermedad o afección es un trastorno neurológico, que opcionalmente es dolor; la célula es una célula grasa o un adipocito y la enfermedad o afección implica un exceso de grasa; la célula es una célula infectada por patógenos y la enfermedad o condición es una infección; la célula es un patógeno y la enfermedad o condición es una infección; la célula es una célula inflamatoria y la enfermedad o afección es una enfermedad inflamatoria; la célula es una célula inmunitaria, que opcionalmente es un linfocito T regulador, y la enfermedad o afección es un tumor o cáncer; o la célula es una célula tumoral o cancerosa y la enfermedad o afección es un tumor o un cáncer. En algunas realizaciones, la célula está presente en el microambiente de una lesión asociada con una enfermedad o afección o está en una hiperplasia. En algunas realizaciones, la lesión es un tumor y la enfermedad o afección es un tumor o cáncer. En algunas realizaciones, el método trata la enfermedad o afección.

Los métodos generalmente incluyen administrar a un sujeto conjugados o composiciones proporcionadas en el presente documento, o conjugados o composiciones producidas utilizando los métodos descritos en el presente documento, e irradiar las células o patógenos no deseados para activar el conjugado y de ese modo eliminar las células.

En algunas realizaciones, el método para eliminar células o patógenos no deseados en un sujeto incluye: (a) administrar una composición que comprende un conjugado de colorante de ftalocianina de cualquiera de los dispositivos protegidos de la luz proporcionado en el presente documento a un sujeto, en donde antes y durante la etapa de administración, la composición no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y (b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 660 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula no deseada en el sujeto.

En algunas realizaciones, el método para eliminar células o patógenos no deseados en un sujeto incluye: a) administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los conjugados o composiciones descritas en el presente documento, en donde antes y durante la etapa de administración, la conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 660 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula no deseada en el sujeto.

En algunas realizaciones, el método para eliminar células o patógenos no deseados en un sujeto incluye: a) administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento capaz de unirse a una célula o patógeno no deseado, en donde antes y durante la etapa de administración, la conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y b) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así las células o patógenos no deseados en el sujeto.

En algunas realizaciones, el método para eliminar células o patógenos no deseados en un sujeto incluye: a) administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una primera molécula de unión capaz de unirse a una célula o patógeno no deseado; b) administrar al sujeto una molécula conjugada que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento, en donde la molécula de direccionamiento es una segunda molécula de unión que es capaz de unirse a la primera molécula de unión; y (c) irradiar las células o patógenos no deseados a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así las células o patógenos no deseados en el sujeto. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la primera molécula de unión se administra al sujeto antes que el conjugado o la primera molécula de unión y el conjugado se administran de manera simultánea al sujeto. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo secundario. En algunas realizaciones, antes y durante la administración del conjugado, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux.

En algunas realizaciones, el método para eliminar células o patógenos no deseados, tales como las células infectadas por patógenos, en un sujeto incluye: a) administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula conjugada que comprende IRDye 700DX (IR700) unido a una molécula de direccionamiento, en donde la molécula de direccionamiento es capaz de unirse a la célula infectada por patógenos de manera directa o indirecta; y b) irradiar la célula infectada por patógenos a una longitud de onda de 600 a 800 nm a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra eliminando así la célula infectada por patógenos en el sujeto. En algunas realizaciones, el patógeno es un virus, bacteria, hongo, biopelícula u otro sistema de células procariotas. En algunas realizaciones, antes y durante la administración del conjugado, el conjugado no se expone a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux.

En algunas realizaciones, el sujeto a tratar, o el sujeto del que se eliminan células o patógenos no deseados, tiene un tumor, y el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento se dirige al tumor. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello, de mama, hígado, colon, ovario, próstata, páncreas, cerebro, cuello del útero, hueso, piel, pulmón o sangre. En algunas realizaciones, el cáncer puede incluir un tumor maligno caracterizado por un crecimiento celular anormal o

descontrolado. Otras características que pueden estar asociadas con el cáncer incluyen metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citocinas u otros productos secretorios a niveles anormales y supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunitaria, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como ganglios linfáticos, etc. La enfermedad metastásica puede referirse a células cancerosas que han abandonado el sitio del tumor original y han migrado a otras partes del cuerpo, por ejemplo, a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático. En algunas realizaciones, una célula diana por los métodos divulgados es una célula cancerosa. En algunas realizaciones, la célula diana es una célula madre cancerosa o una célula tumoral circulante.

En algunas realizaciones, la célula tumoral es una célula cancerosa, tal como una célula en un sujeto con cáncer. Las células ilustrativas que se pueden dirigir en los métodos divulgados incluyen células de los siguientes tumores: un tumor líquido tal como una leucemia, que incluye leucemia aguda (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de la cadena pesada). En algunas realizaciones, la célula es una célula tumoral sólida, tal como un sarcoma o carcinoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovióma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, por ejemplo, adenocarcinoma de páncreas, colon, ovario, pulmón, de mama, estómago, próstata, cuello uterino o esófago, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, carcinoma de vejiga, tumores del SNC, tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. En algunas realizaciones, el cáncer es un carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Los tumores ilustrativos, tales como cánceres, que se pueden tratar con los métodos reivindicados incluyen tumores sólidos, tales como carcinomas de mama, tales como carcinomas lobulillares y canaliculares, sarcomas, carcinomas de pulmón, tales como carcinoma microcítico, carcinoma macrocítico, carcinoma escamoso y adenocarcinoma, mesotelioma del pulmón, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de estómago, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de ovario, tal como cistadenocarcinoma seroso y cistadenocarcinoma mucinoso, tumores de células germinales ováricas, carcinomas testiculares y tumores de células germinales, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma biliar, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vejiga, que incluye, por ejemplo, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma y carcinoma escamoso, adenocarcinoma de células renales, carcinomas de endometrio, que incluyen, por ejemplo, adenocarcinomas y tumores de Müller mixtos (carcinosarcomas), carcinomas del endocervix, ectocervix y vagina, tales como adenocarcinoma y carcinoma escamoso de cada uno de los mismos, tumores de la piel, tales como carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular, melanoma maligno, tumores del apéndice de la piel, sarcoma de Kaposi, linfoma cutáneo, tumores anexiales de piel y varios tipos de sarcomas y carcinoma de células de Merkel, carcinoma esofágico, carcinomas de nasofaringe y orofaringe, que incluyen carcinoma escamoso y adenocarcinomas de los mismos, carcinomas de las glándulas salivales, tumores de cerebro y del sistema nervioso central, que incluyen, por ejemplo, tumores de la glía, de origen neuronal y meníngeo, tumores del nervio periférico, sarcomas de tejidos blandos y sarcomas de hueso y cartílago, y tumores linfáticos, que incluyen linfoma maligno de linfocitos B y linfocitos T. En algunas realizaciones, el tumor es un adenocarcinoma.

Los métodos también se pueden utilizar para tratar tumores líquidos, tales como una leucemia linfática, de glóbulos blancos u otro tipo de leucemia. En algunas realizaciones, el tumor tratado es un tumor de la sangre, tal como una leucemia, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), tricoleucemia (HCL, del inglés "hairy cell leukemia"), leucemia prolinfocítica de linfocitos T (LPL-T), leucemia linfocítica granular grande y leucemia de linfocitos T adultos, linfomas, tales como el linfoma de Hodgkin y el linfoma no hodgkiniano y mielomas.

En algunas realizaciones, el conjugado se dirige a una proteína expresada en el tumor.

En algunas realizaciones, la proteína de la superficie celular de la célula diana a la que se va a dirigir no está presente en cantidades significativas en otras células. Por ejemplo, la proteína de la superficie celular puede ser un receptor que solo se encuentra en el tipo de célula diana.

En algunas realizaciones, la proteína expresada en el tumor, *por ejemplo*, proteína específica de tumor, puede ser HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (receptor de IL-2R α), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, antígeno de cáncer 125 (CA125), α fetoproteína (AFP), Lewis Y, TAG72, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, glipicano-3, gpA33, mucinas, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, gangliósidos (tales como GD2, GD3, GM1 y GM2), receptor de VEGF (VEGFR), integrina α V β 3, integrina α 5 β 1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, tenascina, AFP, complejo BCR, CD3, CD18, CD44, CTLA-4, gp72, HLA-DR 10 β , antígeno HLA-DR, IgE, MUC-1, nuC242, antígeno PEM, antígeno SK-1 o PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína

específica de tumor es PD-L1, HER1/EGFR, HER2, CD20, CD25, CD33, CD52 o antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA, del inglés "prostate specific membrane antigen"). Otras proteínas de la superficie celular incluyen cualquiera de las descritas anteriormente.

- 5 En algunas realizaciones, la proteína de la superficie celular es una proteína específica de tumor o un antígeno específico de tumor, tales como miembros de la familia de receptores EGF (por ejemplo, HER1, 2, 3 y 4) y receptores de citocinas (por ejemplo, CD20, CD25, IL-13R, CD5, CD52, etc.). En algunas realizaciones, las proteínas específicas de tumor son aquellas proteínas que son exclusivas de las células cancerosas o que son mucho más abundantes en ellas, en comparación con otras células, tales como las células normales. Por ejemplo, HER2 generalmente se encuentra en cánceres de mama, mientras que HER1 se encuentra normalmente en adenocarcinomas, que se pueden encontrar en muchos órganos, tales como el páncreas, de mama, próstata y colon.

- 15 Las proteínas específicas de tumor ilustrativas que se pueden encontrar en una célula diana, y para las cuales se puede utilizar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para esa proteína para formular un conjugado de colorante de ftalocianina y anticuerpo, incluyen, pero sin limitación: cualquiera de los diversos MAGE (antígeno E asociado al melanoma), que incluye MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 y MAGE 4, cualquiera de las diversas tirosinasas, mutante ras, mutante p53, antígeno de melanoma p97, glóbulo de grasa de la leche humana (HMFG, del inglés "human milk fat globule") que puede estar asociado con tumores de mama, cualquiera de los diversos BAGE (antígeno E asociado al melanoma humano B), que incluye BAGE1 y BAGE2, cualquiera de los diversos GAGE (antígeno G), que incluye GAGE1, GAGE2-6, varios gangliósidos y CD25.

- 25 Otros antígenos específicos de tumores incluyen los antígenos HPV 16/18 y E6/E7 asociados con cánceres de cuello uterino, antígeno de mucina (MUC 1)-KLH que puede estar asociado con el carcinoma de mama, CEA (antígeno carcinoembrionario) que puede estar asociado con cáncer colorrectal, gp100 que puede estar asociado con, por ejemplo, melanoma, antígenos MART1 que pueden estar asociados con el melanoma, antígeno de cáncer 125 (CA125, también conocido como mucina 16 o MUC16) que puede estar asociado con cánceres de ovario y otros cánceres, α -fetoproteína (AFP) que puede estar asociada con el cáncer de hígado, antígeno de Lewis Y que puede estar asociado con cáncer colorrectal, biliar, de mama, de pulmón microcítico y otros cánceres, glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG72) que puede estar asociada con adenocarcinomas, y el antígeno PSA que puede estar asociado con cáncer de próstata.

- 35 Otras proteínas específicas de tumores ilustrativas incluyen además, pero sin limitación, PMSA (antígeno específico de la membrana prostática), que puede estar asociada con neovascularización tumoral sólida, así como cáncer de próstata, HER-2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) que puede estar asociado con el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago y cáncer de útero, HER-1 que puede estar asociado con cáncer de pulmón, cáncer anal y glioblastoma así como a adenocarcinomas, NY-ESO-1 que puede estar asociado con melanoma, sarcomas, carcinomas testiculares y otros cánceres, hTERT (también conocido como telomerasa), proteinasa 3 y tumor de Wilms 1 (WT-1).

- 40 En algunas realizaciones, la proteína específica de tumor es CD52 y puede estar asociada con la leucemia linfocítica crónica, CD33 y puede estar asociada con leucemia mielógena aguda, o CD20 y puede estar asociada con linfoma no hodgkiniano.

- 45 Por tanto, los métodos divulgados se pueden utilizar para tratar cualquier cáncer que exprese una proteína específica de tumor.

- 50 En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano o un mamífero no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano o sujeto veterinario, tal como un ratón. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, tal como un ser humano, que tiene cáncer o está en tratamiento contra el cáncer. En algunas realizaciones, los métodos divulgados se utilizan para tratar a un sujeto que tiene un tumor, tal como un tumor descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el tumor ha sido tratado previamente, tal como extirpado de manera quirúrgica o química, y los métodos divulgados se utilizan posteriormente para destruir cualquier célula tumoral no deseada que pueda permanecer en el sujeto.

- 55 Los métodos divulgados se pueden utilizar para tratar cualquier sujeto mamífero, tal como un ser humano, quien tiene un tumor, tal como un cáncer, o se le ha extirpado o tratado previamente. Los sujetos que necesitan las terapias divulgadas pueden incluir sujetos humanos que tienen cáncer, en donde las células cancerosas expresan una proteína específica de tumor en su superficie que puede unirse de manera específica al conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento. Por ejemplo, los métodos divulgados se pueden utilizar como tratamiento inicial para el cáncer, ya sea solos o en combinación con radiación u otra quimioterapia. Los métodos divulgados también se pueden utilizar en pacientes a los que les ha fallado la radiación o la quimioterapia anterior. Por tanto, en algunas realizaciones, el sujeto es alguien que ha recibido otras terapias, pero esas otras terapias no han proporcionado una respuesta terapéutica deseada. Los métodos divulgados también se pueden utilizar en pacientes con cáncer localizado y/o metastásico.

- 65 En algunas realizaciones, el método incluye seleccionar un sujeto que se beneficiará de las terapias divulgadas, tal

como seleccionar un sujeto que tiene un tumor que expresa una proteína de la superficie celular, tal como una proteína específica de tumor, que se puede unir de manera específica a un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento. Por ejemplo, si se determina que el sujeto tiene un cáncer de mama que expresa HER1, el sujeto puede seleccionarse para ser tratado con una molécula de anti-HER1-IR700, tal como cetuximab-IR700.

5 En algunas realizaciones, la composición utilizada para la administración del conjugado contiene una cantidad eficaz del conjugado junto con transportadores y excipientes farmacéuticos convencionales adecuados para el tipo de administración contemplada.

10 En algunas realizaciones, una sola cantidad de dosificación del conjugado está comprendida dentro de un solo recipiente, tal como un recipiente en el que se almacena el conjugado. En algunas realizaciones, el recipiente, tal como un frasco, es uno que se envasa en condiciones de protección contra la luz como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, una sola cantidad de dosificación del conjugado está comprendida en una pluralidad de recipientes. Por tanto, en algunas realizaciones, una pluralidad de recipientes, tales como frascos, se combinan, en un recipiente que se utilizará para la administración del conjugado, tal como una bolsa para infusión intravenosa (i.v.).
15 En algunas realizaciones, el recipiente utilizado para la administración, tal como una bolsa para infusión i.v., se prepara abriendo uno o varios recipientes que comprenden el conjugado y colocando el contenido en la bolsa para infusión, tal como hasta que se logre una dosis deseada del conjugado para la administración, *por ejemplo*, infusión. Durante la preparación del recipiente de administración, tal como una bolsa para infusión i.v., se tomaron precauciones de luz
20 para evitar la exposición del conjugado a la luz, tal como las diversas precauciones de luz descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, el método incluye administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del producto farmacéutico conjugado. En algunas realizaciones, el método incluye administrar a un sujeto una cantidad
25 terapéuticamente eficaz de un conjugado que contiene un conjugado de colorante con una molécula de direccionamiento, *por ejemplo*, el conjugado de IRDye 700DX y molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el conjugado de IRDye 700DX y molécula de direccionamiento se dirige al tumor.

En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de una composición que, sola o junto con un agente terapéutico adicional, tal como un agente quimioterapéutico, es suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto, o en una célula, que se trata con la composición. La cantidad eficaz del agente terapéutico, tal como el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento, puede depender de varios factores, que incluyen, pero sin limitación, el sujeto o las células a tratar, el agente terapéutico particular y la forma de administración de la composición terapéutica. En algunas realizaciones, una cantidad o concentración terapéuticamente eficaz es aquella que es suficiente para evitar el avance, tal como la metástasis, retrasar la progresión o provocar la regresión de una enfermedad o que sea capaz de reducir los síntomas causados por la enfermedad, tales como un cáncer. En algunas realizaciones, una cantidad o concentración terapéuticamente eficaz es aquella que es suficiente para aumentar el tiempo de supervivencia de un paciente con un tumor.

40 En algunas realizaciones, una respuesta deseada de tratamiento de acuerdo con los métodos proporcionados es reducir o inhibir uno o más síntomas asociados con el cáncer. En algunas realizaciones, no es necesario eliminar por completo uno o más síntomas para que la composición sea eficaz. Por ejemplo, la administración de una composición que contiene el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento seguida de irradiación puede disminuir el tamaño de un tumor, tal como el volumen o el peso de un tumor, o la metástasis de un tumor, por ejemplo,
45 en al menos un 20 %, al menos un 50 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos el 100 %, en comparación con el tamaño, volumen, peso o metástasis del tumor en ausencia del conjugado.

En algunas realizaciones, una respuesta deseada del tratamiento de acuerdo con los métodos proporcionados es destruir una población de células en una cantidad deseada, por ejemplo, mediante la destrucción de al menos un
50 20 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos el 100 % de las células, en comparación con la destrucción celular en ausencia del conjugado y de la irradiación.

En algunas realizaciones, una respuesta deseada es aumentar el tiempo de supervivencia de un paciente con un tumor o al que se le ha extirpado un tumor recientemente, mediante una cantidad deseada, por ejemplo, para aumentar la supervivencia en al menos un 20 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos el 100 %, en comparación con el tiempo de supervivencia en ausencia del conjugado y de la irradiación.

60 La cantidad de un agente que incluye el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento que se administra a un sujeto humano o veterinario variará dependiendo de una serie de factores asociados con ese sujeto, por ejemplo, la salud global del sujeto. En algunas realizaciones, se puede determinar una cantidad eficaz de un agente mediante la variación de la dosis del producto y la medición de la respuesta terapéutica resultante, tal como la regresión de un tumor. En algunas realizaciones, las cantidades eficaces se pueden determinar a través de varios
65 inmunoensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ*. En algunas realizaciones, los agentes divulgados se pueden administrar en una dosis única o en varias dosis, según sea necesario para obtener la respuesta deseada. En algunas realizaciones,

la cantidad eficaz depende de la fuente aplicada, del sujeto que se está tratando, de la gravedad y del tipo de la afección que ha de tratarse, y de la forma de administración.

En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz del conjugado es de al menos 0,5 miligramos por 60 kilogramos (mg/kg), al menos 5 mg/60 kg, al menos 10 mg/60 kg, al menos 20 mg/60 kg, al menos 30 mg/60 kg, al menos 50 mg/60 kg, por ejemplo, de 0,5 a 50 mg/60 kg, tal como una dosis de 1 mg/60 kg, 2 mg/60 kg, 5 mg/60 kg, 20 mg/60 kg o 50 mg/60 kg, por ejemplo, cuando se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la dosis del conjugado es de al menos 10 µg/kg, tal como al menos 100 µg/kg, al menos 500 µg/kg o al menos 500 µg/kg, por ejemplo, de 10 µg/kg a 1000 µg/kg, tal como una dosis de 100 µg/kg, 250 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, 750 µg/kg o 1000 µg/kg, por ejemplo, cuando se administra por vía intratumoral o i.p. En algunas realizaciones, la dosis es de al menos 1 µg/ml, tal como al menos 500 µg/ml, tal como entre 20 µg/ml y 100 µg/ml, tal como 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 90 µg/ml o 100 µg/ml, por ejemplo, administrada en solución tópica.

En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz del conjugado está entre o entre aproximadamente 10 mg/m² y 2000 mg/m², tal como entre o entre aproximadamente 10 mg/m² y 1500 mg/m², 25 mg/m² y 2000 mg/m², 200 mg/m² y 1250 mg/m², 500 mg/m² y 1250 mg/m², 500 mg/m² y 750 mg/m² o 750 mg/m² y 1250 mg/m². En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz es de al menos o aproximadamente al menos 0,01 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 2000 mg, 3000 mg o más.

Un experto en la materia reconocerá que también se podrían utilizar dosis más altas o más bajas, por ejemplo, dependiendo del conjugado particular. En algunas realizaciones, las dosificaciones, tales como dosificaciones diarias, se administran en una o más dosis divididas, tal como 2, 3 o 4 dosis, o en una sola formulación. El conjugado divulgado se puede administrar solo, en presencia de un transportador farmacéuticamente aceptable o en presencia de otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes antineoplásicos.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, una proteína, una glucoproteína, un péptido, un polipéptido, un virus, una cápside vírica o una partícula vírica. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno.

En algunas realizaciones, antes de la administración del conjugado, al sujeto se le administra la molécula de direccionamiento sola en una forma que no está conjugada, tal como un anticuerpo, tal como cetuximab. En general, la molécula de direccionamiento que se administra antes del conjugado es la misma molécula de direccionamiento que se administrará como parte del conjugado. En algunas realizaciones, la dosis de la molécula de direccionamiento administrada está entre o entre aproximadamente 10 mg/m² y 2000 mg/m², tal como entre o entre aproximadamente 10 mg/m² y 1500 mg/m², 25 mg/m² y 2000 mg/m², 200 mg/m² y 1250 mg/m², 500 mg/m² y 1250 mg/m², 500 mg/m² y 750 mg/m² o 25 mg/m² y 100 mg/m².

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se administra al menos 1 semana, al menos 6 días, al menos 5 días, al menos 96 horas, al menos 72 horas, al menos 48 horas, al menos 24 horas o al menos 12 horas antes de la administración del conjugado. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se administra dentro de un intervalo de o de aproximadamente 1 hora a 1 semana antes de la administración del conjugado, tal como dentro de un intervalo de o de aproximadamente 1 hora a 96 horas, de 1 hora a 48 horas, de 1 hora a 24 horas, de 24 horas a 96 horas o de 24 horas a 48 horas. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se administra a las, o aproximadamente, 96 horas antes de la administración del conjugado.

En algunas realizaciones, el conjugado puede administrarse de forma sistémica o local al órgano o tejido a tratar. Las vías de administración ilustrativas incluyen, pero sin limitación, la vía tópica, inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intratumoral e intravenosa), oral, sublingual, rectal, transdérmica, intranasal, vaginal y de inhalación. En algunas realizaciones, el conjugado se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el conjugado se administra por vía parenteral. En algunas realizaciones, el conjugado se administra por vía enteral. En algunas realizaciones, el conjugado se administra mediante inyección local. En algunas realizaciones, el conjugado se administra como aplicación tópica.

La composición que comprende el conjugado se puede administrar de manera local o sistémica utilizando cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, a sujetos que tienen un tumor, tal como un cáncer, o que han tenido un tumor previamente extirpado, por ejemplo, mediante cirugía. Aunque se proporcionan ejemplos específicos, un experto en la materia apreciará que se pueden utilizar métodos alternativos de administración del conjugado divulgado. Dichos métodos pueden incluir, por ejemplo, el uso de catéteres o bombas implantables para proporcionar una infusión continua durante un período de varias horas a varios días en el sujeto que necesita tratamiento.

En algunas realizaciones, el conjugado se administra por vía parenteral, que incluye inyección directa o infusión en un tumor, tal como de manera intratumoral. En algunas realizaciones, el conjugado se administra al tumor mediante la aplicación del conjugado al tumor, por ejemplo, mediante el baño del tumor en una solución que contiene el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento o mediante el vertido del conjugado sobre el tumor.

Además, o como alternativa, las composiciones divulgadas se pueden administrar por vía sistémica, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea u oral, a un sujeto que tiene un tumor, tales como un cáncer.

5 Las dosificaciones del conjugado que se administrarán a un sujeto no están sujetas a límites absolutos, pero dependerá de la naturaleza de la composición y sus principios activos y sus efectos secundarios no deseados, tales como la respuesta inmunitaria contra el anticuerpo, el sujeto que se está tratando y el tipo de afección que se está tratando y la forma de administración. En general, la dosis será una cantidad terapéuticamente eficaz, tal como una
10 cantidad suficiente para lograr un efecto biológico deseado, por ejemplo, una cantidad que sea eficaz para disminuir el tamaño, tal como el volumen y/o el peso, del tumor, o atenuar el crecimiento adicional del tumor, o disminuir los síntomas no deseados del tumor.

15 En algunas realizaciones, por ejemplo, para la administración intravenosa del conjugado, las dosificaciones ilustrativas para la administración a un sujeto para un único tratamiento pueden variar de 0,5 a 100 mg/60 kg de peso corporal, de 1 a 100 mg/60 kg de peso corporal, de 1 a 50 mg/60 kg de peso corporal, de 1 a 20 mg/60 kg de peso corporal, por ejemplo, aproximadamente 1 o 2 mg/60 kg de peso corporal. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado administrado por vía intraperitoneal o intratumoral puede variar de 10 µg a 5000 µg de conjugado a 1 kg de peso corporal, tal como de 10 µg/kg a 1000 µg/kg, de 10 µg/kg a 500 µg/kg o de 100 µg/kg a 1000 µg/kg. En
20 algunas realizaciones, el conjugado se administra en una cantidad de o de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o de 20 mg/m² a aproximadamente 4000 mg/m². En algunas realizaciones, el conjugado se administra en una cantidad que es al menos o aproximadamente al menos o es o es de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 16,0 mg/kg, 32,0 mg/kg o 64 mg/kg; o el conjugado se administra en una cantidad que es al menos o aproximadamente al menos o es o es aproximadamente 20 mg/m², 40 mg/m², 160 mg/m²,
25 320 mg/m², 640 mg/m², 1280 mg/m² o 2560 mg/m².

En algunas realizaciones, la dosis de conjugado administrada a un paciente humano es de al menos 50 mg, tal como al menos 100 mg, al menos 300 mg, al menos 500 mg, al menos 750 mg o incluso 1 g.

30 Los tratamientos con el conjugado divulgado se pueden completar en un solo día o se pueden realizar de manera repetida en varios días con la misma dosis o con una diferente. Los tratamientos repetidos se pueden realizar el mismo día, en días sucesivos o cada 1 a 3 días, cada 3 a 7 días, cada 1 a 2 semanas, cada 2 a 4 semanas, cada 1 a 2 meses o incluso a intervalos más prolongados.

35 En algunas realizaciones, la composición utilizada para la administración del conjugado contiene una cantidad eficaz del conjugado junto con transportadores y excipientes farmacéuticos convencionales adecuados para el tipo de administración contemplada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las formulaciones parenterales pueden contener una suspensión o solución acuosa estéril del conjugado. En algunas realizaciones, las composiciones para administración enteral pueden contener una cantidad eficaz del conjugado en suspensión o solución acuosa que
40 opcionalmente puede incluir tampones, tensioactivos, agentes tixotrópicos y aromatizantes.

En algunas realizaciones, el método incluye irradiar el tumor. En algunas realizaciones, la irradiación se realiza entre o entre aproximadamente 30 minutos y 96 horas después de la administración del conjugado, tal como entre 30 minutos y 48 horas, 30 minutos y 24 horas o 12 horas y 48 horas, tal como generalmente al menos 30 minutos,
45 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas o más después de la administración del conjugado. Por ejemplo, la irradiación se puede realizar en aproximadamente 24 horas después de la administración del conjugado.

50 En algunas realizaciones, después de que las células se pongan en contacto con el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento, se irradian. Los métodos de irradiación se conocen en la materia. Como solo las células que expresan la proteína de la superficie celular serán normalmente reconocidas por la molécula de direccionamiento, generalmente, solo esas células tendrán cantidades suficientes del conjugado unido a ellas. Esto puede disminuir la probabilidad de efectos secundarios no deseados, tales como la destrucción de células normales, ya que la irradiación solo puede destruir las células a las que está unido el conjugado, y generalmente no otras células.
55

En algunas realizaciones, las células se irradian *in vitro*, tal como en una placa de cultivo tisular. En algunas realizaciones, se irradia una célula *in vivo*, por ejemplo, irradiando a un sujeto al que se le ha administrado previamente el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el sujeto se irradia,
60 por ejemplo, se puede irradiar un tumor en el sujeto.

En algunas realizaciones, se puede aplicar una luz o láser a las moléculas de colorante, tales como las células que contienen el conjugado, durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la luz o el láser se aplica durante aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o
65 55 segundos, o dentro de un intervalo entre cualquiera de dos de dichos valores, para activar las moléculas de colorante. En algunas realizaciones, la luz o el láser se aplica durante o durante aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3,

3,5, 4, 4,5 o 5 minutos, o más, o dentro de un intervalo entre dos cualesquiera de dichos valores. En algunas realizaciones, el tiempo que se aplica una luz o un láser puede variar dependiendo de, por ejemplo, la energía, tal como el vataje, de la luz o láser. Por ejemplo, se pueden aplicar luces o láseres con un vataje inferior durante un período de tiempo más largo para activar la molécula de colorante.

5 En algunas realizaciones, se puede aplicar una luz o un láser de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas después de la administración del conjugado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la luz o el láser se aplica a los o aproximadamente a los 30, 35, 40, 45, 50 o 55 minutos después de la administración del conjugado, o dentro de un intervalo entre dos cualesquiera de dichos valores. En algunas realizaciones, la luz o el láser se aplica a las o
10 aproximadamente a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas después de la administración del conjugado, o se administra dentro de un intervalo entre o entre aproximadamente dos cualesquiera de dichos valores. En algunas realizaciones, la luz o el láser se aplica entre o entre aproximadamente 1 y 24 horas, tal como entre o entre aproximadamente 1 y 12 horas, 12 y 24 horas, 6 y 12 horas o puede administrarse más de 24 después de la administración del conjugado. En algunas realizaciones, la luz o el láser se aplica 36 o
15 48 horas después de la administración del conjugado. En algunas realizaciones, las células, la hiperplasia o el tumor se irradia dentro de o dentro de aproximadamente o alrededor de las 12 horas, 24 horas, 36 horas, 72 horas o 96 horas después de la administración del conjugado.

20 En algunas realizaciones, las moléculas de colorante del conjugado se pueden activar a una longitud de onda adecuada. Por tanto, en algunas realizaciones, las células se irradian con una dosis terapéutica de radiación a una longitud de onda de o de aproximadamente 660 a 710 nm, tal como de 660 a 700 nm o de 670 a 690 nm, por ejemplo, 680 nm. En algunas realizaciones, la activación de las moléculas de colorante las vuelve citotóxicas o capaces de producir una molécula citotóxica. Las longitudes de onda adecuadas incluyen, sin limitación, longitudes de onda ultravioleta, longitudes de onda visibles, longitudes de onda infrarrojas y longitudes de onda del infrarrojo cercano. En
25 algunas realizaciones, las moléculas de colorante se activan y se vuelven citotóxicas a una longitud de onda de o de aproximadamente 600 nm a 800 nm, o de 660 nm a 740 nm. En algunas realizaciones, las moléculas de colorante se activan y se vuelven citotóxicas a una longitud de onda de aproximadamente o al menos de aproximadamente 600 nm, 610 nm, 620 nm, 630 nm, 640 nm, 650 nm, 660 nm, 670 nm, 680 nm, 690 nm, 700 nm, 710 nm, 720 nm, 730 nm, 740 nm, 750 nm, 760 nm, 770 nm, 780 nm, 790 nm u 800 nm, o dentro de un intervalo entre o entre aproximadamente
30 2 cualesquiera de dichas longitudes de onda. En algunas realizaciones, las moléculas de colorante se activan a una longitud de onda inferior a 600 nm o superior a 800 nm.

En algunas realizaciones, el tumor se irradia a una longitud de onda dentro de un intervalo de o de aproximadamente 600 nm a 800 nm o de 600 nm a 740 nm, tal como de 640 nm a 760 nm, de 660 nm a 740 nm, 680 nm a 720 nm o
35 690 nm a 710 nm. En algunas realizaciones, el tumor se irradia a una longitud de onda de 690 ± 50 nm. Cabe señalar que, en la composición farmacéutica para su uso de la presente invención, el método comprende irradiar la hiperplasia o el tumor a una longitud de onda de 600 a 740 nm.

Las longitudes de onda adecuadas para la activación de la molécula de colorante pueden depender de la molécula de colorante particular utilizada.

40 En algunas realizaciones, las células, la hiperplasia o el tumor se irradian a una dosis de al menos o aproximadamente 1 J cm^{-2} (1 J/cm^2), tal como al menos o aproximadamente 10 J cm^{-2} , al menos o aproximadamente 30 J cm^{-2} , al menos o aproximadamente 50 J cm^{-2} , al menos o aproximadamente 100 J cm^{-2} o al menos o aproximadamente 500 J cm^{-2} , tal como al menos aproximadamente 2 J cm^{-2} , 5 J cm^{-2} , 10 J cm^{-2} , 25 J cm^{-2} , 50 J cm^{-2} , 75 J cm^{-2} , 100 J cm^{-2} , 150 J cm^{-2} , 200 J cm^{-2} , 300 J cm^{-2} , 400 J cm^{-2} o 500 J cm^{-2} . Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células, la hiperplasia o el tumor se irradian a de o de aproximadamente 1 a 1000 J cm^{-2} , de 1 a 500 J cm^{-2} , de 10 a 100 J cm^{-2} o de 10 a 50 J cm^{-2} . En algunas realizaciones, el tumor se irradia a una dosis de al menos $0,5 \text{ J cm}^{-2}$, al menos 1 J cm^{-2} , al menos 2 J cm^{-2} , al menos 3 J cm^{-2} , al menos 4 J cm^{-2} o al menos 5 J cm^{-2} . En algunas realizaciones, las células, la hiperplasia o el tumor se irradia a una dosis de 1 J cm^{-2} . En algunas realizaciones, las células, la hiperplasia o el tumor se irradian a una dosis de al menos o al menos aproximadamente 2 J/cm de longitud de fibra, 5 J/cm de longitud de fibra, 10 J/cm de longitud de fibra, 25 J/cm de longitud de fibra, 50 J/cm de longitud de fibra, 75 J/cm de longitud de fibra, 100 J/cm de longitud de fibra, 150 J/cm de longitud de fibra, 200 J/cm de longitud de fibra, 250 J/cm de longitud de fibra, 300 J/cm de longitud de fibra, 400 J/cm de longitud de fibra o 500 J/cm de longitud de fibra. En
55 algunas realizaciones, las células se irradian a una dosis de al menos 1 J cm^{-1} o 1 J/cm de longitud de fibra. En algunas realizaciones, la célula, la hiperplasia o el tumor se irradia a una dosis de o de aproximadamente 2 J cm^{-2} hasta aproximadamente 400 J cm^{-2} o de o de aproximadamente 2 J/cm de longitud de fibra a aproximadamente 500 J/cm de longitud de fibra. Cabe señalar que, en la composición farmacéutica para su uso de la presente invención, el método comprende irradiar la hiperplasia o el tumor a una dosis de al menos 1 J cm^{-2} o 1 J/cm de longitud de fibra.

60 En algunas realizaciones, el tumor es un tumor superficial. En algunas realizaciones, el tumor se irradia a una dosis de al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 10 J/cm^2 , 25 J/cm^2 , 50 J/cm^2 , 150 J/cm^2 , o 250 J/cm^2 .

65 En algunas realizaciones, el tumor es un tumor intersticial. En algunas realizaciones, el tumor se irradia a una dosis de al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 50 J/cm de longitud de fibra, 100 J/cm de longitud de fibra, 200 J/cm de longitud de fibra o 300 J/cm de longitud de fibra.

En algunas realizaciones, la dosis de irradiación después de la administración de la composición que comprende el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento es al menos 1 J cm^{-2} a una longitud de onda de 660 a 740 nm, por ejemplo, al menos 10 J cm^{-2} a una longitud de onda de 660 a 740 nm, al menos 50 J cm^{-2} a una longitud de onda de 660 a 740 nm o al menos 100 J cm^{-2} a una longitud de onda de 660 a 740 nm, por ejemplo, de 1 a 500 J cm^{-2} a una longitud de onda de 660 a 740 nm. En algunas realizaciones, la longitud de onda es de 660 a 710 nm. En algunas realizaciones, la dosis de irradiación después de la administración de la composición que comprende el conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento es al menos $1,0 \text{ J cm}^{-2}$ a una longitud de onda de 680 nm, por ejemplo, al menos 10 J cm^{-2} a una longitud de onda de 680 nm, al menos 50 J cm^{-2} a una longitud de onda de 680 nm o al menos 100 J cm^{-2} a una longitud de onda de 680 nm, por ejemplo, de 1 a 500 J cm^{-2} a una longitud de onda de 680 nm. En algunas realizaciones, se realizan múltiples irradiaciones, tal como al menos 2, al menos 3 o al menos 4 irradiaciones, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 administraciones separadas.

En algunas realizaciones, las células o sujetos, se pueden irradiar una o más veces. Por tanto, la irradiación se puede completar en un solo día, o se puede hacer de manera repetida en varios días con la misma dosis o con una diferente, tal como irradiar al menos 2 veces diferentes, 3 veces diferentes, 4 veces diferentes, 5 veces diferentes o 10 veces diferentes. En algunas realizaciones, las irradiaciones repetidas pueden realizarse el mismo día, en días sucesivos o cada 1 a 3 días, cada 3 a 7 días, cada 1 a 2 semanas, cada 2 a 4 semanas, cada 1 a 2 meses o incluso a intervalos más prolongados.

En algunas realizaciones, antes, durante o después de la administración del conjugado, el sujeto puede recibir una o más terapias adicionales. En algunas realizaciones, el sujeto recibe uno o más tratamientos para eliminar o reducir el tumor antes de la administración del conjugado.

Tratamientos adicionales

Antes, durante o después de la administración del conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento, el sujeto puede recibir una o más terapias adicionales. En un ejemplo, el sujeto recibe uno o más tratamientos para eliminar o reducir el tumor antes de la administración del conjugado.

En algunas realizaciones, el otro agente o agentes adicionales administrados, o el agente adicional en una terapia de combinación, es una molécula de direccionamiento no conjugada. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento no conjugada es la misma o sustancialmente la misma molécula de direccionamiento que la molécula de direccionamiento del conjugado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, antes de la administración del conjugado, la molécula de direccionamiento, por ejemplo, un anticuerpo no conjugado que se dirige a una proteína o antígeno, se administra al sujeto. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se administra hasta 96 horas antes de la administración del conjugado. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se administra en una dosis dentro de un intervalo de o de aproximadamente 10 mg/m^2 a aproximadamente 500 mg/m^2 . Por ejemplo, la molécula de direccionamiento es cetuximab, y el cetuximab se administra al sujeto hasta 96 horas antes de la administración del conjugado.

Ejemplos de dichas terapias que se pueden utilizar en combinación con los métodos de PIT divulgados, que pueden mejorar la accesibilidad de los agentes terapéuticos adicionales al tumor durante aproximadamente 8 horas después de la PIT, incluyen, pero sin limitación, tratamiento quirúrgico para la extirpación o reducción del tumor, tal como resección quirúrgica, crioterapia o quimioembolización, así como tratamientos farmacéuticos antitumorales que pueden incluir agentes radioterapéuticos, agentes quimioterapéuticos antineoplásicos, antibióticos, agentes alquilantes y antioxidantes, inhibidores de cinasas y otros agentes. En algunos ejemplos, el agente terapéutico adicional se conjuga con una nanopartícula. Los ejemplos particulares de agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o agentes de entrecruzamiento de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y/o ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores de enzimas y reguladores de genes. Estos agentes, que se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz, y los tratamientos se pueden utilizar solos o en combinación. Los expertos en la materia conocen los métodos y dosificaciones terapéuticas de dichos agentes y un médico experto puede determinarlos.

En algunas realizaciones, un agente de unión a microtúbulos se refiere a un agente que interactúa con la tubulina para estabilizar o desestabilizar la formación de microtúbulos, inhibiendo de este modo la división celular. Los ejemplos de agentes de unión a microtúbulos que se pueden utilizar junto con las terapias de conjugados divulgados incluyen, sin limitación, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vindesina, vinorelbina (navelbina), las epotilonas, colchicina, dolastatina 15, nocodazol, podofilotoxina y rizoxina. También se pueden utilizar análogos y derivados de dichos compuestos. Por ejemplo, pueden utilizarse epotilonas y análogos de epotilona adecuados. Los taxoides, tales como paclitaxel y docetaxel, también se pueden utilizar.

Las siguientes clases de compuestos se pueden utilizar con los métodos de PIT divulgados en el presente documento: reguladores de la transcripción de ADN y ARN adecuados, que incluyen, sin limitación, actinomicina D, daunorrubicina, doxorubicina y también son adecuados para su uso en combinación con las terapias desveladas derivados y análogos de los mismos. Los intercaladores y agentes de entrecruzamiento de ADN que se pueden administrar a un sujeto

incluyen, sin limitación, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mitomicinas, tales como mitomicina C, bleomicina, clorambucilo, ciclofosfamida y derivados y análogos de los mismos. Los inhibidores de la síntesis de ADN adecuados para su uso como agentes terapéuticos incluyen, sin limitación, metotrexato, 5-fluoro-5'-desoxiuridina, 5-fluorouracilo y análogos de los mismos. Los ejemplos de inhibidores enzimáticos adecuados incluyen, sin limitación, camptotecina, etopósido, formestano, tricostatina y derivados y análogos de los mismos. Los compuestos adecuados que afectan a la regulación génica incluyen agentes que dan como resultado una expresión aumentada o disminuida de uno o más genes, tales como raloxifeno, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, tamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, mifepristona y derivados y análogos de los mismos. Los inhibidores de cinasas incluyen Gleevac, Iressa y Tarceva que evitan la fosforilación y la activación de factores de crecimiento.

Otros agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes antitumorales, que pueden o no pertenecer a una o más de las clasificaciones anteriores, también son adecuados para la administración en combinación con las terapias PIT divulgadas. A modo de ejemplo, dichos agentes incluyen adriamicina, apigenina, rapamicina, zebularina, cimetidina y derivados y análogos de los mismos.

En algunos ejemplos, al sujeto que recibe la composición de conjugado terapéutico también se le administra interleucina-2 (IL-2), por ejemplo, mediante administración intravenosa. En algunas realizaciones, se administra IL-2, tal como en una dosis de al menos 500.000 UI/kg como bolo intravenoso, tal como durante un período de 15 minutos cada ocho horas, comenzando el día después de la administración de los péptidos y continuando hasta 5 días. Las dosis se pueden omitir dependiendo de la tolerancia del sujeto.

Otros ejemplos de terapias que se pueden utilizar en combinación con la administración del conjugado incluyen, pero sin limitación, el tratamiento quirúrgico para la extirpación o reducción del tumor, tal como resección quirúrgica, crioterapia o quimioembolización, así como tratamientos farmacéuticos antitumorales que pueden incluir agentes radioterapéuticos, agentes quimioterapéuticos antineoplásicos, antibióticos, agentes alquilantes y antioxidantes, inhibidores de cinasas y otros agentes. Los ejemplos particulares de agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o agentes de entrecruzamiento de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y/o ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores enzimáticos, reguladores de genes y DARPIn (proteínas de repetición de anquirina genomanipuladas), tales como mono-DARPIn. Estos agentes, que pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, y los tratamientos, se pueden utilizar solos o en combinación. Los métodos y las dosificaciones terapéuticas de dichos agentes se pueden determinar por un médico experto.

En algunas realizaciones, al menos una parte del tumor, tal como un tumor metastásico, se extrae de manera quirúrgica, por ejemplo, mediante crioterapia, se irradia, se trata de manera química, por ejemplo, mediante quimioembolización, o combinaciones de las mismas, antes de la administración de las terapias divulgadas, tal como la administración del conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento. Por ejemplo, a un sujeto que tiene un tumor metastásico se le puede extirpar de manera quirúrgica todo o parte del tumor antes de la administración de las terapias divulgadas. En algunas realizaciones, se administran uno o más agentes quimioterapéuticos después del tratamiento con el conjugado y la irradiación. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un tumor metastásico y se le administra radioterapia, terapia de quimioembolización o ambas de manera simultánea con la administración de las terapias divulgadas.

III. Definiciones

A menos que se definan de otra manera, se pretende que todos los términos de la técnica, las notaciones y otros términos o terminología técnicos y científicos utilizados en el presente documento tengan el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en el presente documento con fines de claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no se ha de considerar necesariamente como representativa de una diferencia sustancial frente a lo que se comprende en la materia.

Como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más". Se entiende que aspectos y variaciones descritas en el presente documento incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y variaciones.

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos del tema reivindicado se presentan en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la materia objeto reivindicada. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor afirmado o que interviene en el intervalo comentado queda englobado dentro de la materia objeto reivindicada. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse de manera independiente en los intervalos

más pequeños, y también están englobados dentro de la materia objeto reivindicada, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o ambos de los límites incluidos también quedan englobados en la materia objeto reivindicada. Esto es aplicable de manera independiente de la amplitud del intervalo.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Como se utiliza en el presente documento, un "conjugado" se refiere a un polipéptido unido de manera directa o indirecta a una o más de otras moléculas, tales como polipéptidos o fracciones químicas. Dichos conjugados incluyen proteínas de fusión, los producidos mediante conjugados químicos y los producidos mediante cualquier otro método. Por ejemplo, un conjugado se puede referir a un colorante de ftalocianina, tal como una molécula IR700, unido de manera directa o indirecta a una o más moléculas adicionales, tales como polipéptidos o fracciones químicas, tales como a una molécula de direccionamiento que se une o se dirige a una proteína de la superficie celular.

Como se utiliza en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluyendo células. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuoso, no acuoso o cualquier combinación de los mismos.

Como se utiliza en el presente documento, una "composición farmacéutica" o "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que puede administrarse la composición.

Como se utiliza en el presente documento, un "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente incluido en una formulación farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un transportador farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se utiliza en el presente documento, un kit es una combinación envasada que opcionalmente incluye otros elementos, tales como reactivos adicionales e instrucciones de uso de la combinación o elementos de la misma.

El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

Como se utiliza en el presente documento, un "artículo de fabricación" es un producto que se fabrica y, en algunos casos, que se puede vender. En algunas realizaciones, la expresión se puede referir a composiciones contenidas en artículos de envasado, tal como en un recipiente.

Como se utiliza en el presente documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de una causa o afección que incluye, pero sin limitación, infecciones, condiciones adquiridas, condiciones genéticas y caracterizadas por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en el presente documento son aquellos que se tratan con inmunoglobulina.

Como se utiliza en el presente documento, "tratar" a un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se alivian de manera parcial o total, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por tanto, el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. La profilaxis se refiere a la prevención de una posible enfermedad y/o la prevención del empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad.

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" significa cualquier forma en que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, mejoran o se alteran de otra manera beneficiosa.

Como se utiliza en el presente documento, "efecto terapéutico" significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, normalmente corrige o mejora los síntomas de una enfermedad o afección o que cura una enfermedad o afección.

Como se utiliza en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Por lo tanto, es la cantidad necesaria para evitar, curar, mejorar, detener o detener de manera parcial un síntoma de una enfermedad o trastorno.

Como se utiliza en el presente documento, la mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno en particular mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otro tratamiento, se

refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que pueden atribuirse o asociarse con la administración de la composición o tratamiento.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, tal como un ser humano.

Como se utiliza en el presente documento, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

Los encabezados de sección utilizados en el presente documento son solamente para fines de organización y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

IV. Ejemplos

Los ejemplos siguientes se incluyen con fines ilustrativos únicamente y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Conjugación de cetuximab con éster de NHS IRDye 700DX

Este ejemplo describe los procedimientos utilizados para producir un lote a escala de 12 g de conjugado de cetuximab y IRDye 700DX. Los métodos se realizaron utilizando recipientes opacos o translúcidos y, en algunos casos, papel de aluminio para envolver los recipientes o vasos.

Un volumen de 6 l (12 g) de cetuximab (Myoderm USA, Norristown, PA) se cambió de tampón a tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 8,5) utilizando filtración de flujo tangencial (TFF) con una membrana de celulosa regenerada hasta que el pH del filtrado fue 8,46. Se colocaron aproximadamente 6 l (12 g: 78,95 μ mol) de anticuerpo cetuximab diafiltrado (2 mg/ml) en un recipiente de garrafa 2 mg/ml que contenía una barra de agitación estéril.

Se calentaron un frasco de 25 mg, dos frascos de 50 mg y dos frascos de 250 mg de éster de NHS IRDye 700DX (colorante; n.º de cat. 929-70011, Li-COR, Lincoln, NE) almacenados a 20 °C a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta que se vaporizó la humedad de la superficie de los frascos. Para preparar una solución de 10 mg/ml, se añadieron 2,5 ml de DMSO al frasco de 25 mg, se añadieron 5 ml de DMSO a cada uno de los dos frascos de 50 mg y se disolvieron 500 mg del colorante en 50 ml de DMSO.

Se añadió un volumen de 61,7 ml (315,8 μ mol) del colorante suspendido al recipiente de 2 mg/ml envuelto en papel de aluminio durante menos de cinco minutos después de disolver el éster de NHS IRDye 700DX en DMSO. El recipiente se selló y se agitó durante 15 $\pm$ 5 minutos a 300 $\pm$ 50 rpm a temperatura ambiente hasta que el colorante se disolvió completamente y se distribuyó uniformemente en las soluciones de anticuerpos. El vaso de reacción envuelto en papel de aluminio se colocó en una cámara de estabilidad que se protegió de la luz a 25 °C durante 2 horas sin más mezcla.

Una vez completado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 25 ml de glicina 1 M (25 mmol) al recipiente de 2 mg/ml. El recipiente se selló y se agitó durante 10 $\pm$ 5 minutos a 300 $\pm$ 50 rpm. La garrafa se volvió a colocar en la cámara de estabilidad a 25 °C durante 20 minutos sin más mezcla.

Después de que la reacción de desactivación se completase, el conjugado se transfirió al sistema TFF que se colocó en el frigorífico protegido de la luz. Se concentraron seis litros del conjugado hasta aproximadamente 2,5 l utilizando el sistema TFF con la membrana de celulosa regenerada. El producto conjugado concentrado (2,5 l; aproximadamente 5 mg/ml) se diafiltró frente a aproximadamente 25 l (10 volúmenes) de PBS IX, pH 7,1 $\pm$ 0,2 enfriado previamente entre 2 y 8 °C. La diafiltración se realizó entre 2 y 8 °C en condiciones de oscuridad.

Los conjugados intercambiados con tampón (aproximadamente 2,2 l) se filtraron utilizando un filtro equilibrado de manera previa Millipak 40 de 0,22 μ m con PBS 1X, pH 7,1 $\pm$ 0,2.

Después de preparar el material conjugado, la muestra se presentó a aproximadamente 5 mg/ml para las siguientes pruebas: SDS-PAGE, HPLC-SEC y ELISA de unión. También se realizaron otras pruebas de apariencia, pH, bacteriostasis y fungistasis, carga biológica, nivel de endotoxinas, osmolalidad y DMSO residual.

Ejemplo 2: Fotodegradación del producto farmacéutico de cetuximab y IRDye 700DX

Este ejemplo describe los efectos de fotodegradación que tiene la exposición a la luz fluorescente blanca en el producto farmacéutico de cetuximab y IRDye 700DX contenido en frascos transparentes y ámbar que utilizan intensidades de luz fluorescente que se utilizan normalmente para iluminar instalaciones interiores.

Se colocó una muestra de 10 ml de producto farmacológico conjugado de IR-700DX a una concentración de 2,1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,1) en un frasco transparente y uno ámbar de 50 ml con acabado de tipo 1 de 20 mm y se tapó con un tapa de Septa de 20 mm. Las muestras contenidas en los dos tipos diferentes de frascos se expusieron a continuación a luz fluorescente blanca a una intensidad medida de 550 ± 10 lux en las muestras con un medidor de luz de registro de datos Digi-Sense, Modelo n.º: 20250-00 (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL).

Después de un período de tiempo de exposición total de: 1, 2, 24 y 44 horas, se extrajo un volumen de muestra de 500 µl de cada frasco con poca luz (inferior a 50 lux) y se colocó en un frasco de HPLC y se almacenó completamente protegido de la luz a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ hasta que el análisis de cada muestra se realizó mediante un análisis de cromatografía líquida de alta presión utilizando una columna de exclusión por tamaño (HPLC-SEC).

Utilizando este método, se cuantificaron las cantidades relativas de especies de alto peso molecular (agregados) y forma monomérica del cetuximab-IRDye 700DX presentes en cada muestra. Los resultados de estos análisis se muestran en la tabla 1, a continuación, demostrando un aumento significativo en la cantidad de agregados presentes en las muestras a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz. En la figura 1A y 1B se representa un cromatograma de HPLC-SEC ilustrativo de una muestra de cetuximab y IRDye 700DX en un frasco transparente antes y después de 24 horas de exposición a la luz.

Tabla 1: % de agregado determinado por HPLC-SEC encontrado en muestras expuestas a luz blanca		
Tiempo de exposición a la luz (horas)	% de agregado en frasco transparente	% de agregado en frasco ámbar
0	1,0	1,0
1	2,9	2,0
2	4,9	2,8
24	13,0	9,2
44	14,7	11,3

En otro ejemplo, se colocó una muestra de 2 ml de cetuximab-IRDye 700DX a una concentración de 5,5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,1) en dos frascos transparentes. Uno de los frascos se expuso a luz blanca fluorescente a una intensidad de 500 lux durante un período de tiempo total de 15 y 30 minutos. La otra muestra de 2 ml en un frasco transparente se expuso a luz LED verde (Ecosmart GP19, HomeDepot, Atlanta GA) con una intensidad en la muestra de 500 lux medida con el medidor de luz Digi-Sense. Después de la exposición a la luz, se tomaron muestras de 200 µl de cada uno de los frascos para análisis de HPLC-SEC en cada punto temporal de 15 y 30 minutos. En la tabla 2 a continuación se muestra la cuantificación por HPLC-SEC de las cantidades relativas de especies agregadas encontradas en cada una de las muestras de 200 µl analizadas.

Tabla 2: % de agregado encontrado en muestras expuestas a luz verde frente a blanca		
Tiempo de exposición a la luz (minutos)	% de agregado en luz verde	% de agregado en luz blanca
0	1,3	1,3
15	1,6	3,5
30	1,8	5,8

Los datos de la tabla 2 demuestran que las muestras de cetuximab-IRDye 700DX expuestas a la luz blanca tenían cantidades significativamente mayores de especies agregadas presentes en ambos puntos temporales en relación con las muestras expuestas durante el mismo período de tiempo a una intensidad de luz verde.

Ejemplo 3: Método de buenas prácticas de fabricación (GMP) para preparar una sustancia farmacéutica conjugada

Este ejemplo describe un método para preparar una sustancia farmacéutica conjugada según las buenas prácticas de fabricación (GMP), que incluye la preparación de intermedios finales y la conjugación de los intermedios finales. Para garantizar que se cumpla con la calidad farmacéutica del producto final, se tomaron precauciones adicionales durante la fabricación para limitar la exposición del colorante y el conjugado a la luz debido a la fotosensibilidad del colorante. Estas incluyeron el uso de niveles bajos de luz verde con una longitud de onda de 425 a 575 nm y una intensidad inferior a 200 lux en la instalación de fabricación. Así mismo, los métodos también emplearon el uso de una garrafa translúcida para la conjugación, envolviendo el vaso de conjugación con papel de aluminio, y las etapas con posible exposición a la luz se realizaron lo más rápido posible.

Este ejemplo describe un método para preparar el éster de NHS IRDye 700DX (colorante) conjugado con cetuximab para producir el conjugado de cetuximab y IRDye 700DX. Los métodos proporcionados pueden emplearse para preparar cualquier sustancia farmacéutica, tal como una que contiene un conjugado de colorante con una macromolécula y la siguiente descripción se proporciona solo con fines ilustrativos.

A. Preparación de tampones

Los tampones se prepararon utilizando agua altamente purificada (HPW, del inglés "Highly Purified Water") o agua para inyección (WFI, de inglés "Water for Injection") y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm antes de almacenarlos a temperatura ambiente. Las tablas 3 a 5 muestran los controles y las pruebas en proceso para los tampones preparados: tampón de conjugación (fosfato de sodio 100 mM, pH 8,65), tampón de extinción (glicina 1,0 M, pH 9) y tampón de formulación de solución salina tamponada con fosfato (PBS) final: (Na₂HPO₄ 5,60 mM, KH₂PO₄ 1,058, NaCl 154 mM, pH 7,1), respectivamente.

Tabla 3: Preparación del tampón de conjugación (fosfato de sodio 100 mM, pH 8,65)

Controles y pruebas en proceso	Especificación o intervalo
Tiempo de mezcla	≥ 30 min
pH	8,5 a 8,8
Conductividad	11,7 a 14,1 mS/cm
Prueba de integridad del filtro	Aprobada
Endotoxina	≤1,5 UE/ml

Tabla 4: Preparación del tampón de extinción (glicina 1,0 M, pH 9)

Controles y pruebas en proceso	Especificación o intervalo
Tiempo de mezcla	≥ 30 min
pH	8,9 a 9,1
Conductividad	5 a 11 mS/cm
Prueba de integridad del filtro	Aprobada
Endotoxina	≤1,5 UE/ml

Tabla 5: Prueba de liberación de tampón para PBS 1x

Ensayos	Especificación o intervalo
Aspecto	Solución clara
pH	7,0 a 7,2
Osmolalidad	280 a 330 mOsm/kg
Esterilidad	Sin crecimiento
Citotoxicidad	No tóxico

B. Preparación de intermedios de colorantes y cetuximab

1. Preparación de cetuximab

Antes de la conjugación, se pulverizaron frascos de cetuximab (Myoderm USA, Norristown, PA) con alcohol isopropílico estéril y se colocaron en una campana de flujo laminar. Se utilizaron un total de 423 frascos para preparar las sustancias farmacéuticas. Los frascos se desengarzaron con un desengarzador electrónico, los tapones se retiraron con pinzas esterilizadas en autoclave y el contenido se vertió en botellas de PETG estériles de 2 l. Las botellas se taparon cuando se llenaron. A continuación, se filtró el cetuximab a través de un filtro de 0,22 µm y se agruparon en un HyQtaíner de 50 l. El cetuximab filtrado y agrupado se almacenó entre 2 y 8 °C.

A continuación, se realizó una etapa de concentración e intercambio de tampón mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). La limpieza del dispositivo de UF/DF se realizó antes de su uso. La solución de almacenamiento se drenó y la membrana se lavó abundantemente con al menos 20 L de HPW. La unidad se lavó abundantemente con NaOH 0,1 M durante 30 a 40 min y después se lavó abundantemente con HPW. Se confirmó el pH del enjuague. El sistema se equilibró con tampón fosfato sódico 100 mM, pH 8,65. El pH y la conductividad del efluente del permeado y del

retenido se confirmaron antes de su uso. También se realizaron pruebas de endotoxinas; el sistema se utilizó dentro de las 48 horas posteriores a la prueba de endotoxinas.

Antes de las operaciones de UF/DF, el cetuximab filtrado y agrupado se calentó mediante la colocación en una incubadora a 25 °C durante 120 a 150 min. El material se concentró primero hasta un objetivo de 5 mg/ml y después se diafiltró en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 8,65. Se realizó diafiltración hasta que se alcanzaron los objetivos de conductividad y pH del permeado. El sistema se lavó abundantemente con tampón y la descarga se añadió al retenido diafiltrado. Las presiones del sistema de UF/DF se controlaron y registraron durante la operación como se describe en la tabla 6.

Se determinó la concentración de producto de cetuximab diafiltrado y después se diluyó a una concentración objetivo de 2 mg/ml (1,8 a 2,4 mg/ml) utilizando tampón fosfato sódico 100 mM, pH 8,65. El producto se filtró de manera aséptica a través de un filtro de 0,22 µm y se dividió en dos garrafas de 40 l dedicadas al producto esterilizadas en autoclave que contenían barras de agitación y se procesó directamente en la operación de conjugación. Se determinó el peso de cetuximab en cada garrafa.

Tabla 6: Controles y pruebas en proceso para el procesamiento de cetuximab	
Controles y pruebas en proceso	Especificación o intervalo
Agrupación de cetuximab	
Prueba de integridad del filtro (0,22 µm) (después de la agrupación)	Aprobada
Concentración de proteínas después de la agrupación	Informe de resultados
Preparación de la unidad de TFF	
Partes de la TFF tiempo de contacto con NaOH 1,0 M	≥ 60 min
pH de las piezas enjuagadas de la TFF	<7
TOC de piezas enjuagadas de la UF/DF	<1000 ppb
Enjuague de volumen de HPW con membrana	>20 l
Pruebas de integridad de UF/DF antes de su uso	Desplazamiento de aire <90 ml/min
Tiempo de descarga de NaOH 0,1 M	30 a 40 min
pH del permeado y el retenido de la UF/DF tras el lavado HPW	<7
Equilibrio de la TFF	
pH del efluente retenido y permeado de la UF/DF	8,5 a 8,8
Controles y pruebas en proceso	
Conductividad del efluente retenido y permeado de la UF/DF	11,7 a 14,1 mS/cm
Endotoxina en el efluente permeado y retenido de la UF/DF	≤0,134 UE/ml
Diafiltración de cetuximab	
Temperatura de incubación de cetuximab filtrado y agrupado	25 °C
Tiempo de incubación de cetuximab filtrado y agrupado	120 a 150 min
Presión de entrada de alimentación durante la concentración	<0,17 MPa (<25 psi)
Presión de salida del retenido durante la concentración	0,07 MPa a 0,08 MPa (10 a 12 psi)
Presión de retención durante la diafiltración	0,07 MPa a 0,08 MPa (10 a 12 psi)
Presión del sistema de UF/DF durante la diafiltración	<0,22 MPa (<32 psi)
PH del permeado de la UF/DF después de la diafiltración	8,5 a 8,8
Conductividad del permeado de la UF/DF después de la diafiltración	11,7 a 14,1 mS/cm
Concentración de cetuximab (A ₂₈₀) después de la diafiltración	4,5 mg/ml
Concentración de cetuximab (A ₂₈₀) después de la dilución	1,8 a 2,4 mg/ml

2. Preparación de colorante

Antes de la conjugación, se preparó éster de NHS IRDye 700DX (colorante; n.º de cat. 929-70011; Li-COR, Lincoln, NE) mediante la disolución a una concentración de 10 mg/ml en DMSO anhidro. Las etapas se realizaron bajo luz verde (por ejemplo, longitud de onda de 425 a 575 nm y una intensidad inferior a 200 lux) para proteger el colorante de las longitudes de onda de la luz que son fuertemente absorbidas por el colorante.

C. Conjugación

Las etapas de conjugación y desactivación se realizaron en garrafas de 2 ×40 l (envueltas en papel de aluminio para protegerlas de la luz) que contenían cetuximab diafiltrado. Las etapas se realizaron a temperatura ambiente bajo luz verde (por ejemplo, longitud de onda de 425 a 575 nm y una intensidad inferior a 200 lux) para proteger el conjugado de la fotodegradación.

Para la reacción de conjugación, se calculó la cantidad adecuada de éster de NHS IRDye 700DX en DMSO (basado en el peso de cetuximab en cada garrafa, normalmente de 80 a 120 g) para lograr una proporción molar final de 4:1 (éster de NHS IRDye 700DX:cetuximab). Los estudios de desarrollo de procesos han determinado que esta proporción, junto con el tiempo de incubación de conjugación dirigida, debe incorporar de 2 a 3 restos de colorante por molécula de cetuximab. La cantidad calculada del éster de NHS IRDye 700DX se añadió a las garrafas que contenían cetuximab y se mezcló en una placa de agitación durante 10 a 15 min. La reacción de conjugación prosiguió después durante 120 min mediante la colocación de las garrafas en una incubadora a 25 °C.

La reacción de conjugación se detuvo mediante la adición de glicina 1 M hasta una concentración final de 4,2 mM y se mezcló durante 10 a 12 min. Las garrafas se incubaron durante 20 a 25 min más en la incubadora a 25 °C. La tabla 7 muestra los controles y las pruebas en proceso para las etapas de conjugación y desactivación.

Tabla 7: Controles y pruebas en proceso para las etapas de conjugación y desactivación	
Controles y pruebas en proceso	Especificación o intervalo
Tiempo de mezcla de la etapa de conjugación	10 a 15 min
Tiempo de incubación de la etapa de conjugación	120 (115 a 125) min
Temperatura de incubación de la etapa de conjugación	25 (23 a 27) °C
Tiempo de mezcla de la etapa de desactivación	10 a 12 min
Tiempo de incubación de la etapa de desactivación	20 a 25 min
Temperatura de incubación de la etapa de desactivación	25 (23 a 27) °C

Se realizó una etapa final de UF/DF para intercambiar el producto conjugado en el tampón de formulación de PBS final. La limpieza del sistema de UF/DF se realizó antes de su uso. La unidad se limpió y las piezas se remojaron en NaOH 1,0 M y después se aclararon con HPW. El sistema se equilibró con PBS, pH 7,1 hasta que el permeado estuvo dentro de las especificaciones. Se analizaron el permeado y el retenido para detectar endotoxinas.

El conjugado desactivado se transfirió al sistema de UF/DF y primero se concentró de 8 a 10 l seguido de diafiltración con 8 a 12 diavolumenes de PBS para intercambiar el producto en el tampón de formulación final. Se confirmaron el pH y la conductividad. El sistema se lavó abundantemente con tampón y la descarga se añadió al producto final. Se determinó la concentración de proteína y, si era necesario, se realizó una dilución adicional con PBS para alcanzar una concentración final de producto objetivo de 2,0 mg/ml (1,8 a 2,1 mg/ml).

Se realizó una filtración final a través de un filtro de 0,22 µm y la sustancia farmacéutica conjugada de cetuximab-IRDye 700DX se almacenó en la oscuridad entre 2 y 8 °C en un HyQtaíner de 50 l cubierto con papel de aluminio para proteger el contenido de la luz. Las etapas se realizaron a temperatura ambiente bajo luz verde para proteger el conjugado de cetuximab-IRDye 700DX. La sustancia farmacéutica conjugada de cetuximab-IRDye 700DX se procesó directamente en la estabilidad del producto farmacéutico dentro de las 4 semanas posteriores a su fabricación. En algunos casos, el producto farmacéutico se guardó dentro de aproximadamente 1 semana después de la preparación de la sustancia farmacéutica.

La tabla 8 muestra los controles y pruebas en proceso para la UF/DF final, filtración y almacenamiento. En algunos casos, se requirió dilución.

Tabla 8: Controles y pruebas en proceso para la UF/DF final, filtración y almacenamiento	
Controles y pruebas en proceso	Especificación o intervalo
Preparación de la unidad de TFF	
Tiempo de descarga de NaOH 0,1 M	30 a 40 min
Volumen de enjuague HPW	≥ 20 l
Equilibrio de la TFF	
pH del permeado después del equilibrio	7,0 a 7,2
Endotoxina en el efluente permeado y retenido de la UF/DF	≤0,134 UE/ml

(continuación)

Diafiltración del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX	
pH del permeado después de la diafiltración	7,0 a 7,2
Conductividad del permeado después de la diafiltración	11 a 16 mS/cm
Concentración de proteína conjugada diana (SEC-HPLC) después de la diafiltración	1,8 a 2,1 mg/ml
Prueba de integridad del filtro	Aprobada

Después de preparar el material conjugado, la muestra se presentó para SEC-HPLC para determinar la concentración, proporción de colorante a anticuerpo (DAR, del inglés "dye to antibody ratio"), identidad y pureza. También se realizaron otras pruebas de apariencia, pH, biocarga y nivel de endotoxinas. La tabla 9 muestra los resultados de estas pruebas para un producto en lote ilustrativo con referencia al criterio de aceptación general para la sustancia farmacéutica.

Tabla 9: Especificaciones de la sustancia farmacéutica			
Prueba	Criterio de aceptación	Resultado	Aprobada/ No aprobada
Aspecto	Líquido de verde a azul Puede contener partículas visibles	Confórmers	Aprobada
Carga biológica	<1 UFC/ml	0 UFC/ml	Aprobada
Endotoxina (LAL)	<0,067 UE/mg	<0,06 UE/mg	Aprobada
pH	7,1 ± 0,5	7,1	Aprobada
Concentración por SEC-HPLC	1,8 a 2,1 mg/ml	2,0 mg/ml	Aprobada
DAR por SEC-HPLC (A690/A280 con corrección de colorante)	1,5 a 4,0	2,9	Aprobada
Identidad por SEC-HPLC (A690)	Tiempo de retención relativo del máximo de monómero: 0,90 a 1,1 0 del máximo de monómero estándar de referencia	Tiempo de retención relativo del máximo de monómero: 0,99 del máximo de monómero estándar de referencia	Aprobada
Pureza por SEC-HPLC (A690)	Monómero ≥92,0 % HMW ≤5,0 % LMW ≤5,0 % Colorante libre: ≤3 %	Monómero 100,0 % HMW 0,0 % LMW 0,0 % Colorante libre: 0 %	Aprobada

10 Ejemplo 4: Finalización y envasado del producto farmacéutico

El producto farmacéutico conjugado de cetuximab-IRDye 700DX final se preparó y envasó utilizando métodos que incluían un llenado aséptico semiautomático en frascos de vidrio ámbar estériles y despirogenados. Los frascos se taparon, se sellaron y después se inspeccionaron. Se tomaron precauciones durante todas las operaciones de exposición del producto para minimizar la exposición a la luz, incluido el uso de luz verde de baja intensidad (por ejemplo, de longitud de onda de 425 a 575 nm y una intensidad inferior a 200 lux) durante la filtración estéril, las operaciones de llenado y los procesos de inspección. Además del uso de luz verde de baja intensidad durante todas las etapas que requieren cierta exposición a la luz, el producto a granel y colocado en frascos se cubrió con materiales o recipientes opacos en todos los demás momentos. El control ambiental de la habitación, equipo y personal se realizó a lo largo de los procesos de filtración y llenado estériles.

Antes del llenado, los frascos, los tapones y los precintos se limpiaron y esterilizaron según procediera. Los frascos de vidrio se limpiaron con agua altamente purificada (HPW) y agua para inyección (WFI). A continuación, se inspeccionaron de manera visual los frascos y se retiraron los frascos defectuosos antes de la preparación adicional. Los frascos se colocaron en rejillas y se taparon, seguido de despirogenación. Los sellos se lavaron con HPW/WFI. Tanto los frascos como los sellos se esterilizaron (esterilizaron en autoclave) antes de su uso. Los tapones se compraron listos para usar (limpios y esterilizados).

El producto farmacéutico conjugado de cetuximab-IRDye 700DX se filtró de manera aséptica utilizando un filtro estéril de 0,22 µm y se probó la integridad del filtro después de la etapa de filtración. A continuación, se pesó el filtrado estéril para determinar el número aproximado de frascos que se deben llenar y almacenar entre 2 y 8 °C durante la noche,

protegidos de la luz, antes del llenado.

Antes de las operaciones de llenado, se probó el engarzador. Se taponaron y engarzaron diez frascos vacíos y se confirmó la presión (0,14 a 0,28 MPa (20 a 40 psi)). Se midieron los pesos de los frascos vacíos para cinco frascos para determinar el peso medio de los frascos vacíos. Este resultado se utilizó para determinar el intervalo de peso para frascos llenos, asumiendo un llenado de 51 ± 1 ml y una densidad de 1 g/ml para la solución a granel del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX. Se realizó una verificación de llenado en tres frascos antes de comenzar el llenado para asegurar que el peso del frasco lleno estuviera dentro de las especificaciones. El conjugado de cetuximab-IRDye 700DX filtrado estéril se llenó en frascos utilizando una bomba peristáltica y un conjunto de aguja de llenado. Los frascos se taparon y se transfirieron para sellar y engarzar. Se realizaron controles del peso de los frascos en frascos llenos que contenían la solución, los tapones y los sellos para cada bandeja durante el proceso de llenado; se comprobaron 5 frascos por bandeja y cada bandeja contenía hasta 30 frascos. La duración del llenado se estableció en ≤ 8 h 49 min según los resultados de la calificación del llenado medio. Los frascos llenos se colocaron en recipientes para protegerlos de la luz y se almacenaron entre 2 y 8 °C.

Todos los frascos llenos del lote se inspeccionaron de manera visual para detectar el sobrellenado, el llenado insuficiente, sellos defectuosos y otros defectos y los frascos defectuosos se separaron del lote. Los frascos se almacenaron a 5 ± 3 °C, protegidos de la luz, antes de las operaciones de etiquetado.

El etiquetado de los frascos se realizó con protección contra la luz con luz verde. Los frascos se etiquetaron a temperatura ambiente, teniendo cuidado de evitar una exposición excesiva a la temperatura ambiente. Después del etiquetado, los frascos se almacenaron en un contenedor no transparente y se volvieron a almacenar a 5 ± 3 °C. Se realizó una segunda inspección visual al 100 % y se retiraron los frascos defectuosos. Los frascos se volvieron a almacenar a 5 ± 3 °C, protegidos de la luz, antes de las operaciones finales de envasado secundario.

El envasado secundario/terciario se realizó mediante la colocación de un frasco de una sola unidad en un solo saco de aluminio. El saco proporcionó un 100 % de protección contra la luz. El saco que contenía el frasco se colocó después en una caja de cartón como una medida adicional de protección contra la luz. Los frascos almacenados en su envase secundario se mantuvieron a 5 ± 3 °C antes de su distribución y uso clínico.

Después de preparar el material conjugado, la muestra se presentó para SEC-HPLC para determinar la concentración, proporción de colorante a anticuerpo (DAR, del inglés "dye to antibody ratio"), identidad y pureza. También se realizaron otras pruebas de apariencia, pH, biocarga y nivel de endotoxinas. La tabla 9 muestra los resultados de estas pruebas para un producto en lote ilustrativo con referencia al criterio de aceptación general para la sustancia farmacéutica.

Después de la preparación del producto farmacéutico, se presentaron muestras para SEC-HPLC para determinar la concentración, proporción de colorante a anticuerpo (DAR, del inglés "dye to antibody ratio"), identidad y pureza. También se realizaron otras pruebas de apariencia, pH, volumen de llenado, esterilidad, nivel de endotoxinas, partículas y pureza mediante SDS-PAGE. La tabla 10 describe el criterio de aceptación general para el producto farmacéutico basado en estas pruebas.

Tabla 10: Especificaciones de productos farmacéuticos		
Prueba	Criterio de aceptación de la liberación	Criterio de aceptación de la estabilidad
Aspecto	Líquido de verde a azul Puede contener partículas visibles	El mismo
pH	$7,1 \pm 0,5$	El mismo
Volumen de llenado	No menos de 50 ml	ND
Concentración por SEC-HPLC	Liberación: 1,8 a 2,2 mg/ml	1,8 a 2,4 mg/ml
Identidad por SEC-HPLC (A690)	Tiempo de retención relativo del máximo de monómero: 0,90 a 1,10 del estándar de referencia	El mismo
	máximo del monómero	
Pureza por SEC-HPLC (A690)	Monómero $\geq 90,0$ %	El mismo
	Liberación: HMW $\leq 5,0$ %	HMW $\leq 10,0$ %
	Liberación: LMW $\leq 5,0$ %	LMW $\leq 10,0$ %
	Liberación: Colorante libre $\leq 7,0$ %	Colorante libre $\leq 10,0$ %
Pureza por SDS-PAGE, Reducida, Coomassie	Pureza (cadenas pesadas y ligeras juntas) ≥ 90 %	El mismo
	Las bandas principales se ajustan al patrón de referencia	El mismo
Pureza por SDS-PAGE, No reducida, Coomassie	Banda principal $\geq 90,0$ % de pureza	El mismo
	La banda principal se ajusta al patrón de referencia	El mismo

(continuación)

Tabla 10: Especificaciones de productos farmacéuticos		
Prueba	Criterio de aceptación de la liberación	Criterio de aceptación de la estabilidad
DAR SEC-HPLC (A690/A280 con corrección de colorante A280)	Liberación: DAR 1,5 a 4,0	Informe de resultados
ELISA para la unión del antígeno EGFR	50 a 150 % del patrón de referencia	Informe de resultados
Esterilidad	Negativo para el crecimiento	El mismo
Endotoxina	<0,067 UE/mg	El mismo
Partículas	No realizado	Informe de resultados

Ejemplo 5: Métodos de tratamiento con el conjugado de cetuximab-IRDye 700DX

- 5 Este ejemplo describe métodos terapéuticos para tratar el cáncer de cabeza y cuello mediante la administración intravenosa a un sujeto del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX, preparado, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 3. En condiciones de luz controlada, al sujeto se le administró 160 mg/m² del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX seguido de irradiación con luz infrarroja cercana para inducir fotoinmunoterapia. En algunos casos, a un sujeto se le administra una dosis de conjugado de cetuximab-IRDye 700DX dentro de un intervalo de 750 mg/m² hasta 1250 mg/m².

Preparación de bolsas intravenosas (i.v.) para infusión

- 15 Antes de la infusión del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX, el conjugado no se expuso a la luz solar directa o indirecta. Las operaciones con el conjugado de cetuximab-IRDye 700DX se realizaron en salas con iluminación fluorescente. No se utilizó iluminación de tungsteno. Se implementó la protección contra la exposición a la luz ambiental.

- 20 Se prepararon bolsas intravenosas (i.v.) que contenían el conjugado a partir de frascos que contenían 50 ml de una solución 2 mg/ml del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX. Se abrió el envase de cada frasco que contenía el conjugado y el contenido de ese frasco se colocó en una bolsa i.v. estéril. Se repitió el proceso de abrir cada frasco individual y colocar el contenido en la bolsa i.v. hasta que se alcanzó la dosis deseada del conjugado para infusión. Cada frasco se abrió por separado y se colocó en la bolsa i.v. para reducir la exposición del medicamento a la luz ambiental. El proceso se realizó en menos de 15 min. La bolsa i.v. estaba cubierta en todo momento por una funda opaca para proteger el conjugado de la exposición a la luz. Después de la preparación, la bolsa i.v. se almacenó entre 2 y 8 °C.

Administración

- 30 Al sujeto se le administró el conjugado mediante infusión i.v. durante 2 horas el día 1. Durante la infusión, la iluminación de la sala de tratamiento era inferior a 200 lux de luz fluorescente. Todas las ventanas de la habitación estaban cubiertas con cortinas. La bolsa i.v. se cubrió durante la administración con una funda opaca para proteger el conjugado de la exposición a la luz. Cualquier exposición a la luz se limitó a menos de 5 minutos.

- 35 Para inducir la fotoinmunoterapia, se realizó una aplicación de luz con una luz que tenía una longitud de onda de 690 nm a las 24 horas $\pm$ 2 h (día 2) después de la administración del conjugado.

- 40 El sujeto regresó para un seguimiento el día 4 y todos los tumores tratados presentaron necrosis. El sujeto no mostró efectos adversos y no informó ningún dolor. No se detectó fotosensibilidad cutánea.

- 45 Opcionalmente, antes de la administración del conjugado, el sujeto fue tratado previamente con 100 mg de Erbitux® administrados por infusión i.v. durante 30 minutos. Durante la infusión, se evaluó al sujeto para posibles reacciones a la infusión de Erbitux®. Después de la infusión de 100 mg de Erbitux®, pero justo antes de la infusión del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX, se trató previamente al sujeto con 50 mg de antihistamínico Benadryl (difenhidramina) y 10 mg del esteroide Decadron (Dexametasona) mediante administración i.v. para limitar el riesgo de hipersensibilidad a la infusión del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX.

Ejemplo 6: Estabilidad del pH del producto farmacéutico

- 50 Para evaluar el efecto del pH, la concentración y/o la formulación tampón sobre la estabilidad a largo plazo del conjugado, se preparó una serie de cuatro formulaciones de tampón que contenían el conjugado de cetuximab-IRDye 700DX en dos concentraciones, 2 mg/ml y 5 mg/ml, para un total de ocho formulaciones de tampón a pH 5,5 o pH 7,1. Las ocho formulaciones de tampón preparadas fueron las siguientes:

- 55 **BF n.º 1:** [2 mg/ml de conjugado] Solución salina tamponada con fosfato HyClone (1X), PO₄ 6,7 mM (pH 7,0 a 7,2)

sin calcio, Magnesio (n.º de cat. de HyClone SH30256).

BF n.º 2: [2 mg/ml de conjugado] Citrato de sodio 10 mM, Glicina 100 mM, NaCl 100 mM, Tween 80 al 0,01 %, pH $5,5 \pm 0,1$

BF n.º 3: [2 mg/ml de conjugado] Citrato de sodio 20 mM, Cloruro de sodio 120 mM, EDTA 2 mM, Tween 80 al 0,01 %, pH $5,5 \pm 0,1$

BF n.º 4: [2 mg/ml de conjugado] Citrato de sodio 20 mM, Manitol al 4 %, EDTA 2 mM, Tween 80 al 0,01 %, pH $5,5 \pm 0,1$

BF n.º 5: [5 mg/ml de conjugado] Solución salina tamponada con fosfato HyClone (1X), PO₄ 6,7 mM (pH 7,0 a 7,2) sin calcio, Magnesio (n.º de cat. de HyClone SH30256).

BF n.º 6: [5 mg/ml de conjugado] Citrato de sodio 10 mM, Glicina 100 mM, NaCl 100 mM, Tween 80 al 0,01 %, pH $5,5 \pm 0,1$

BF n.º 7: [5 mg/ml de conjugado] Citrato de sodio 20 mM, Cloruro de sodio 120 mM, EDTA 2 mM, Tween 80 al 0,01 %, pH $5,5 \pm 0,1$

BF n.º 8: [5 mg/ml de conjugado] Citrato de sodio 20 mM, Manitol al 4 %, EDTA 2 mM, Tween 80 al 0,01 %, pH $5,5 \pm 0,1$

En este ejemplo, la estabilidad se realizó en BF n.º 5 a BF n.º 8 utilizando condiciones para inducir la degradación forzada como sigue. Se colocó un volumen de muestra de 750 µl de cada una de las 4 formulaciones BF n.º 5 a 8 en frascos de polipropileno de 2 ml con tapón de rosca y se cubrieron con papel de aluminio para proteger las muestras de la luz. Los cuatro tubos se colocaron en un baño de agua a 45 °C y se dejaron incubar durante 16 horas. A continuación, los frascos se transfirieron a un frigorífico y se almacenaron a entre 2 y 8 °C durante un período de 1 semana. Las muestras se sacaron del frigorífico y se centrifugaron a 5.000 x g durante 5 minutos. Al inspeccionar los tubos se observó que las 3 muestras del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX formuladas en los sistemas tampones a pH 5,5 (BF n.º 6, BF n.º 7 y BF n.º 8) tenían todos una cantidad significativa de material azul precipitado en el fondo de cada tubo. Sin embargo, la muestra BF n.º 5 que se formuló en PBS a pH = 7,1 no mostró ningún precipitado visual.

Se obtuvo una muestra de la solución sobrenadante de cada una de las cuatro muestras y se realizó un análisis de HPLC-SEC para determinar la concentración de la forma monomérica del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX que quedaba en cada una de las muestras. Los resultados de ese análisis se muestran a continuación en la tabla 11 junto con las concentraciones iniciales determinadas para cada una de las muestras antes de ser sometidas a las condiciones del estudio de degradación forzada.

Tabla 11: Resultados del estudio de degradación forzada		
Muestra	Concentración inicial (mg/ml)	Concentración final (mg/ml)
BF n.º 5	5,2	5,1
BF n.º 6	5,3	3,7
BF n.º 7	5,3	4,1
BF n.º 8	5,2	3,6

Los datos de la tabla 11 muestran que todas las muestras del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX formuladas en los sistemas tampones a pH 5,5 (BF n.º 6, BF n.º 7 y BF n.º 8) mostraron una pérdida significativa (20 % o más) en la concentración de la forma monomérica del producto conjugado. En contraste con estos resultados, la muestra BF n.º 5 (pH = 7,1) mostró pocos cambios en la concentración. Estos resultados indicaron que el producto farmacéutico conjugado de cetuximab-IRDye 700DX también podría ser menos estable en sistemas tampón a pH = 5,5 tras un almacenamiento a largo plazo (por ejemplo, más de 6 meses) del producto en condiciones de almacenamiento de 2 a 8 °C.

Ejemplo 7: Estabilidad de almacenamiento a largo plazo del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX en sistemas tampón a pH = 5,5 frente a PBS a pH = 7,1

Se almacenaron muestras del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX en las cuatro formulaciones de tampón descritas anteriormente que contenían el conjugado en las dos concentraciones, 2 mg/ml y 5 mg/ml (BF n.º 1 a 8), durante un período de 12 meses a entre 2 y 8 °C protegidos de la luz en tubos de polipropileno de 15 ml. Después de los 12 meses de almacenamiento a entre 2 y 8 °C, las muestras se inspeccionaron visualmente para detectar la formación de un precipitado. Se observó en esta inspección que todas las muestras a pH = 5,5 (BF n.º 2, BF n.º 3, BF n.º 4, BF n.º 6, BF n.º 7 y BF n.º 8) contenían una cantidad significativa de material azul insoluble que se había adherido al fondo y los lados de sus tubos de almacenamiento. Por el contrario, las dos muestras en el sistema tampón PBS pH = 7,1 (BF n.º 1 y BF n.º 5) no mostraron ninguna indicación de material insoluble. Esta observación indica que el conjugado de cetuximab-IRDye 700DX no es estable y puede precipitar después de un almacenamiento prolongado en un sistema tampón a un pH <6, incluso a temperaturas de 2 a 8 °C y protegido de la luz. En cambio, el conjugado de cetuximab-

IRDye 700DX que se formuló en un tampón a pH superior a 6,0, tal como aproximadamente pH 7,1, da como resultado la estabilidad del producto farmacéutico incluso después de un almacenamiento prolongado a entre 2 y 8 °C hasta por 1 año.

5 **Ejemplo 8: Evaluación de la actividad de destrucción celular y composición de varios conjugados de anticuerpos e IRDye 700DX**

Se realizaron estudios para evaluar si los conjugados de anticuerpo-IRDye 700DX expuestos previamente a diferentes longitudes de onda de luz afectan de manera diferente a la formación de agregados solubles. Se marcaron dos anticuerpos diferentes, anti-PD-L1 de ratón antihumano (N.º de catálogo: 329728, Biolegend, San Diego, CA) y anti-EGFR (cetuximab; Myoderm USA, Norristown, PA), con IRDye 700DX y se evaluaron para evaluar si la exposición previa a diferentes longitudes de onda de luz afectaba la formación de agregados solubles.

15 **A. Conjugación de anticuerpos**

Ambos anticuerpos se conjugaron con IRDye 700DX utilizando el mismo enfoque. Para todos los conjugados descritos a continuación, el protocolo general utilizado para conjugar los anticuerpos fue similar al de la conjugación a mayor escala con cetuximab-IRDye 700DX descrito en el ejemplo 1. Se realizaron modificaciones al protocolo para volúmenes de reacción a menor escala que utilizaron 3 mg o menos de proteína.

La solución de anticuerpo (ya sea anticuerpo anti-PD-L1 o anticuerpo anti-EGFR) se intercambió primero con solución salina tamponada con fosfato pH 7 utilizando un filtro centrífugo con un límite de peso molecular de 30.000 dalton, a continuación, el pH de la solución de anticuerpo se ajustó a un pH de 8,5 con la adición de tampón fosfato a pH = 9. Se descongelaron a temperatura ambiente las alícuotas sólidas congeladas de éster de NHS IRDye 700DX (n.º de catálogo 929-70011; Li-COR, Lincoln, NE), a continuación se disolvieron con DMSO para lograr una concentración de 10 mg/ml. En un entorno oscuro, se añadió después el éster de NHS IRDye 700DX solubilizado a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 4 (éster de NHS IRDye 700DX) a 1 (anticuerpo). La reacción de conjugación se desarrolló a 25 °C durante 2 horas protegida de la luz. Se añadió glicina (pH 8,2) hasta una concentración final de 10 mM durante 15 minutos para desactivar la reacción. La solución de conjugado de anticuerpo se intercambió después con un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 30.000 dalton con 24 ml de PBS pH 7 para eliminar el colorante libre, la glicina y la glicina-IRDye 700DX, y ajustar el pH de la solución de nuevo a pH 7. Los conjugados de anticuerpos se analizaron con cromatografía de exclusión por tamaño para evaluar la concentración de anticuerpo-IRDye 700DX, la pureza del monómero, el % de agregado soluble y la proporción de colorante a anticuerpo (DAR).

35 **B. Efectos de la exposición previa a la luz en la composición del conjugado de IRDye 700DX**

Se analizó la formación de agregados solubles en el conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX en cuatro condiciones diferentes con al menos 30 µl de conjugado a una concentración de conjugado de anticuerpo de 850 µg/ml. Las cuatro condiciones de tratamiento fueron las siguientes: (1) conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX almacenado a 4 °C protegido de la luz (control "4 °C"); (2) conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX colocado en un tubo de vidrio transparente de HPLC bajo una lámpara halógena (N.º de catálogo: PL-800, Dolan-Jenner, Buxborough, MA) a 2500 lux durante 24 horas ("luz blanca"); (3) conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX colocado en un tubo de vidrio transparente de HPLC envuelto en papel de aluminio para protegerlo de la exposición a la luz bajo una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas ("sin luz", utilizado para controlar los efectos del calentamiento térmico en la formación de agregados); y (4) conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX colocado en un tubo de vidrio transparente de HPLC y expuesto a una lámpara LED verde (N.º de catálogo: Green-ECS GP19 EcoSmart) a 2500 lux durante 24 horas ("luz verde"). Después de 24 horas bajo cada condición de tratamiento, se evaluaron la pureza del monómero y la formación de agregados solubles mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Los resultados para el conjugado de anti-PD-L1-IRDye 700DX se muestran en la tabla 12. Como se muestra, el conjugado de anti-PD-L1-IRDye 700DX (DAR~3) que se almacenó a 4 °C presentó una baja formación de agregados solubles (<1,5 %) y una alta pureza de monómeros (>96 %) medida por la absorbencia a 280 nm y la absorbencia a 690 nm. La exposición del conjugado de anti-PD-L1-IRDye 700DX a 2500 lux de luz blanca de una lámpara halógena dio como resultado un aumento significativo en la formación de agregados solubles (~30 %) y una disminución simultánea en la pureza del monómero (~65 %) según lo medido mediante la absorbencia a 280 nm y la absorbencia a 690 nm. El anti-PD-L1-IRDye 700DX expuesto a los efectos de calentamiento térmico de la luz blanca de 2500 lux de una lámpara halógena, pero protegido de la iluminación con papel de aluminio, no indujo ningún aumento en la formación de agregados solubles en comparación con el de la muestra de control a 4 °C. El conjugado de anti-PD-L1-IRDye 700DX expuesto a la luz de una lámpara LED verde dio como resultado un aumento muy pequeño en la formación de agregados solubles (~5 %), que fue una cantidad significativamente menor de formación de agregados solubles que la del anti-PD-L1-IRDye 700DX expuesto a la luz blanca.

Tabla 12: Formación de agregados con anti-PD-L1-IRDye 700DX con diferentes tipos de exposición a la luz.				
Tratamiento	Tiempo de retención de agregados [min]	Tiempo de retención de monómeros [min]	% de agregados (agregado/total)	% de monómero (monómero/total)
1) Anti-PD-L1-IRDye 700DX: 4 °C	7,2	8,3	1,2 % (280 nm) 1,1 % (690 nm)	96,7 % (280 nm) 98,4 % (690 nm)
2) Anti-PD-L1-IRDye 700DX: Luz blanca de 2500 lux, 24 horas	6,8	7,6	30,9 % (280 nm) 29,5 % (690 nm)	65,0 % (280 nm) 64,7 % (690 nm)
3) Anti-PD-L1-IRDye 700DX: Sin luz, 24 horas	7,2	8,3	1,1 % (280 nm) 1,1 % (690 nm)	98,9 % (280 nm) 98,2 % (690 nm)
4) Anti-PD-L1-IRDye 700DX: Luz verde de 2500 lux, 24 horas	7,2	8,3	5,4 % (280 nm) 5,1 % (690 nm)	94,6 % (280 nm) 94,4 % (690 nm)

Los resultados del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX se muestran en la tabla 13. Los conjugados de cetuximab-IRDye 700DX (DAR - 3) que se almacenaron a 4 °C no tuvieron ninguna formación de agregados solubles detectable (-0 %) ni una alta pureza de monómeros (-100 %) medida a una absorbencia a 280 nm y absorbencia a 690 nm. La exposición del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX a luz blanca de 2500 lux de una lámpara halógena dio como resultado un aumento significativo en la formación de agregados solubles (~40 %) y una disminución simultánea en la pureza del monómero (~55 %) según lo medido mediante la absorbencia a 280 nm y la absorbencia a 690 nm. El cetuximab-IRDye 700DX expuesto a los efectos de calentamiento térmico de una luz blanca de 2500 lux de una lámpara halógena, pero protegido de la iluminación con papel de aluminio, no indujo ningún aumento en la formación de agregados solubles en comparación con el de la muestra de control a 4 °C. La exposición del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX a la luz de una lámpara LED verde dio como resultado un aumento menor en la formación de agregados solubles (~4 %), que fue una cantidad significativamente menor de formación de agregados solubles que la del cetuximab-IRDye 700DX expuesto a luz blanca.

Tabla 13: Formación de agregados de cetuximab-IRDye 700DX con diferentes tipos de exposición a la luz.				
Muestra	Tiempo de retención de agregados [min]	Tiempo de retención de monómeros [min]	% de agregados (agregado/total)	% de monómero (monómero/total)
1) Cetuximab-IRDye 700DX: 4 °C	ND	8,2	0 % (280 nm) 0,2 % (690 nm)	100 % (280 nm) 99,3 % (690 nm)
2) Cetuximab-IRDye 700DX: Luz blanca de 2500 lux, 24 horas	7,1	7,9	40,5 % (280 nm) 41,8 % (690 nm)	55,3 % (280 nm) 53,8 % (690 nm)
3) Cetuximab-IRDye 700DX: Sin luz, 24 horas	7,3	8,2	0,3 % (280 nm) 0,2 % (690 nm)	99,6 % (280 nm) 99,6 % (690 nm)
4) Cetuximab-IRDye 700DX: Luz verde de 2500 lux, 24 horas	7,3	8,2	3,9 % (280 nm) 3,5 % (690 nm)	96,1 % (280 nm) 96,0 % (690 nm)

Ejemplo 9: Duración de la exposición previa de la iluminación fluorescente blanca frente a la iluminación LED verde y su efecto sobre la formación de agregados solubles de cetuximab-IRDye 700DX y la potencia de la PIT

Los siguientes estudios se realizaron para evaluar si los conjugados de cetuximab-IRDye 700DX expuestos previamente a diferentes longitudes de onda de luz y para diferentes duraciones de exposición afectaban de manera diferente la formación de agregados solubles y la actividad farmacológica.

Se conjugó cetuximab-IRDye 700DX como se describe en el ejemplo 1. Se evaluaron las siguientes 14 condiciones diferentes: la muestra se expuso a una luz blanca fluorescente de 500 lux a 25 °C para diferentes duraciones de exposición a la luz a las 24 horas, 12 horas, 6 horas, 3 horas, 1,5 horas y 45 minutos; la muestra se expuso a 500 lux de iluminación LED verde (N.º de catálogo: Green-ECS GP19 EcoSmart) a 25 °C para diferentes duraciones de exposición a la luz a las 24 horas, 12 horas, 6 horas, 3 horas, 1,5 horas y 45 minutos; la muestra no se expuso a luz a 25 °C; y la muestra no se expuso a luz a 4 °C. La duración de la exposición a la luz durante 24 horas, 12 horas, 6 horas, 3 horas, 1,5 horas y 45 minutos corresponden a 12.000 lux-horas, 6.000 lux-horas, 3.000 lux-horas, 1.500 lux-horas, 750 lux-horas o 375 lux-horas, respectivamente. Para cada condición, se colocaron 30 µl de conjugado en un frasco transparente de HPLC por muestra a una concentración de conjugado de anticuerpo de 2 mg/ml y la muestra se expuso a cada condición de luz.

La estabilidad del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX después de la exposición a luz blanca o luz verde durante diferentes períodos de tiempo se evaluó mediante el seguimiento de la formación de agregados solubles y la actividad destructora de la PIT.

5 1. Formación de agregados

El cetuximab-IRDye 700DX se analizó con cromatografía de exclusión por tamaño, HPLC, para evaluar la pureza del monómero y la formación de agregados solubles. El porcentaje de formación de agregados solubles se midió en función de lux-horas de exposición de cetuximab-IRDye 700DX a la luz blanca, luz verde o sin luz.

Como se muestra en la figura 2A, la duración de la exposición de cetuximab-IRDye 700DX a luz blanca fluorescente de 500 lux tuvo un efecto directo en la formación de agregados solubles. La exposición de cetuximab-IRDye 700DX a luz blanca fluorescente dio como resultado un rápido aumento en la formación de agregados solubles con la presencia de una formación de agregados solubles superior al 5,0 % observada incluso después de solo 375 lux-horas (45 minutos a 500 lux) de exposición a luz blanca, que aumentó aún más con el aumento de la duración de la exposición a la luz blanca fluorescente. La exposición a la luz verde de cetuximab-IRDye 700DX también aumentó ligeramente la formación de agregados solubles, aunque a un ritmo mucho más lento que el de la luz blanca; el porcentaje de agregados formados incluso después de la exposición a 12.000 lux-horas (24 horas a 500 lux) de luz verde no fue más del 5,0 %. Los resultados mostraron que hubo una mayor formación de agregados solubles con cetuximab-IRDye 700DX con un aumento en el tiempo de exposición a la luz blanca que a la luz verde. Se observó menos del 1 % de formación de agregados solubles en muestras incubadas a 4 °C o 25 °C cuando se protegieron de cualquier exposición a la luz.

2. Destrucción con PIT

Para evaluar la actividad destructora de la PIT mediante el cetuximab-IRDye 700DX expuesto previamente a las diversas condiciones de luz, se incubaron células BxPC3 (n.º CRL-1687, ATCC, Manassas VA) durante una hora a 4 °C con o sin cetuximab-IRDye 700DX 1 µg/ml en medio RPMI-1640 complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % (medio de cultivo completo) y después se lavaron una vez con medio de cultivo completo para eliminar el cetuximab-IRDye 700DX no unido. A continuación, las células se iluminaron con un láser de 690 nm a una dosis de luz de 32 J/cm² o se protegieron de la luz (0 J/cm²).

El efecto de diferentes regímenes de tratamiento sobre la muerte celular se midió utilizando la tinción fluorescente, CellTox green (N.º de Cat: G8731, Promega, Madison, WI). CellTox green es un colorante fluorescente no permeable que presenta una mayor fluorescencia al unirse al ADN. Por lo tanto, solo las células que tienen membranas plasmáticas comprometidas presentan una fuerte tinción con CellTox green. Después del tratamiento con luz, todas las células se incubaron con reactivo CellTox green 1x diluido en RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % (medio de cultivo completo). Los pocillos que no incluían ninguna célula también se incubaron con reactivo CellTox green 1x diluido en medio de cultivo completo para servir como pocillos de efecto de fondo durante la detección de la señal fluorescente. La señal de fluorescencia de CellTox green se midió a las 24 horas después del tratamiento con luz utilizando un lector de placas de fluorescencia. A continuación, las células se lisaron con detergente, se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, y la señal de fluorescencia de CellTox green se midió de nuevo después de la lisis. El porcentaje de células muertas se calculó tomando la proporción entre la señal de CellTox green de efecto de fondo (CellTox green 1x en medio de cultivo completo sin células) por pocillo antes y después de la lisis y multiplicando la proporción por 100.

Como se muestra en la figura 2B, no se observó ningún efecto sobre la muerte celular para todas las muestras expuestas a 0 J/cm² durante el tratamiento de PIT, lo que indica que, a pesar del aumento de agregados solubles después de la exposición previa a luz blanca, los agregados solubles no eran citotóxicos en ausencia de irradiación de luz. En cambio, se observó destrucción celular para las muestras que posteriormente se irradiaron con un láser de 690 nm a una dosis de luz de 32 J/cm², aunque la extensión de la destrucción celular se redujo de manera sustancial por el cetuximab-IRDye 700DX expuesto a una mayor duración de la luz blanca. Como se muestra, el cetuximab-IRDye 700DX expuesto previamente a 3000 lux-horas (500 lux durante 6 horas) o más de luz blanca fluorescente mostró un efecto inferior al 90 % o inferior en la actividad de la PIT. Sin embargo, el cetuximab-IRDye 700DX expuesto a todas las dosis de lux-hora de luz verde evaluadas no produjo un efecto en la potencia de la PIT, lo que indica que la exposición previa a luz verde no tuvo un impacto sustancial en la actividad destructora activada por la luz.

El efecto de la formación de agregados en la actividad de la PIT se muestra en la figura 2C. Como se muestra, la potencia de la PIT (porcentaje de células muertas) para todos los regímenes de tratamiento con cetuximab-IRDye 700DX para evaluar la exposición a la luz blanca y la luz verde se representó como una función del porcentaje de agregado soluble medido para cada muestra respectiva. Los resultados mostraron que una formación de agregados solubles superior al 15 % con cetuximab-IRDye 700DX da como resultado una disminución significativa en la potencia de la PIT.

Ejemplo 10: Efecto de la conjugación indirecta con colorante de ftalocianina sobre la destrucción de la PIT y la especificidad de la PIT

Se realizaron los siguientes estudios para evaluar si los anticuerpos que se unen directamente a las moléculas de la superficie celular requieren conjugación directa con un fotosensibilizador de ftalocianina, tal como IRDye 700DX, para mediar en la actividad destructora de la PIT.

5

A. Conjugación de IRDye 700DX con anticuerpo secundario contra anticuerpo de direccionamiento celular

En lugar de conjugar directamente un anticuerpo de direccionamiento contra una molécula de la superficie celular (por ejemplo, en una célula cancerosa) con IRDye 700DX, se conjugó un anticuerpo secundario anti-IgG humana que se unía al anticuerpo de direccionamiento con IRDye 700DX. De manera específica, el anticuerpo específico de burro del fragmento Fcy anti-IgG humana (DxHu) AffiniPure, (Número de catálogo: 709-005-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West grove, PA) se marcó con IRDye 700DX para evaluar si el marcaje no covalente de anticuerpos primarios con anticuerpo secundario-IRDye 700DX podría utilizarse en la destrucción mediada por la PIT. El protocolo utilizado para conjugar el anticuerpo DxHu con IRDye 700DX fue de manera sustancial el mismo que el protocolo para la conjugación de anticuerpos utilizado en el ejemplo 8.

La destrucción por PIT de células BxPC3 se evaluó de forma similar al método descrito en el ejemplo 9, excepto que las células se incubaron primero durante una hora a 4 °C con o sin anticuerpo anti-EGFR, cetuximab (Myoderm USA, Norristown, PA) en medio RPMI-1640 complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomycin al 1 % (medio de cultivo completo). A continuación, las células se lavaron una vez con medio de cultivo completo, se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con o sin anticuerpo secundario conjugado con IRDye 700DX (DxHu IRDye 700DX) diluido con medio de cultivo completo y después se lavaron una vez con medio de cultivo completo. Como control, las células BxPC3 se incubaron con cetuximab-IRDye 700DX en el que el cetuximab se conjugó directamente con IRDye 700DX. Para inducir la destrucción celular, a continuación, las células se iluminaron con un láser de 690 nm a una dosis de luz de 16 J/cm.² o se protegieron de la luz ("sin luz"). La muerte celular se evaluó como se describe en el ejemplo 9 utilizando CellTox green.

Como se muestra en la figura 3, las células BxPC3 que se marcaron de manera secuencial con cetuximab y el anticuerpo secundario de burro antihumano-IRDye 700DX y se trataron con luz presentaron -90 % de muerte celular. El mismo tratamiento con el anticuerpo primario y secundario no dio como resultado la muerte celular cuando las células no se expusieron al tratamiento con luz de 690 nm. La iluminación con luz de las células tratadas solo con el anticuerpo secundario no condujo a la muerte celular porque el anticuerpo secundario DxHu-IRDye 700DX no se une directamente a las células en ausencia de incubación previa con un anticuerpo primario de origen humano dirigido a un antígeno de la superficie celular. El grado de destrucción celular inducida por la exposición secuencial a los anticuerpos fue incluso ligeramente mayor que en las células BxPC3 incubadas con cetuximab que se habían marcado directamente con IRDye 700DX. El tratamiento con luz de células BxPC3 tratadas solo con medio sin incubación con cetuximab o DxHu IRDye 700DX dio como resultado un nivel de muerte de células basales de -10 %, que fue similar a la muerte celular de fondo en células que no fueron irradiadas con luz (tratamiento sin luz). Por tanto, los resultados mostraron que los anticuerpos que se unen directamente a las células cancerosas no requieren la conjugación directa de un fotosensibilizador de ftalocianina, tal como IRDye 700DX, para mediar la actividad de destrucción de la PIT. El marcaje indirecto de anticuerpos anticancerosos mediado por un IRDye 700DX conjugado con un anticuerpo secundario también puede inducir una actividad destructora de la PIT eficaz.

B. Conjugación de IRDye 700DX de estreptavidina monomérica contra un anticuerpo de direccionamiento celular biotinilado

En otro estudio, se examinó la actividad destructora de la PIT de células incubadas de manera secuencial con un anticuerpo anti-EGFR biotinilado (cetuximab biotinilado)-IRDye 700DX conjugado con estreptavidina monomérica. Asimismo, también se examinó el efecto de la exposición previa de la estreptavidina monomérica-IRDye 700DX a la luz blanca sobre la actividad destructora de la PIT.

1. Conjugaciones

a. Conjugación de biotina con cetuximab

Para conjugar el anticuerpo anti-EGFR cetuximab con biotina, se concentró un volumen de 5 ml de anticuerpo anti-EGFR (cetuximab; Myoderm USA, Norristown, PA) suministrado a una concentración de 2 mg/ml en PBS pH 7,2 a un volumen de 2 ml (5 mg/ml) utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 30.000 dalton (N.º de cat: UFC903024, Merck-Millipore, Cork, IRL.) La solución se diluyó a 5 ml con Na₂HPO₄ 100 mM (pH 8,9) hasta un volumen final de 5 ml y un pH de ~8,5.

Se usó EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (sulfocussinimidil-6-[biotina-amido]hexanoato) para marcar el anticuerpo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (n.º de cat. 21327, ThermoScientific, Rockford, IL). De manera específica, una muestra de 2 mg de Sulfo-NHS-Biotina (SO₃-éster de NHS-biotina, n.º de cat: 1854200, Thermo Scientific) se descongeló a temperatura ambiente, a continuación, se disolvió con agua desionizada (DI) para lograr una concentración de 10 mg/ml. Un volumen de 130 µl de SO₃-biotina-éster de NHS solubilizado se añadió a la solución

de anticuerpo de cetuximab en una proporción molar de 20 (SO₃-biotina-éster de NHS) a 1 (anticuerpo de cetuximab). La reacción de conjugación se produjo a 25 °C durante 2 horas protegida de la luz, después de lo cual se añadió un exceso de glicina para detener la reacción durante 15 minutos. La solución de conjugado de cetuximab y biotina se intercambió después con diez veces el volumen de conjugación equivalente con PBS pH 7,2 utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 30.000 dalton para eliminar el colorante libre, la glicina y el glicina-IRDye 700DX, y ajustar el pH de nuevo a pH 7,2.

El conjugado de cetuximab y biotina se analizó con cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) para evaluar la pureza del cetuximab y biotina monomérica, el % de agregados solubles y los niveles de impurezas residuales del producto de reacción. La relación molar media de biotina a anticuerpo (BAR, del inglés "Biotin to Antibody Ratio") para el conjugado se determinó mediante el ensayo de cuantificación de biotina colorimétrica Pierce (N.º de cat.: 128005, Thermo Scientific, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Resultados del análisis de cetuximab y biotina		
Relación de biotina a anticuerpo (BAR)		7,2
Pureza mediante SE-HPLC	A210	99,1 % de monómero, 0,3 % de HMW, 0,6 de LMW
	A280	100 %

b. Conjugación de estreptavidina monomérica con IRDye 700DX

El protocolo general utilizado para conjugar la estreptavidina 2 monomérica genomanipulada (mSA2) (N.º de cat.: EBU001/2, Kerafast, Boston, MA) con IRDye 700DX fue de manera sustancial el mismo que el protocolo para la conjugación de anticuerpos descrito en el ejemplo 8, excepto que antes de la conjugación, la solución de mSA2 se intercambió primero con solución salina tamponada con fosfato pH 7 utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 3.000 dalton. Para la conjugación, a continuación, se añadió el éster de NHS IRDye 700DX solubilizado a la solución de mSA2 en una relación molar de 2 (éster de NHS IRDye 700DX) a 1 (estreptavidina monomérica). Después de la reacción de conjugación realizada de manera sustancial como se describe en el ejemplo 8, la solución de conjugado de estreptavidina monomérica se intercambió después con 24 ml de PBS pH 7 utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 10.000 dalton para eliminar el colorante libre, la glicina y el glicina-IRDye 700DX, y para ajustar el pH de nuevo a pH 7.

2. Destrucción con PIT

Se incubó previamente cetuximab biotinilado con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX en una relación molar de 20 (estreptavidina monomérica-IRDye 700DX) a 1 (1 µg/ml de cetuximab biotinilado) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron células BxPC3 con medio RPMI complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomycin al 1 % (medio de cultivo completo) que contenía 1 µg/ml de cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX o medio de cultivo completo solo durante una hora a 37 °C. A continuación, las células se lavaron una vez con medio de cultivo completo. Las células estaban protegidas de la luz (dosis de luz 0 J/cm²) o se iluminaron con un láser de 690 nm con diferentes dosimetrías de luz (2 J/cm², 8 J/cm², 32 J/cm² o 64 J/cm²). La muerte celular se evaluó como se describe en el ejemplo 9 utilizando CellTox green.

Como se muestra en la figura 4A, la actividad de destrucción de la PIT dependiente de la luz de las células BxPC3 con cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX (mSA IRDye 700DX) dependía de la dosis de luz. No se observó actividad destructora dependiente de la luz con células incubadas con medio de cultivo completo solo.

Para confirmar la especificidad del efecto, el efecto de cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX se evaluó en presencia de cetuximab no conjugado o estreptavidina monomérica no conjugada para evaluar si el efecto podía competir. En una condición, se incubaron previamente primero células BxPC3 con 100 µg/ml de cetuximab no conjugado o medio de cultivo completo solo durante una hora a 37 °C. A continuación, las células se lavaron una vez. A continuación, las células incubadas previamente con cetuximab no conjugado se incubaron con medio de cultivo completo que contenía 1 µg/ml de cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con 2 µg/ml de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX. En otra condición, las células que se habían incubado previamente con medio de cultivo completo solo (pero no incubado previamente con cetuximab no conjugado) se incubaron con 1 µg/ml de cetuximab biotinilado que había formado complejo previamente en presencia de un exceso de 10 veces de estreptavidina monomérica no conjugada (formación de complejo realizada con 20 µg/ml de estreptavidina monomérica no conjugada y 2 µg/ml de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX). Así mismo, las células que se habían incubado previamente con medio de cultivo celular (pero no incubado previamente con cetuximab no conjugado) se incubaron con 2 µg/ml de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX solo o con medio de cultivo completo solo durante una hora a 37 °C. A continuación, las células se lavaron una vez con medio de cultivo completo.

Los resultados mostrados en la figura 4B demuestran que la destrucción mediada por la PIT con cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX (mSA IRDye 700DX) era específica de las células que tenían unido cetuximab asociado con IRDye 700DX. No se observó destrucción mediante PIT dependiente de la luz cuando las células BxPC3 se expusieron previamente a 100 µg/ml de cetuximab no conjugado antes de la incubación con cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX. Los resultados también mostraron que la destrucción mediante PIT dependía de la asociación de la estreptavidina monomérica conjugada con IRDye 700DX y el anticuerpo biotinilado, ya que no se observó destrucción mediante PIT dependiente de la luz de las células BxPC3 incubadas con cetuximab biotinilado que formaba complejo con un exceso molar 10x de estreptavidina monomérica no conjugada sobre la estreptavidina monomérica-IRDye 700DX. Además, los resultados demostraron que no se observó destrucción mediante PIT dependiente de la luz de células BxPC3 en células incubadas con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX solo en ausencia de cetuximab biotinilado o en células BxPC3 incubadas en medio de cultivo solo.

3. Efectos de la exposición previa a la luz sobre la composición y la actividad

También se evaluó el efecto de la destrucción indirecta de células con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX que habían sido expuestas a diferentes tipos de luz. Se añadieron treinta microlitros de conjugado de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX (DAR 1.35) por frasco transparente de HPLC a una concentración de conjugado de estreptavidina monomérica de 865 µg/ml. Se probaron las siguientes condiciones: (1) el conjugado de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX se colocó en un tubo de vidrio transparente de HPLC envuelto en papel de aluminio para protegerlo de la exposición a la luz bajo una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas ("sin luz"; para controlar los efectos del calentamiento térmico); (2) el conjugado de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX se colocó en un tubo de vidrio transparente de HPLC bajo una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas ("luz blanca"); (3) el conjugado de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX se colocó en un tubo de vidrio transparente de HPLC y se expuso a una lámpara LED a 2500 lux durante 24 horas ("luz verde").

Se evaluó la destrucción celular inducida por estreptavidina monomérica-IRDye 700DX expuesto previamente en las diversas condiciones y que se había formado complejo con cetuximab biotinilado en células BxPC3 como se describió anteriormente. Por tanto, todos los tratamientos con células BxPC3 se incubaron con medio de cultivo completo o medio de cultivo completo que contenía cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX que se había sometido a una exposición previa a la luz de diferentes longitudes de onda de luz como se describió anteriormente.

Como se muestra en la figura 4C, los resultados revelaron que la exposición previa de estreptavidina monomérica-IRDye 700DX a la luz blanca inhibe el potencial de actividad destructora de la PIT. La destrucción dependiente de la luz esperada de las células BxPC3 se observó cuando las células se incubaron con cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX que se había protegido de la exposición a la luz con papel de aluminio. En cambio, no se observó destrucción mediante PIT dependiente de la luz de las células BxPC3 cuando las células se incubaron con cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica que se había expuesto a la luz blanca de una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas. Los resultados mostraron que la pérdida de destrucción mediante PIT tras la exposición a la luz se redujo cuando las células BxPC3 se incubaron con cetuximab biotinilado que formaba complejo previamente con estreptavidina monomérica-IRDye 700DX que se había expuesto a luz verde de una lámpara LED verde a 2500 lux durante 24 horas, aunque en este experimento hubo alguna disminución en la destrucción mediante PIT incluso cuando el conjugado de IRDye 700DX se expuso previamente a la luz verde. Sin destrucción mediante PIT dependiente de la luz de las células BxPC3 incubadas con medio de cultivo completo solo.

Ejemplo 11: Efecto del conjugado de anticuerpo anti-EpCAM-IRDye 700DX en la destrucción mediante PIT

Se realizó un estudio adicional más para evaluar el efecto sobre la destrucción celular de un anti-CD326 de ratón (EpCAM) (N.º de cat.: 118202, BioLegend, San Diego, CA) conjugado con un fotosensibilizador de ftalocianina tal como IRDye 700DX. El anticuerpo se dirige a otra molécula alternativa de la superficie celular, EpCAM. Para preparar el anti-EpCAM-IRDye 700DX, se realizó una conjugación como se describe en el ejemplo 8.

Para evaluar la actividad destructora de la PIT mediante el conjugado de anti-EpCAM-IRDye 700DX, se incubaron células 4T1 con medio RPMI complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % (medio de cultivo completo) que contenía concentraciones crecientes de anti-EpCAM-IRDye 700DX como se indica o medio de cultivo completo solo durante una hora a 37 °C. A continuación, las células se lavaron una vez con medio de cultivo completo. A continuación, las células se iluminaron con un láser de 690 nm a una dosimetría de luz de 0 o 32 J/cm². La muerte celular se evaluó como se describe en el ejemplo 9 utilizando CellTox green.

Como se muestra en la figura 5A, los resultados mostraron que las células 4T1 incubadas con anti-EpCAM-IRDye 700DX e iluminadas a 32 J/cm² se destruyeron de una manera dependiente de la dosis del anticuerpo. No se observó muerte celular significativa a ninguna concentración de anticuerpo sin iluminación con luz.

Para confirmar la especificidad de la destrucción celular, las células 4T1 se incubaron con un exceso molar de

anticuerpo anti-EpCAM no conjugado para bloquear la unión del conjugado de anti-EpCAM-IRDye 700DX a la superficie celular. De manera específica, 10, 1 o 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-EpCAM no conjugado o medio de cultivo completo solo durante una hora a 37 °C. Sin lavar las células, se añadió anti-EpCAM-IRDye 700DX a las células 4T1 para lograr una concentración final de 0,1 µg/ml y se incubaron durante una hora a 37 °C. La destrucción celular se indujo mediante iluminación con un láser de 690 nm a una dosis de luz de 32 J/cm² y la destrucción celular se determinó utilizando el CellTox green como se describe anteriormente.

Los resultados se muestran en la figura 5B, que muestra la especificidad de la actividad destructora de PIT con anti-EpCAM-IRDye 700DX. Los resultados mostraron que las células 4T1 que se incubaron previamente con anticuerpo anti-EpCAM no conjugado antes de la incubación con anti-EpCAM-IRDye 700DX mostraron una muerte celular significativamente menor después de la exposición a una iluminación láser de 32 J/cm² en comparación con las células 4T1 que no se sometieron a la etapa de bloqueo, lo que demuestra que la unión celular de anti-EpCAM y la conjugación con IRDye 700DX es necesaria para la destrucción basada en fotoinmunoterapia.

Ejemplo 12: Destrucción mediante PIT de células diana que expresan el receptor Fc con cetuximab-IRDye 700DX

Se realizaron los siguientes estudios para evaluar si el conjugado de fármaco de anticuerpo-IRDye 700DX puede unirse al receptor Fc (FcR) y si la activación con luz infrarroja cercana (~690 nm) da como resultado la destrucción de células FcR+. Los FcR se encuentran comúnmente en una amplia variedad de células inmunitarias tales como, monocitos, macrófagos y células supresoras procedentes de mieloides (MDSC, del inglés "myeloid derived suppressor cells"). Se ha descubierto que el papel de estas células en los tumores sólidos es perjudicial y favorece la formación de tumores. La línea celular monocítica humana THP1 expresa receptores Fc de superficie y se utilizó como sistema celular modelo para este ensayo.

Las células THP1 (ATCC, TIB-202) cultivadas en medio RPMI 1640 completo se sembraron en placas a 5000 células en un volumen total de 100 µl por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos para la adherencia durante la noche. Se comprobó la viabilidad de las células antes de la siembra mediante el método de exclusión con azul tripán y >95 % de las células eran viables. Las células se dividieron en tres grupos (todos por triplicado) de la siguiente manera: (1) células THP1 solamente (sin tratar); (2) células THP1 tratadas con el fármaco cetuximab-IRDye 700DX a 500 ng/ml; y (3) células THP1 primero incubadas con solución de bloqueo del receptor de Fc (N.º de cat.: 564220, BD, Franklin Lakes, NJ) a 1 µg/pocillo durante 20 min a temperatura ambiente seguido de tratamiento con el fármaco cetuximab-IRDye 700DX (500 ng/ml, 1 h a 37 °C en incubadora protegida de la luz).

Para inducir la destrucción, las células de cada grupo se sometieron a luz láser de 690 nm a una dosis de 32 J/cm². Los controles representaron pocillos correspondientes a los grupos descritos anteriormente pero no tratados con luz. La destrucción celular se evaluó utilizando CellTox green como se describe de manera sustancial en el ejemplo 9. Se añadió colorante CellTox green (1X) a los pocillos y las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una incubadora. El colorante también se añadió a un par de pocillos que contenían solo 100 µl del medio para la sustracción de fondo más tarde. Después de la incubación, la placa de cultivo de tejidos se leyó inmediatamente en un lector de placas. A continuación, las células se sometieron a lisis mediante la adición de 5 µl de solución de lisis diluida (Promega, n.º de cat. G1821), incluidos también los pocillos de control que contenían solo el medio. La dilución se realizó mediante la adición de medio de cultivo a la solución de lisis en la proporción 40 % (solución de lisis):60 % (medio de cultivo). A continuación, se volvió a leer la placa para obtener valores del 100 % de muerte celular. Para cada lectura, los dos pozos de fondo se promediaron y sus valores se restaron de todos los demás pozos. Para calcular el % de muerte celular para cada pocillo, el valor de fondo sustraído de la primera lectura se dividió por el valor de la segunda lectura (después de la lisis) y se multiplicó por 100.

Como se muestra en la figura 6, los resultados mostraron la destrucción específica del receptor Fc de las células THP1 por cetuximab-IRDye 700DX. Se observó una destrucción máxima en el grupo representado por células THP1 tratadas con fármaco sometidas a luz de 32 J/cm². Los valores porcentuales de destrucción son relativos a las células THP1 tratadas con luz y con fármaco. Por tanto, los resultados mostraron que la destrucción mediada por anticuerpos puede estar mediada por la unión específica a moléculas diana en la superficie celular, así como, en algunos casos, por la unión del anticuerpo al FcR.

Ejemplo 13: Evaluación de la actividad de destrucción celular y el efecto de la exposición a la luz blanca sobre la actividad de destrucción celular de conjugados de molécula sin anticuerpos-IRDye 700DX

Se realizaron los siguientes estudios para evaluar si las proteínas que no son anticuerpos, pequeñas proteínas y virus se pueden conjugar con un colorante de ftalocianina, tal como IRDye 700DX, para destruir células diana. Como se muestra a continuación, los resultados mostraron que varias otras moléculas que no son anticuerpos median la destrucción celular que depende de la activación con luz infrarroja cercana (por ejemplo, aproximadamente 690 nm de luz), la unión a las células y/o afectan la exposición previa del conjugado de macromolécula a la luz blanca.

A. Conjugado de proteína sin anticuerpos-IR700

El factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés "epidermal growth factor") recombinante humano (N.º de cat.: 01-401, EMD Millipore, Billerica, MA) se conjugó con IRDye 700DX y se evaluó para evaluar su actividad destructora y si la exposición previa a diferentes longitudes de onda de luz afectaba la formación de agregados solubles.

5 1. Conjugación del EGF

El protocolo utilizado para marcar el EGF recombinante humano con IRDye 700DX fue de manera sustancial el mismo que el protocolo para la conjugación de anticuerpos descrito en el ejemplo 8, excepto que antes de la conjugación, la solución de EGF se intercambió primero con solución salina tamponada con fosfato pH 7 utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 3.000 dalton. Para la conjugación, a continuación, se añadió el éster de NHS IR700 solubilizado a la solución de EGF en una relación molar de 4 (éster de NHS IR700) a 1 (EGF) o en una relación molar de 1,2 (éster de NHS IR700) a 1 (EGF). Después de la reacción de conjugación realizada como se describe en la parte A, la solución de conjugado de EGF se intercambió después con seis veces el volumen de conjugación equivalente con PBS pH 7 utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 3.000 dalton para eliminar el colorante libre, la glicina y el glicina-IRDye 700DX, y ajustar el pH de nuevo a pH 7.

2. Actividad destructora dependiente de la luz de EGF-IRDye 700DX

Para evaluar si se evaluó la destrucción celular de EGF-IRDye 700DX en células A431. Se sembraron células A431 a 5000 células por pocillo en placas de fondo blanco transparente de 96 pocillos un día antes del experimento. El día siguiente, las células A431 se lavaron tres veces con EMEM complementado con penicilina/estreptomicina al 1 % (medio sin suero). A continuación, las células A431 se lavaron una vez con medio sin suero, después se incubaron con medio sin suero que contenía 1 µg/ml de EGF-IRDye 700DX durante una hora a 4 °C o solo con medio sin suero. Como control para evaluar la especificidad de la actividad, en una condición, las células A431 se incubaron previamente con 100 µg/ml de cetuximab no conjugado diluido en medio sin suero durante una hora a 4 °C antes de la incubación con 1 µg/ml de EGF-IRDye 700DX. A continuación, las células se lavaron una vez con medio sin suero.

Para inducir la destrucción dependiente de IR700, a continuación, las células se iluminaron con un láser de 690 nm con 32 J/cm² de luz o protegidas de la luz ("sin luz"). La muerte celular se evaluó como se describe en el ejemplo 9 utilizando CellTox green. El porcentaje normalizado de células muertas se calculó restando a todos los pocillos el porcentaje de células muertas del control de solo medio sin suero y sin luz, dividido por EGF-IRDye 700DX a 32 J/cm² menos el control de medio sin suero y sin luz y multiplicado por 100.

Como se muestra en la figura 7 A, los resultados mostraron que la destrucción celular mediada por EGF-IRDye 700DX es una destrucción dependiente de la luz, observándose la destrucción solo cuando las células se trataron con luz para activar la actividad de destrucción celular. La exposición previa de células A431 con 100 µg/ml de cetuximab no conjugado antes de la incubación con 1 µg/ml de EGF-IRDye 700DX bloqueó la destrucción celular dependiente de la luz. Las células A431 incubadas con medio solo no presentaron ninguna destrucción inducida por la luz.

40 3. Efectos de la exposición previa a la luz sobre la actividad fotoactivada

También se evaluó en células A431 el efecto de la exposición previa de EGF-IRDye 700DX a la luz blanca frente a la luz verde sobre la destrucción de células fotoactivadas. Se expuso previamente EGF-IRDye 700DX a diferentes tipos de luz y se evaluó el efecto del tratamiento con luz sobre la actividad destructora fotoactivada. Se añadieron cinco microlitros de conjugado de EGF-IRDye 700DX (DAR 2) por frasco transparente de HPLC a una concentración de EGF-IRDye 700DX de 1,14 mg/ml. Se probaron las siguientes condiciones: (1) el conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX almacenado a 4 °C protegido de la luz ("4 °C", utilizado como control); (2) conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX colocado en un tubo de vidrio transparente de HPLC bajo una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 h ("luz blanca"); (3) conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX colocado en un tubo de vidrio transparente de HPLC envuelto en papel de aluminio para protegerlo de la exposición a la luz bajo una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 h ("sin luz", utilizado como control de los efectos del calentamiento térmico en la formación de agregados); y (4) conjugado de anticuerpo-IRDye 700DX colocado en un tubo de vidrio transparente de HPLC y expuesto a una lámpara LED verde a 2500 lux durante 24 h ("luz verde").

Para evaluar la actividad de destrucción celular, las células A431 se lavaron dos veces con medio sin suero y se incubaron en medio sin suero solo durante una hora a 4 °C. A continuación, las células se lavaron una vez con medio sin suero y se incubaron con medio sin suero solo o medio sin suero que contenía 1 µg/ml de EGF-IRDye 700DX ("sin luz"), medio sin suero que contenía 1 µg/ml de EGF-IRDye 700DX expuesto previamente a luz blanca ("luz blanca de 2500 lux") o medio sin suero que contenía 1 µg/ml de EGF-IRDye 700DX expuesto previamente a luz verde durante una hora a 4 °C ("luz verde de 2500 lux"). A continuación, las células se lavaron una vez con medio sin suero.

Para inducir la destrucción celular, las células se protegieron de la luz (dosis de luz 0 J/cm²) o se iluminaron con un láser de 690 nm con diferentes dosimetrías de luz (8 J/cm², 32 J/cm² o 64 J/cm²).

Como se muestra en la figura 7B, la actividad destructora dependiente de la luz de EGF-IRDye 700DX fue sensible a la exposición previa a la luz blanca. Las células A431 incubadas con EGF-IRDye 700DX que se habían protegido de

la exposición a la luz pero sin calentamiento térmico bajo luz blanca de una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas presentaron muerte dependiente de la luz. Las células A431 incubadas con EGF-IRDye 700DX que se habían expuesto a la luz blanca de una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas ya no presentaban actividad destructora dependiente de la luz. Las células A431 incubadas con EGF-IRDye 700DX que se habían expuesto a la luz verde de una lámpara LED verde a 2500 lux durante 24 horas presentaron una actividad destructora dependiente de la luz comparable a la del EGF-IRDye 700DX "sin luz". Las células A431 incubadas con medio sin suero solo no presentaron actividad destructora dependiente de la luz.

B. Conjugado de toxina B del cólera-IR700

Para evaluar si la destrucción celular puede estar mediada por una molécula que se une a moléculas no proteicas, la toxina B del cólera (N.º de cat.: C9903-2MG, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) se conjugó con IRDye 700DX y se evaluó para evaluar su actividad destructora tras la exposición previa a diferentes longitudes de onda de luz. La toxina B del cólera se une específicamente al glucolípido, GM1, que es una fracción de macromolécula de superficie no proteica.

1. Conjugación de la toxina B del cólera

El protocolo utilizado para el marcaje de la toxina B del cólera con IRDye 700DX fue de manera sustancial el mismo que el protocolo para la conjugación de anticuerpos descrito en el ejemplo 8, excepto que antes de la conjugación, la solución de toxina B del cólera se intercambió primero con solución salina tamponada con fosfato pH 7 utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 3.000 dalton. Para la conjugación, a continuación, se añadió el éster de NHS IR700 solubilizado a la solución de toxina B del cólera en una relación molar de 2 (éster de NHS IR700) a 1 (toxina B del cólera). Después de la reacción de conjugación, que se realizó de manera sustancial como se describe en el ejemplo 8, la solución del conjugado de toxina B del cólera se intercambió después con 24 ml de PBS pH 7 utilizando un filtro con límite de peso molecular de 10.000 dalton para eliminar el colorante libre, la glicina y el glicina-IR700, y ajustar el pH de nuevo a pH 7.

2. Actividad destructora de la toxina B del cólera-IR700

Se evaluó la destrucción de células fotoactivadas utilizando toxina B del cólera-IR700 en células BxPC3. Las células BxPC3 se lavaron tres veces con medio RPMI complementado con penicilina/estreptomicina al 1 % (medio sin suero), después se incubaron solo con medio sin suero o medio sin suero que contenía 2 µg/ml de toxina B del cólera-IRDye 700DX (DAR ~2,9 por pentámero) durante una hora a 4 °C. A continuación, las células se lavaron dos veces con medio sin suero.

Para inducir la destrucción dependiente de IR700, las células se protegieron de la luz (dosis de luz 0 J/cm²) o se iluminaron con un láser de 690 nm con diferentes dosimetrías de luz (2 J/cm², 8 J/cm² o 32 J/cm² o 96 J/cm²). La muerte celular se evaluó como se describe en el ejemplo 9 utilizando el reactivo CellTox. El porcentaje normalizado de células muertas se calculó restando todos los pocillos el porcentaje de células muertas del control de solo medio de cultivo completo sin luz, dividido por la toxina B del cólera-IRDye 700DX a 96 J/cm² menos medios de cultivo completos sin luz y multiplicado por 100.

Como se muestra en la figura 8 A, el efecto de la dosis de luz sobre la destrucción dependiente de la luz de las células BxPC3 fue dependiente de la dosis, como lo demuestra un aumento en el porcentaje normalizado de células BxPC3 muertas que se habían incubado con 2 µg/ml de toxina B del cólera-IRDye 700DX durante 1 hora a 4 °C seguido de irradiación en presencia de una dosis creciente de luz. No se observó destrucción dependiente de la dosis de luz de células BxPC3 tratadas solo con medio de cultivo completo.

Para evaluar la especificidad de la actividad destructora de células fotoactivadas, las células BxPC3 se lavaron tres veces con medio sin suero, después se incubaron con medio de cultivo completo solo o con medio de cultivo completo que contenía 100 µg/ml de toxina B del cólera no conjugada durante una hora a 4 °C. A continuación, las células se lavaron una vez con medio sin suero y se incubaron durante una hora a 4 °C con medio sin suero solo, medio sin suero que contenía 2 µg/ml de toxina B del cólera-IRDye 700DX o 100 µg/ml de toxina B del cólera no conjugada con 2 µg/ml de toxina B del cólera-IRDye 700DX. A continuación, las células se lavaron dos veces con medio sin suero. Para inducir la destrucción dependiente de IR700, las células se protegieron de la luz (dosis de luz 0 J/cm²) o se iluminaron con un láser de 690 nm con 96 J/cm² y la muerte celular se evaluó como se describió anteriormente.

Como se muestra en la figura 8B, los resultados mostraron que la incubación previa de células BxPC3 con un exceso de 100 veces la toxina B del cólera no conjugada bloqueó la destrucción dependiente de la luz de la toxina B del cólera-IRDye 700DX en las células BxPC3, lo que indica que la actividad destructora depende de la unión de la toxina B del cólera a las células.

3. Efectos de la exposición previa a la luz sobre la actividad de destrucción celular

Se evaluó el efecto de la exposición previa de toxina B del cólera-IRDye 700DX a la luz blanca frente a la luz verde sobre la actividad destructora fotoactivada. Se añadieron diez microlitros de conjugado de toxina B del cólera-IRDye

700DX (DAR 2.9) por frasco transparente de HPLC a una concentración de toxina B del cólera-IRDye 700DX de 1 mg/ml. Se probaron las siguientes condiciones: (1) el conjugado de toxina B del cólera-IRDye 700DX colocado en un tubo de vidrio transparente de HPLC envuelto en papel de aluminio para protegerlo de la exposición a la luz bajo una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas ("sin luz", utilizado como control de los efectos del calentamiento térmico en la formación de agregados); (2) el conjugado de toxina B del cólera-IRDye 700DX se colocó en un tubo de vidrio transparente de HPLC bajo una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 h ("luz blanca"); o (3) el conjugado de toxina B del cólera-IRDye 700DX se colocó en un tubo de vidrio transparente de HPLC y se expuso a una lámpara LED verde a 2500 lux durante 24 h ("luz verde").

La destrucción celular inducida por la toxina B del cólera-IRDye 700DX expuesta previamente en las diversas condiciones se evaluó en células BxPC3 como se describió anteriormente. Por tanto, todos los tratamientos con células BxPC3 se incubaron con medio sin suero solo o con medio sin suero que contenía toxina B del cólera-IRDye 700DX que se había sometido a una exposición previa a la luz de diferentes longitudes de onda de luz como se describió anteriormente.

Como se muestra en la figura 8C, la actividad destructora dependiente de la luz mediada por toxina B del cólera-IRDye 700DX fue sensible a la exposición previa a la luz blanca. Las células BxPC3 incubadas con toxina B del cólera-IRDye 700DX que se habían protegido de la exposición a la luz pero sin calentamiento térmico bajo luz blanca de una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas presentaron una destrucción dependiente de la luz. Las células BxPC3 incubadas con toxina B del cólera-IRDye 700DX que se habían expuesto a la luz blanca de una lámpara halógena a 2500 lux durante 24 horas ya no presentaban actividad letal dependiente de la luz. Las células BxPC3 incubadas con toxina B del cólera-IRDye 700DX que se habían expuesto a la luz verde de una lámpara LED verde a 2500 lux durante 24 horas presentaron una ligera disminución en la actividad destructora dependiente de la luz, pero, de manera sustancial, menor que la de las células tratadas con toxina B del cólera-IRDye 700DX expuestas a la luz blanca. Las células BxPC3 incubadas con medio sin suero solo no presentaron actividad destructora dependiente de la luz.

C. Virus de la gripe-IR700

Se realizaron los siguientes estudios para evaluar si las partículas víricas se pueden conjugar con colorantes de ftalocianina tal como IRDye 700DX para la destrucción de células fotoactivadas. También se evaluó el efecto de la exposición previa a la luz blanca sobre la destrucción del conjugado de virus-IR700 fotoactivado.

1. Conjugación del virus de la gripe (X-31)

Alícuotas sólidas congeladas de éster de NHS IRDye 700DX (N.º de Cat. 929-70011; Li-COR, Lincoln, NE) se descongelaron a temperatura ambiente, a continuación se disolvieron con DMSO para lograr una concentración de 10 mg/ml. En un entorno oscuro, se añadieron 10 µg de éster de NHS IRDye 700DX a 65.536 unidades de HA de la reserva de gripe AX-31 A/Aichi/68 (H3N2) (N.º de cat.: 10100375, Charles River Laboratories, Wilmington, MA), y se colocó en la posición más baja posible en un vórtex de mesa durante 2 horas a 25 °C. Se utilizó una columna de flujo por gravedad para separar el conjugado de virus del colorante libre cargando 100 µl de solución de virus en una columna de flujo por gravedad Nap 5 equilibrada previamente con solución salina tamponada con fosfato (N.º de cat.: 17-0853-02, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburg, PA). Después de añadir 650 µl de solución salina tamponada con fosfato, se descartó el flujo continuo. Se cargaron 400 µl adicionales de solución salina tamponada con fosfato en la columna y se recogió el flujo continuo, que contenía el virus conjugado. Antes de utilizar el virus para experimentos, la solución de conjugado de virus se filtró con un filtro de PVDF de tamaño de poro de 0,2 µm para eliminar cualquier agregado insoluble.

2. Actividad destructora con virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX

Se incubaron células Vero con el virus de la gripe (X-31)-IR700 para evaluar si las células asociadas con el virus de la gripe (X-31)-IR700 eran susceptibles de ser destruidas después de la irradiación de luz. Las células Vero se lavaron cuatro veces con medio EMEM complementado con penicilina/estreptomicina al 1 % (medio sin suero). El medio de inoculación del virus se preparó mediante la mezcla de 1200 µl de flujo continuo de medio sin suero con 400 µl de virus de la gripe purificado (X-31)-IRDye 700DX (preparado como se describió anteriormente), que luego se filtró con un filtro de PVDF de tamaño de poro de 0,2 µm para eliminar cualquier agregado. Se añadieron a las células 100 µl de medio de inoculación de virus o 100 µl de medio de cultivo sin suero y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. A continuación, las células se lavaron una vez con 100 µl de medio sin suero.

A continuación, las células asociadas al virus o las células Vero de control se protegieron de la luz (dosis de luz 0 J/cm²) o se iluminaron con un láser de 690 nm con diferentes dosimetrías de luz (2 J/cm², 8 J/cm², 32 J/cm² o 96 J/cm²). La muerte celular se evaluó como se describe en el ejemplo 9 utilizando CellTox green.

Como se muestra en la figura 9 A, Las células Vero que se inocularon con virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX se destruyeron de una manera dependiente de la dosis de luz. Las células Vero incubadas en medio de cultivo completo sin virus no presentaron destrucción dependiente de la luz.

3. Efectos de la exposición previa a la luz sobre la actividad del conjugado

El virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX se probó para determinar el efecto de la exposición previa a la luz sobre la actividad destructora fotoactivada dependiente de la luz en tres condiciones diferentes de exposición a la luz, que incluye las diferentes longitudes de onda de la luz blanca frente a la luz verde. Se añadieron aproximadamente 130 µl de flujo continuo de virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX por frasco transparente de HPLC y se analizaron después de la exposición a las siguientes condiciones: (1) el conjugado de virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX se colocó en un tubo de vidrio transparente de HPLC envuelto en papel de aluminio para protegerlo de la exposición a la luz bajo una lámpara halógena (N.º de cat.: PL-800, Dolan-Jenner, Boxborough, MA) a 2500 lux durante 18 h ("sin luz", para controlar los efectos del calentamiento térmico); (2) el conjugado de virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX se colocó en un tubo de vidrio transparente de HPLC bajo una lámpara halógena a 2500 lux durante 18 h ("luz blanca"); (3) el conjugado de virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX se colocó en un tubo de vidrio transparente de HPLC y se expuso a una lámpara LED verde (N.º de cat.: Green-ECS GP19 EcoSmart) a 2500 lux durante 18 h ("luz verde").

La destrucción celular inducida por la inoculación de células Vero con virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX expuesto previamente en las diversas condiciones se evaluó como se describe anteriormente después de la iluminación con un láser de 690 nm con una dosis de luz de 96 J/cm². Por tanto, todos los tratamientos con células Vero se incubaron con medio sin suero solo o medio sin suero que contenía virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX que se había sometido a una exposición previa a luz de diferentes longitudes de onda de luz.

Como se muestra en la figura 9B, la actividad destructora dependiente de la luz mediada por el virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX es sensible a la exposición previa a la luz blanca. Las células Vero incubadas con el virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX que se habían protegido de la exposición a la luz con papel de aluminio ("sin luz") presentaron una destrucción dependiente de la luz. Sin embargo, el grado de destrucción celular disminuyó en las células Vero incubadas con el virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX que se habían expuesto a la luz blanca de una lámpara halógena a 2500 lux durante 18 horas en comparación con las células tratadas con el virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX "sin luz" que se había protegido de la luz. En cambio, la incubación de células Vero con el virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX que se habían expuesto a la luz verde de una lámpara LED verde a 2500 lux durante 18 horas presentó la misma actividad destructora fotoactivada que la de virus de la gripe (X-31)-IRDye 700DX "sin luz" que se había protegido de la luz. Las células Vero incubadas con medio sin suero solo no presentaron actividad destructora dependiente de la luz.

Ejemplo 14: Evaluación de la actividad de destrucción celular de conjugados de molécula adicional-IRDye 700DX

Se realizaron estudios para evaluar la actividad de destrucción celular de conjugados adicionales de IRDye 700DX sin anticuerpos que pueden unirse a moléculas de superficie que no son proteínas. En un estudio adicional ilustrativo, el efecto de la lectina de saúco (SNA, del inglés "Sambucus Nigra Lectin"; también llamada lectina de baya del saúco, EBL) (N.º de cat.: L-1300, Vector Labs, Burlingame, CA) conjugada con IRDye 700DX se evaluó para evaluar su actividad destructora. La SNA se une de manera específica a los ácidos siálicos unidos a α(2,6) en las glucoproteínas de las células. También se evaluó la agregación inducida por luz del SNA-IRDye 700DX mediante cromatografía de exclusión por tamaño, pero en este experimento ilustrativo no hubo efecto sobre la cromatografía de exclusión por tamaño del conjugado de SNA-IRDye 700DX expuesto a luz blanca frente a luz verde.

1. Conjugación de la lectina de baya de saúco (SNA)

El protocolo utilizado para marcar la SNA con IRDye 700DX es de manera sustancial el mismo que el protocolo para la conjugación de anticuerpos descrito en el ejemplo 8.

2. Actividad destructora dependiente de la luz de SNA-IRDye 700DX

Para evaluar si el SNA-IRDye 700DX pudo provocar la destrucción celular después de la irradiación de luz, se evaluó la destrucción celular en células BxPC3. Se disociaron células BxPC3 de la placa de cultivo celular y el medio de cultivo celular que contenía medio RPMI complementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % (medio de cultivo completo) se intercambió por medio RPMI complementado con BSA al 1 % y penicilina/estreptomicina al 1 % (medio de unión). Las células BxPC3 se transfirieron a tubos separados que contenían solo medio de unión o medio de unión que contenía 10 µg/ml de SNA-IRDye 700DX en una relación de colorante-anticuerpo (DAR) de ~2,5 y se incubaron durante una hora a 4 °C. A continuación, las células se transfirieron a placas recubiertas previamente con 200 µg/ml de SNA no conjugado (tratamiento de recubrimiento de 1 hora a 37 °C y se lavaron 3 veces con medio sin suero) para bloquear la unión no específica de SNA-IRDye 700DX a las placas.

Para inducir la destrucción dependiente de IRDye 700DX, las células se protegieron de la luz (dosis de luz 0 J/cm²) o se iluminaron con un láser de 690 nm con diferentes dosimetrías de luz (8 J/cm², 32 J/cm² o 96 J/cm²). La muerte celular se evaluó como se describe en el ejemplo 9 utilizando CellTox green.

Como se muestra en la figura 10 A, Las células BxPC3 incubadas con SNA-IRDye 700DX presentaron una destrucción dependiente de la luz. Las células BxPC3 tratadas con medio de cultivo completo en ausencia de un conjugado de

IR700 no presentaron una destrucción dependiente de la luz.

Para evaluar la especificidad de la destrucción celular, las células BxPC3 se trataron con sialidasa A, que escinde los ácidos siálicos con enlaces $\alpha(2,6)$, el receptor de SNA. Las células BxPC3 se disociaron del matraz de cultivo de tejidos y se fijaron con formalina al 10 % durante 20 minutos. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se trataron con un tampón de reacción 1x solo (diluido de un tampón de reacción glucosialidasa A-51 5x, número de catálogo GK80045, Prozyme), tampón de reacción 1x que contiene 0,025 U de sialidasa A o tampón de reacción 1x que contiene 0,075 U de sialidasa A durante 2 horas a 37 °C. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS y después se incubaron con PBS solo o PBS que contenía 10 $\mu\text{g/ml}$ de SNA-IRDye 700DX durante 1 hora a 4 °C.

Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS, se tiñeron con tinción nuclear DAPI y después sembraron en placas de 96 pocillos y se tomaron imágenes en un microscopio fluorescente de epi-iluminación. Se eligieron al menos 10 regiones y se tomaron imágenes para detectar la tinción nuclear DAPI y la señal fluorescente de SNA-IRDye 700DX. Para comparar la intensidad fluorescente de los grupos probados, la resta de fondo se realizó mediante la resta de la intensidad mínima de píxeles de una imagen dada de todos los demás píxeles de la misma imagen. La señal nuclear DAPI se definió como umbral y se utilizó como área representativa para cada célula. La imagen DAPI segmentada se utilizó después para determinar el área de cada célula individual a cuantificar para la intensidad de fluorescencia promedio en el canal utilizado para obtener la imagen de SNA-IRDye 700DX. Debido a que la tinción de SNA-IRDye 700DX es una tinción de membrana que es difusa y debido a que se utilizó un microscopio de epi-iluminación, la señal fluorescente media medida de la región enmascarada definida por la tinción nuclear DAPI podría utilizarse como una intensidad fluorescente media representativa para la tinción de SNA-IRDye 700DX por célula. La intensidad de fluorescencia media se recogió para cientos de células por condición de tratamiento y se representó en un diagrama de caja y bigotes.

Los resultados de la intensidad fluorescente de los grupos probados después del tratamiento de las células con sialidasa A se muestran en la figura 10B. Los resultados mostraron que un aumento dependiente de la dosis en el tratamiento con sialidasa A dio como resultado una disminución simultánea en la tinción de SNA-IRDye 700DX en la muestra. El aumento dependiente de la dosis del tratamiento con sialidasa A no produjo ningún cambio en la fluorescencia del canal utilizado para detectar el SNA-IRDye 700DX cuando las células BxPC3 no se tiñeron con SNA-IRDye 700DX.

Ejemplo 15: Destrucción de patógenos bacterianos mediante PIT mediada por el conjugado de IR700

Se realizaron los siguientes estudios para evaluar si los anticuerpos conjugados directamente con un fotosensibilizador de ftalocianina, tal como IRDye 700DX, pueden destruir células bacterianas mediante la unión a proteínas que se muestran en su superficie celular. La proteína A es una proteína que se muestra en la superficie celular de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) que se une a la región Fc de los anticuerpos.

En estos estudios, se utilizó cetuximab-IR700, de manera sustancial, como se describe en el ejemplo 1. *S. aureus* se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC) ID 6538. Se cultivó *S. aureus* en placas de agar Brain Heart Infusion (BHI) para la selección y recuento de colonias, o en caldo BHI (medio de cultivo completo) para la expansión de la población.

Para evaluar la destrucción mediante PIT inducida por células bacterianas, se incubó *S. aureus* con 100 $\mu\text{g/ml}$ de cetuximab-IRDye 700DX durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se iluminaron con un láser de 690 nm a 0 o 300 J/cm^2 . El número de células bacterianas viables restantes se determinó mediante el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar BHI en las siguientes condiciones. Como control, el número de células bacterianas viables también se evaluó en células tratadas con incubación con cetuximab-IRDye 700DX solo pero sin iluminación láser, iluminación láser sola o sin tratar. El porcentaje de UFC viable se normalizó a células bacterianas sin tratamiento.

Los resultados se muestran en la figura 11, que muestra que la destrucción celular de *S. aureus* mediada por PIT puede ocurrir en presencia de un conjugado de anticuerpo-IR700 que se une a la proteína A. Solo las células bacterianas que se incubaron con cetuximab-IRDye 700DX con iluminación láser posterior tuvieron una reducción estadísticamente significativa de las UFC en comparación con los otros tres grupos.

Ejemplo 16: Destrucción de patógenos víricos mediante PIT mediada por el conjugado de IR700

Se realizaron los siguientes estudios para evaluar si la infectividad del virus se puede inhibir mediante PIT en partículas víricas con anticuerpos anti-virus marcados con ftalocianina. Se realizó un estudio ilustrativo utilizando el virus de la gripe como un ejemplo específico en el que se realizó un tratamiento indirecto con PIT contra partículas del virus de la gripe recubiertas con anticuerpos de ratón antiviral de la gripe A (H3N2) y anticuerpos de cabra anti-Fab de ratón-IRDye 700DX. Debido a que el marcaje indirecto de anticuerpos primarios no conjugados con conjugados de anticuerpo secundario-IRDye 700DX puede inducir la destrucción mediante PIT de manera similar a la de los anticuerpos primarios conjugados directos, los hallazgos pueden generalizarse a anticuerpos anti-virus-IRDye 700DX directamente conjugados. Por tanto, estos resultados demuestran que el tratamiento con PIT puede conducir a la

inhibición de la infección vírica.

Se conjugó el fragmento Fab del anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón específico (GtxMs Fab) AffiniPure (Número de catálogo: 115-007-185, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West grove, PA) con IR700 de manera sustancial como se describe en el ejemplo 8, excepto que la solución de anticuerpo GtxMs Fab se intercambiò primero con solución salina tamponada con fosfato pH 7 utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 10.000 dalton, a continuación, el pH de la solución de anticuerpo se ajustó a un pH de 8,5 con la adición de tampón fosfato a pH = 9. Alícuotas sólidas congeladas de éster de NHS IRDye 700DX (N.º de Cat. 929-70011; Li-COR, Lincoln, NE) se descongelaron a temperatura ambiente, a continuación se disolvieron con DMSO para lograr una concentración de 10 mg/ml. En un entorno oscuro, a continuación, se añadió el éster de NHS IR700 solubilizado a la solución de anticuerpo en una relación molar de 2 (éster de NHS IR700) a 1 (anticuerpo). La reacción de conjugación se desarrolló a 25 °C durante 2 horas protegida de la luz. Se añadió glicina (pH 8,2) hasta una concentración final de 10 mM durante 15 minutos para desactivar la reacción. La solución de conjugado de anticuerpo se intercambiò después con 24 ml de PBS pH 7 utilizando un filtro centrífugo con límite de peso molecular de 10.000 dalton para eliminar el colorante libre, la glicina y el glicina-IR700, y ajustar el pH de nuevo a pH 7.

Para la PIT, el virus de la gripe A se asoció de manera indirecta con el IR700 mediante la mezcla de 1 µg de anticuerpo de ratón antiviral de la gripe A humano (H3N2) (F49) (N.º de catálogo: M146, TaKaRa, Katsushika Tokio, Japón) y 1 µg de GtxMs Fab-IRDye 700DX durante 5 minutos a 25 °C en oscuridad, seguido de una incubación de 30 minutos con 16.384 unidades de HA de la reserva de gripe AX-31 A/Aichi/68 (H3N2) (N.º de cat.: 10100375, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) durante 30 minutos a 25 °C en oscuridad. Se añadieron aproximadamente 875 µl de EMEM complementado con penicilina/estreptomicina al 1 % (medio sin suero) y el virus incubado se filtró con un filtro de PVDF de tamaño de poro de 0,2 µm para eliminar cualquier agregado insoluble (medio de inoculación de virus). La incubación se realizó por duplicado. Para una de las muestras duplicadas, la solución de anticuerpo-virus se expuso a 144 J/cm² de luz de 690 nm, mientras que la otra muestra se protegió de la luz.

Se evaluó la infectividad de los virus tratados con PIT con células Vero. Veinte horas antes de marcar el virus de la gripe (X-31) con el anticuerpo de ratón antiviral de la gripe A (H3N2) y el GtxMs Fab-IRDye 700DX, se colocaron en placas 125.000 células Vero en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, después de sembrar las células y después de marcar el virus de la gripe (X31) con el anticuerpo de ratón antiviral de la gripe (H3N2) y con GtxMs Fab-IRDye 700DX, las células se lavaron cuatro veces con medio sin suero. A continuación, las células se incubaron con 100 µl de medio de inoculación de virus tratado con luz, medio de inoculación de virus tratado sin luz o medio sin suero durante 1 hora a 37 °C. A continuación, el medio se reemplazó con EMEM complementado con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,3 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. Después de 14 horas después de la inoculación del virus, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en EMEM complementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % y se colocaron en tubos Eppendorf. A continuación, las células se fijaron con formalina al 10 % durante 20 minutos y posteriormente se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7). Para cada etapa de lavado, las placas se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió con 1 ml de PBS.

A continuación, las células se incubaron durante 30 minutos a 25 °C con "tampón de bloqueo" que contenía PBS complementado con albúmina de suero bovino al 3 % (sin IgG, sin proteasa) (N.º de catálogo: 001-000-162, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Wilmington, MA) y saponina al 0,08 %. A continuación, las células se incubaron durante 1 hora y 10 minutos a 25 °C con anticuerpo de ratón antinucleoproteína del virus de la gripe A (IgG2a) [AA5H] (número de catálogo: ab20343, Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluido 1:2000 en tampón de bloqueo. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con tampón de bloqueo haciendo girar las células a 1500 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular con 100 µl de tampón de bloqueo y se incubaron las células durante al menos 5 minutos a 25 °C antes del siguiente lavado. Después de lavar el anticuerpo primario, las células se incubaron durante 30 minutos a 25 °C con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón del Fcy subclase 2a AffiniPure conjugado con AlexaFluor 488 (N.º de catálogo: 115-545-206, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Wilmington, MA) diluido 1:250 en tampón de bloqueo. A continuación, las células se lavaron 3 veces con 100 µl por lavado de tampón de bloqueo con al menos 5 minutos por etapa de lavado, seguido de 3 lavados adicionales con PBS. A continuación, las células se colocaron en una placa de 96 pocillos y se obtuvieron imágenes con un microscopio fluorescente (Evos, Life Technologies). Se eligieron de manera aleatoria al menos 12 regiones aleatorias de interés para obtener la imagen de campo claro y la imagen fluorescente correspondiente tomada con el cubo de excitación y emisión de GFP. La imagen de campo claro se utilizó para obtener el número total de células y la imagen fluorescente se utilizó para detectar la presencia de expresión de nucleoproteínas, una lectura de que la célula estaba infectada con el virus de la gripe.

Se evaluó el efecto de la exposición de partículas del virus de la gripe recubiertas con anticuerpo anti-HA y anticuerpo de cabra antiviral IRDye 700DX (GtxMs Fab-IRDye 700DX) a luz de 690 nm sobre la infectividad del virus. Los resultados de la figura 12 muestran que la PIT en partículas del virus de la gripe que utilizan el anticuerpo de ratón antiviral de la gripe (H3N2) que forma complejo previamente con GtxMs Fab-IRDye 700DX anula la infección por el virus de la gripe. Las células Vero incubadas con virus recubiertas con anticuerpo de ratón antiviral de la gripe (H3N2) que forma complejo previamente y GtxMs Fab-IRDye 700DX que no se expusieron a luz de 690 nm dieron como resultado una fuerte infección vírica, con aproximadamente un 97,4 % de las células Vero que se tiñen para la

expresión de nucleoproteínas del virus de la gripe. En marcado contraste, las células Vero incubadas con virus tratado con PIT recubierto con anticuerpo de ratón antiviral de la gripe (H3N2) y GtxMs Fab-IRDye 700DX mostraron una disminución significativa en la infección vírica, con solo el 1,8 % de las células teñidas para la expresión de nucleoproteínas del virus de la gripe.

Ejemplo 17: Destrucción mediante PIT mediada por el conjugado de IR700 de células infectadas por patógenos

Se realizaron los siguientes estudios para evaluar si las células infectadas por virus se pueden tratar de manera selectiva con PIT con anticuerpos antivirales marcados con colorantes de ftalocianina (tal como IRDye 700DX), ya sea mediante conjugación directa o marcaje indirecto con conjugados de anticuerpos secundarios. Los datos ilustrativos incluyen realizar la PIT en células infectadas con el virus de la gripe utilizando una PIT indirecta con anticuerpos de ratón antiviral de la gripe (H3N2) y anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón-IRDye 700DX.

En este estudio, la conjugación del fragmento de Fab del anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón específico (GtxMs Fab) AffiniPure con IRDye 700DX se realizó de manera sustancial como se describe en el ejemplo 8.

Se infectaron células Vero con el virus de la gripe antes de tratar el virus o las células con la PIT. Se colocaron aproximadamente 5000 células Vero en placas negras de fondo transparente de 96 pocillos. Al día siguiente, después de colocar las células, las células se lavaron cuatro veces con 100 µl de EMEM complementado con penicilina/estreptomicina al 1 % (medio sin suero), después se incubaron con medio sin suero que contenía 327,68 unidades de HA de gripe AX-31, A/Aichi/68 (H3N2) (N.º de catálogo: 10100375, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) por pocillo. A continuación, las células se incubaron con el medio de inoculación del virus o el medio sin suero durante 90 minutos a 37 °C, después de lo cual el medio de inoculación del virus se reemplazó con EMEM complementado con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,3 % y penicilina/estreptomicina al 1 %.

A continuación, las células infectadas con virus se marcaron con anticuerpos de ratón antiviral de la gripe (H3N2) y anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón-IRDye 700DX 14 horas después de la inoculación del virus. Brevemente, las células se incubaron durante una hora a 4 °C con 1 µg/ml de anticuerpo de ratón antiviral de la gripe A humana (H3N2) (F49) (N.º de catálogo: M146, TaKaRa, Katsushika Tokio, Japón) diluido con EMEM complementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % (medio de cultivo completo). A continuación, las células se lavaron una vez con medio de cultivo completo y después se incubaron durante una hora a 4 °C con 5 µg/ml de GtxMs-IRDye 700DX diluido en medio de cultivo completo. A continuación, las células se lavaron una vez con 100 µl de medio de cultivo completo. Para inducir la PIT, las células se iluminaron con un láser de 690 nm a 64 J/cm² o se protegieron de la luz ("sin luz").

La muerte celular se evaluó utilizando el reactivo CellTox green. Después del tratamiento con luz, todas las células se incubaron con reactivo CellTox green 1x diluido en medio de cultivo completo durante 15 minutos a 37 °C, después se tomaron imágenes con un microscopio fluorescente (Evos, Life Technologies). Se eligieron aleatoriamente al menos 5 regiones de interés aleatorias por pocillo para al menos tres pocillos diferentes para obtener la imagen de campo claro, la imagen fluorescente del anticuerpo antiviral de la gripe utilizando un cubo de excitación y emisión Cy5 y la imagen fluorescente de CellTox green utilizando un cubo de excitación y emisión GFP. Después las células se puntuaron para la tinción con anticuerpo antiviral de la gripe como una indicación de que la célula estaba infectada por el virus. De las células infectadas por virus, a continuación, se puntuaron las células para determinar si había tinción con CellTox green.

Como se muestra en la figura 13, los resultados mostraron que se observó muerte celular inducida por PIT en células Vero infectadas con el virus de la gripe que se habían marcado de manera secuencial con el anticuerpo de ratón antiviral de la gripe (H3N2) y el anticuerpo de cabra anti-ratón-IRDye 700DX (GtxMs-IRDye 700DX) seguido de irradiación de luz. El grado de muerte celular que se observó fue dependiente de la luz, ya que solo se observó una muerte celular insignificante en ausencia de tratamiento con luz.

Ejemplo 18: Destrucción de neuronas mediante PIT mediada por el conjugado de IR700

El siguiente estudio se realizó para evaluar si las neuronas se pueden destruir mediante PIT utilizando conjugados de IRDye 700DX. Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) se sometieron a PIT con la subunidad B de la toxina del cólera conjugada con IRDye 700DX. La irradiación con luz láser de 690 nm dio como resultado la muerte celular completa medida en un ensayo de toxicidad celular basado en luminiscencia. Sin la administración de luz no se observó muerte celular significativa. Los hallazgos demuestran que la PIT puede ser un tratamiento eficaz para destruir neuronas y, en términos más generales, para destruir células no cancerosas, incluidas células primarias.

Los GRD embrionarios de rata se obtuvieron de Lonza (número de catálogo R-eDRG-515, Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD) en formato criopreservado y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Se recubrieron placas de 96 pocillos de pared negra con 50 µl de PBS por pocillo que contenía 30 µg/ml de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P0899, St. Louis, MO) y 2 µg/ml de laminina (Sigma-Aldrich, L2020, St. Louis, MO) durante 1 hora a temperatura ambiente, siguiendo la preparación de la solución madre y los procedimientos de Lonza. La solución de recubrimiento se aspiró y las placas se dejaron secar durante una hora (tapa abierta en la cabina de

bioseguridad) y se utilizaron inmediatamente para la siembra de células. Las instrucciones proporcionadas por Lonza se siguieron estrictamente para descongelar y sembrar las células. El medio de cultivo fue PNBm complementado en todo momento con L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 µg/ml, anfotericina 37 ng/ml y NSF-1 al 2 %, pero este último se añadió fresco cada vez antes de su uso. Estos componentes formaban parte de un kit (número de catálogo CC-4461, Lonza, Basilea, Suiza). Además, también se añadió fresco el factor de crecimiento nervioso (NGF, número de catálogo N2513, Sigma, St. Louis, MO) en el momento de su uso a 100 ng/ml. Para colocar las células, se descongeló un frasco de 0,25 ml y se diluyó gota a gota con 3,75 ml de medio de cultivo y se sembraron 200 µl de suspensión en los pocillos. Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %, y el medio se reemplazó con medio que también contenía los inhibidores mitóticos 5-fluoro-2'-desoxiuridina (concentración final de 7,5 µg/ml, número de catálogo F-0503, Sigma, St. Louis, MO) y uridina (concentración final de 17,5 µg/ml, número de catálogo U-3003, Sigma, St. Louis, MO) que se añadieron justo antes de su uso. El medio se cambió de nuevo cada 3 a 4 días.

La conjugación de la toxina B del cólera con IR700 se realizó como se describe en el ejemplo 13.B.

Después de cultivar DRG embrionarios de rata durante 11 días, se diluyó 1 µg/ml de solución madre de toxina B del cólera-IR700 a 40 µg/ml con medio de cultivo y se añadieron 5 µl del conjugado diluido directamente a los pocillos de una placa de 96 pocillos que contenía neuronas de DRG en 200 µl de medio, para lograr una concentración final de 5 µg/ml de conjugado. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron una vez con medio de cultivo y se añadieron 100 µl de medio de cultivo fresco. Las neuronas teñidas se iluminaron después con un láser de 690 nm a una dosis de luz de 64 J/cm² (150 mW/cm²) o se dejaron protegidas de la luz como control ("sin luz").

El efecto de la PIT en las neuronas de DRG se midió con el ensayo de toxicidad basado en luminiscencia CytoTox Glo (número de catálogo G9291, Promega, Madison, WI). Este ensayo se basa en la integridad de la membrana y emplea un prosustrato para la luciferasa que no puede penetrar en las células inalteradas. Cuando las células mueren, el daño en la membrana plasmática permite que las enzimas se difundan fuera de las células y activen el prosustrato, convirtiéndose ahora en un verdadero sustrato para la luciferasa, lo que da como resultado una señal de luminiscencia. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadieron 50 µl de reactivo de ensayo. Después de la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, la luminiscencia se leyó en un lector multimodo. Para determinar la muerte celular completa, se añadieron 50 µl de solución de digitonina para destruir las células viables restantes y, después de 20 minutos, se leyó de nuevo la luminiscencia. Los valores de fondo de los pocillos sin células se restaron de cada lectura y el porcentaje de muerte celular se calculó como la relación entre la luminiscencia antes y después de la lisis con digitonina, multiplicada por 100.

Como se muestra en la figura 14, la PIT indujo la muerte celular en neuronas del DRG embrionarias de rata. La irradiación con luz láser de 690 nm de 64 J/cm² conducen a una muerte celular del 100 por cien después de 3 horas (barra izquierda), mientras que las células protegidas de la luz ("Sin luz") permanecieron ilesas (6 % de células muertas, barra derecha).

Ejemplo 19: Sensibilidad del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX, del conjugado de cetuximab-IRDye 680RD y el conjugado doble de cetuximab-IRDye 700+IRDye 680RD a la luz blanca fluorescente frente a luz LED verde

Se realizaron estudios para evaluar si la protección contra la luz para los conjugados de IRDye 700DX es una propiedad específica debido a la sensibilidad única de los conjugados de IRDye 700DX para formar agregados solubles cuando se exponen a la luz. Se evaluaron tres conjugados diferentes: (1) un conjugado de cetuximab-IRDye 700DX, (2) un conjugado de cetuximab-IRDye 680RD y (3) un conjugado doble de cetuximab-IRDye 700+IRDye 680RD.

Aunque muchos fluoróforos requieren protección de la luz porque no son muy fotoestables, de modo que la exposición a la luz da como resultado la degradación del fluoróforo y una disminución simultánea de las propiedades de fluorescencia, IRDye700DX es un colorante fotoestable único (véase, por ejemplo, Peng *et al.* Proceedings of SPIE 6097, 2006; véase también, www.licor.com/bio/products/reagents/irdye/700dx/photostability.html). Debido a la extrema fotoestabilidad del colorante, esto sugeriría que el IRDye 700DX no necesita estar protegido de la luz. Sin embargo, se observó que solo cuando el IR700 se conjuga con una macromolécula, el IR700 requiere protección frente a la luz debido a una mayor sensibilidad de la molécula conjugada para inducir la formación de agregados solubles.

A. Conjugación de anticuerpos

Todos los anticuerpos se conjugaron con los colorantes (es decir, IRDye 700DX, IRDye 600RD o ambos) utilizando el mismo enfoque.

El conjugado de cetuximab-IRDye 700DX se preparó como se describe en el ejemplo 1.

El conjugado de cetuximab-IRDye 680RD se preparó utilizando el mismo protocolo general que se describe en el ejemplo 1, con las siguientes modificaciones. Se incubó una muestra de cetuximab con 4 equivalentes molares de IRDye 680RD (N.º de cat. 929-70050; Li-COR, Lincoln, NE) disuelto a 5 mg/ml en DMSO. Todas las demás etapas en los procesos de conjugación, purificación y caracterización del conjugado fueron idénticas a las descritas

anteriormente para la preparación del conjugado de cetuximab-IRDye 700.

El conjugado doble de cetuximab-IRDye 700DX+IRDye 680RD se preparó utilizando el mismo protocolo general que se describe en el ejemplo 1, con las siguientes modificaciones. A una muestra de cetuximab-IRDye 700DX preparada previamente mediante el protocolo descrito anteriormente se le añadieron 4 equivalentes molares de IRDye 680RD disuelto en DMSO a 5 mg/ml. Todas las demás etapas de la conjugación, incluyendo el proceso de purificación y caracterización del conjugado, fueron idénticas a las descritas anteriormente para la preparación de conjugado de cetuximab-IRDye 700DX.

B. Efectos de la exposición previa a la luz sobre la composición del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX, el conjugado de cetuximab-IRDye 680RD y el conjugado doble de cetuximab-IRDye 700+IRDye 680RD

Se analizó la formación de agregados solubles en los conjugados en cuatro condiciones diferentes con al menos 30 µl de conjugado colocados en un frasco transparente de HPLC por muestra a una concentración de conjugado de anticuerpo de ~1,8 mg/ml. Las muestras se expusieron a iluminación blanca fluorescente de 500 lux a 25 °C, iluminación LED verde de 500 lux (N-º de catálogo: Green-ECS GP19 EcoSmart) a 25 °C, sin luz a 25 °C o sin luz a 4 °C durante 24 horas. Después de 24 horas bajo cada condición de tratamiento, la pureza del monómero, la formación de agregados solubles y la fluorescencia se evaluaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El porcentaje de formación de agregados solubles se midió utilizando cromatografía de exclusión por tamaño a una absorbencia de 280 nm. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la fluorescencia, se determinó la fluorescencia a 680 nm (áreas para el máximo de monómero) dividida por el área para la absorbencia de 280 nm para el monómero.

Los resultados de la figura 15A muestran que cetuximab conjugado con IRDye 700DX dio como resultado una mayor sensibilidad a la formación de agregados solubles en comparación con cetuximab conjugado con IRDye 680RD cuando se expuso a luz blanca. La exposición de cetuximab-IRDye 700DX a luz blanca fluorescente indujo un mayor porcentaje de formación de agregados solubles. La exposición a la luz verde de cetuximab-IRDye 700DX también aumentó la formación de agregados solubles, aunque a un ritmo mucho más lento que el de la luz blanca. Se observó menos del 1 % de formación de agregados solubles en muestras incubadas a 4 °C o 25 °C, pero protegidas de la luz. En cambio, la exposición de cetuximab-IRDye 680RD a luz blanca fluorescente dio como resultado un aumento muy leve e la formación de agregados solubles, que fue mucho menor que la de cetuximab-IRDye 700DX. Las muestras de cetuximab-IRDye 680RD incubadas a 4 °C o 25 °C, pero protegidas de la luz o expuestas a luz verde, no mostraron ningún aumento en la formación de agregados solubles. Como se muestra, el conjugado doble en el que IRDye 700DX se conjugó con cetuximab-IRDye 680RD, dio como resultado una mayor sensibilidad a la exposición a la luz blanca y verde en la formación de agregados solubles en comparación con la de los conjugados monomarcados de cetuximab-IRDye 680 o cetuximab-IRDye 700.

Los resultados de la figura 15B muestran que la fluorescencia del conjugado de cetuximab-IRDye 680RD era más sensible a la exposición a la luz blanca que la de los conjugados de cetuximab-IRDye 700DX. Para todos los tratamientos de cetuximab-IRDye 700DX, la fluorescencia del conjugado de cetuximab-IRDye 700DX se mantuvo estable a pesar del aumento significativo en la formación de agregados solubles con exposición a luz blanca fluorescente de 500 lux durante 24 horas. El cetuximab-IRDye 680RD expuesto a luz blanca fluorescente durante 24 horas presentó la mayor disminución en la fluorescencia de todas las condiciones de tratamiento probadas, lo que indica que parte del IRDye 680RD probablemente se blanqueó con la exposición a la luz blanca. También se observó una disminución de la fluorescencia cuando el IRDye 700DX se conjugó de forma doble con el IRDye 680RD. Basado en cetuximab-IRDye 700DX monomarcado, esta disminución en la fluorescencia probablemente se debió al blanqueo de IRDye 680RD para el conjugado doblemente marcado de cetuximab-IRDye 700DX+IRDye 680RD.

Por tanto, los resultados mostraron que los conjugados de IRDye 700DX tienen una sensibilidad única para formar agregados solubles cuando se exponen a la luz. A pesar del aumento en la formación de agregados solubles en los conjugados de IRDye 700DX cuando se exponen a la luz, las propiedades de fluorescencia del conjugado de IRDye 700DX no cambiaron, coherente con los hallazgos publicados informados de que IRDye 700DX es un colorante fotoestable. En marcado contraste, la exposición a luz blanca de otro conjugado marcado con IRDye 680RD dio como resultado solo un modesto aumento en la formación de agregados solubles en comparación con el del conjugado de IRDye 700DX. Solo cuando el conjugado de IRDye 680RD se marcó tanto con IRDye 700DX como con IRDye 680RD se produjo un aumento en la formación de agregados solubles con el conjugado de IRDye 680RD. El conjugado de IRDye 680 fue sensible al fotoblanqueo con la exposición a la luz.

Los datos muestran que los conjugados de cetuximab-IRDye 700DX, cetuximab-IRDye 680RD y cetuximab-IRDye 700DX+IRDye 680RD expuestos previamente a diferentes longitudes de onda de luz presentan una sensibilidad diferencial a la formación de agregados solubles y al blanqueo por fluorescencia. Los datos proporcionados respaldan la necesidad de protección contra la luz de los conjugados para garantizar la coherencia en la fabricación del producto. De manera específica, para conjugados de macromoléculas de IRDye 700DX tales como conjugados de anticuerpo-IRDye 700DX, la fracción de pureza del monómero y la actividad farmacológica son esenciales y los cambios pueden tener un impacto significativo en la actividad destructora activada por la luz.

SECUENCIAS

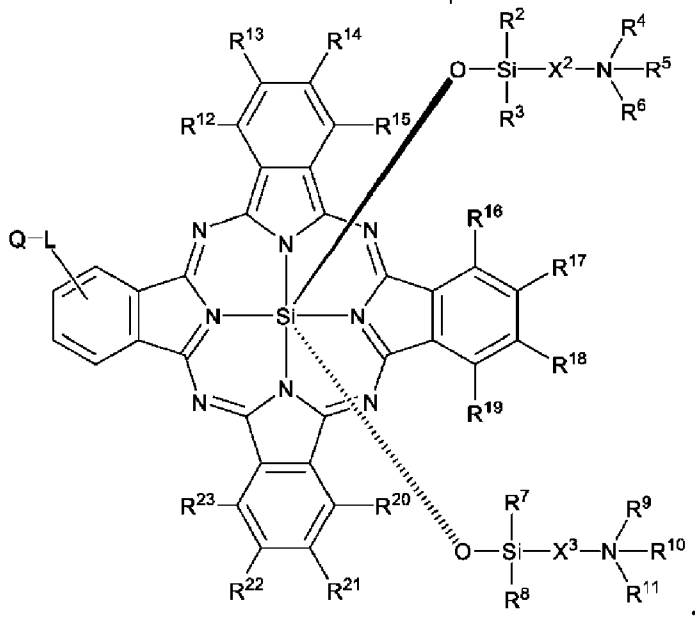
SEQ ID NO.	Secuencia
1	CRGDKGPDC
2	CCRDKGPDC
3	AKPAPPKPEPKPKKAP
4	AKVKDEPQRRSARLS
5	CAGALCY
6	CAGRRSAYC
7	CARSKNKDC
8	CDCRGDCFC
9	CDTRL
10	CGKRK
11	CGLIIQKNEC
12	CGNKRTR
13	CGNKRTRGC
14	CGRRAGGSC
15	CKAAKNK
16	CKGGRKDC-GG
17	CLSDGKRKC
18	CMYIEALDKYAC
19	KKCGGGGIRLRG
20	CNAGESSKNC
21	CNGRC
22	CNRRTKAGC
23	CPGPEGAGC
24	CPKTRRPVC
25	CPRECESIC
26	CRASKVAC
27	CREAGRKAC
28	CREKA
29	CRGDKGPDC
30	CRGRRST
31	CRKDKC
32	CRPPR
33	CRRETAWAC
34	CRSRKG
35	CSRPRRSEC
36	CTTHWGFTLC
37	CVPELGHEC
38	EKGEGALPTGKSK
39	FALGEA
40	GLNGLSSADPSSD
41	GSMSIARL
42	GVSFLEYR
43	IFLLWQR
44	IFLLWQR-C-RR
45	PEPHC
46	PISNDQKVSDDDK
47	RMWPSSTVNLSAGRR
48	RPARPAR
49	SMSIARL
50	VDEDRASLLKSQE
51	VSFLEYR
52	WNAPAEWGNW

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

- 5 (i) un conjugado que contiene un colorante de ftalocianina unido a una molécula de direccionamiento; y
 (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable;
 en donde la molécula de direccionamiento se une a una molécula diana de la superficie celular en la superficie de una célula o patógeno,

en donde el colorante de ftalocianina comprende la fórmula:



10 en donde:

L es un enlazador;

Q es un grupo reactivo para la unión del colorante a la molécula de direccionamiento;

15 R², R³, R⁷ y R⁸ cada uno se selecciona de manera independiente de entre alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido;

R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcanoilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilo opcionalmente sustituido, alquilcarbamilo opcionalmente sustituido y un ligando quelante, en donde al menos uno de R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ comprende un grupo soluble en agua;

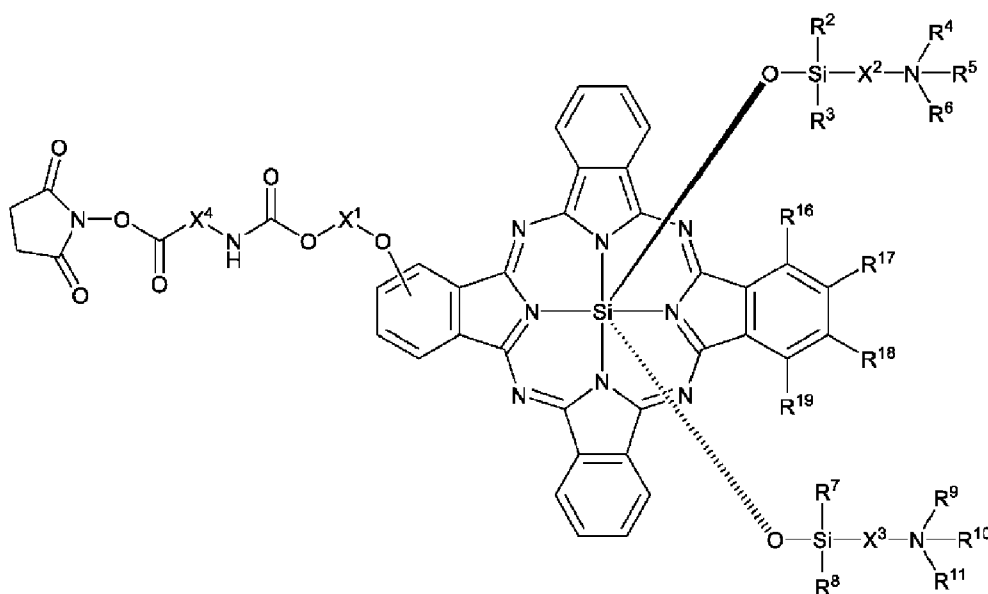
20 R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²² y R²³ cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, halógeno, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido y alcoxi opcionalmente sustituido; y

25 X² y X³ son cada uno de manera independiente alquileo C₁-C₁₀, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo; y

en donde más del 90 % o más del 95 % del conjugado está presente como un componente monomérico principal.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde más del 90 % o más del 95 % del conjugado está presente como un componente monomérico principal durante más tres meses.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el colorante de ftalocianina comprende la fórmula:



en donde:

X¹ y X⁴ son cada uno de manera independiente un alquileo C₁-C₁₀ opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

R², R³, R⁷ y R⁸ cada uno se selecciona de manera independiente entre alquilo opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido;

R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcanóilo opcionalmente sustituido, alcocarbonilo opcionalmente sustituido, alquilcarbamóilo opcionalmente sustituido y un ligando quelante, en donde al menos uno de R⁴, R⁵, R⁶, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ comprende un grupo soluble en agua; y

R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸ y R¹⁹ cada uno se selecciona de manera independiente de entre hidrógeno, halógeno, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido y alcoxi opcionalmente sustituido.

4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el colorante de ftalocianina comprende IRDye 700DX (IR700).

5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde:

la molécula diana de la superficie celular se selecciona de entre fosfolípidos de la membrana celular, peptidoglucanos procarióticos, proteínas de la envoltura de células bacterianas, proteínas de la cápside vírica, ACTHR, célula endotelial Anxa-1, aminopeptidasa N, anti-IL-6R, integrina α-4, integrina α-5-β-3, integrina α-5-β-5, α-fetoproteína (AFP), ANPA, ANPB, APA, APN, APP, 1AR, 2AR, AT1, B1, B2, BAGE1, BAGE2, receptor de linfocitos B BB1, BB2, BB4, receptor de calcitonina, antígeno de cáncer 125 (CA 125), CCK1, CCK2, CD5, CD10, CD11a, CD13, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD45, CD52, CD56, CD68, CD90, CD133, CD7, CD15, CD34, CD44, CD206, CD271, CEA (antígeno carcinoembrionario), CGRP, receptores de quimiocina, anexina-1 de la superficie celular, plectina-1 de la superficie celular, cripto-1, CRLR, CXCR2, CXCR4, DCC, DLL3, glucoproteína E2, EGFR, EGFRvIII, EMR1, endosialina, EP2, EP4, EpCAM, EphA2, receptores de ET, fibronectina, fibronectina ED-B, FGFR, receptores de Frizzled, GAGE1, GAGE2, GAGE3, GAGE4, GAGE5, GAGE6, receptor GLP-1, receptores acoplados a la proteína G de la familia A (similares a la rodopsina), receptores acoplados a la proteína G de la familia B (similares al receptor de secretina), receptores acoplados a la proteína G de la familia C (similar al receptor metabotrópico de glutamato), GD2, GP100, GP120, glipicano-3, hemaglutinina, sulfatos de heparina, HER1, HER2, HER3, HER4, HMFG, antígenos de HPV 16/18 y E6/E7, hTERT, IL11-R, IL-13R, ITGAM, calecreína-9, Lewis Y, receptor de LH, LHRH-R, LPA1, MAC-1, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MART1, MC1R, mesotelina, MUC1, MUC16, Neu (nucleolina de la superficie celular), neprilisina, neuropilina-1, neuropilina-2, NG2, NK1, NK2, NK3, NMB-R, Notch-1, NY-ESO-1, OT-R, mutante p53, antígeno de melanoma p97, NTR2, NTR3, p32 (p32/gC1q-R/HABP1), p75, PAC1, PAR1, Patched (PTCH), PDGFR, receptores de PDGF, PDT, colágeno IV escindido por proteasa, proteinasa 3, prohibitina, proteína tirosina cinasa 7, PSA, PSMA, familia P2X purinérgica, P2X1-5, mutante Ras, RAMP1, RAMP2, RAMP3 parcheado, receptor de RET, plexinas, smoothened, sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4, sst5, sustancia P, TEMs, receptor CD3 de linfocitos T, TAG72, TGFB1, TGFB2, Tie-1, Tie-2, Trk-A, Trk-B, Trk-C, TR1, TRPA, TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP, TRPV1-6, TRPA1, TRPC1-7, TRPM1-8, TRPP1-5, TRPML1-3, receptor de TSH, receptores de VEGF, VEGFR1 o Flt-1, VEGFR2 o FLK-1/KDR,

VEGF-3 o FLT-4, canales iónicos dependientes de voltaje, VPAC1, VPAC2, tumor 1 de Wilms, Y1, Y2, Y4 e Y5; o la molécula diana de la superficie celular se selecciona de entre PD-L1, HER1/EGFR, HER2, CD20, CD25, CD33, CD52 y antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA); o la molécula diana de la superficie celular es HER1/EGFR.

7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la molécula de direccionamiento es cetuximab o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la concentración del conjugado en la composición es:

- (a) de 0,01 mg/ml a 200 mg/ml; o
- (b) de 0,5 mg/ml a 10 mg/ml.

9. Un recipiente que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde:

el recipiente protege de la transmisión de la luz que tiene una longitud de onda de 500 nm a 725 nm o de 650 nm a 725 nm; y/o

el recipiente protege de la transmisión de la luz de manera que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %; y/o

en donde el recipiente es verde, azul, ámbar, traslúcido, opaco o está recubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

10. Un sistema de envasado para proteger un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento de la luz que comprende:

un primer recipiente que comprende el recipiente de la reivindicación 9; y

un segundo recipiente que comprende el primer recipiente, en donde:

el segundo recipiente protege de la transmisión de luz que tiene una longitud de onda de 250 nm a 800 nm, de 250 nm a 450 nm, de 400 nm a 800 nm, de 450 nm a 650 nm o de 600 nm a 720 nm; y opcionalmente en donde además:

el segundo recipiente protege de la transmisión de luz de modo que el porcentaje de transmisión de luz es inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %; y/o

el segundo recipiente es verde, azul, ámbar, traslúcido, opaco o está recubierto por un material con una transmisión de luz inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

11. Un kit, que comprende:

el recipiente de la reivindicación 9 o el sistema de envasado de la reivindicación 10;

una cubierta protegida de la luz capaz de cubrir un dispositivo capaz de administrar una composición que comprende un conjugado de colorante de ftalocianina y molécula de direccionamiento; y opcionalmente instrucciones de uso.

12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método para tratar una hiperplasia o un tumor en un sujeto humano, en donde el tratamiento comprende:

a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, en donde antes de la etapa de administración, el conjugado no está expuesto a una intensidad de luz ambiental superior a 500 lux; y

b) irradiar la hiperplasia o el tumor a una longitud de onda de 600 a 740 nm a una dosis de al menos 1 J cm⁻² o 1 J/cm de longitud de fibra, tratando así la hiperplasia o el tumor en el sujeto.

13. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 12, en donde el tumor es un cáncer localizado en la cabeza y el cuello, mama, hígado, colon, ovario, próstata, páncreas, cerebro, cuello del útero, huesos, piel, ojo, vejiga, estómago, esófago, peritoneo o pulmón.

14. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 12 o 13, en donde:

la hiperplasia o el tumor se irradian a una longitud de onda de 690 ± 50 nm o 690 ± 20 nm; y/o

la hiperplasia o el tumor se irradian a una dosis de 2 J cm⁻² a 400 J cm⁻² o de 2 J/cm de longitud de fibra a 500 J/cm de longitud de fibra.

15. La composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la composición farmacéutica se administra a una dosis entre 25 mg/m² y 2000 mg/m².

FIG. 1A

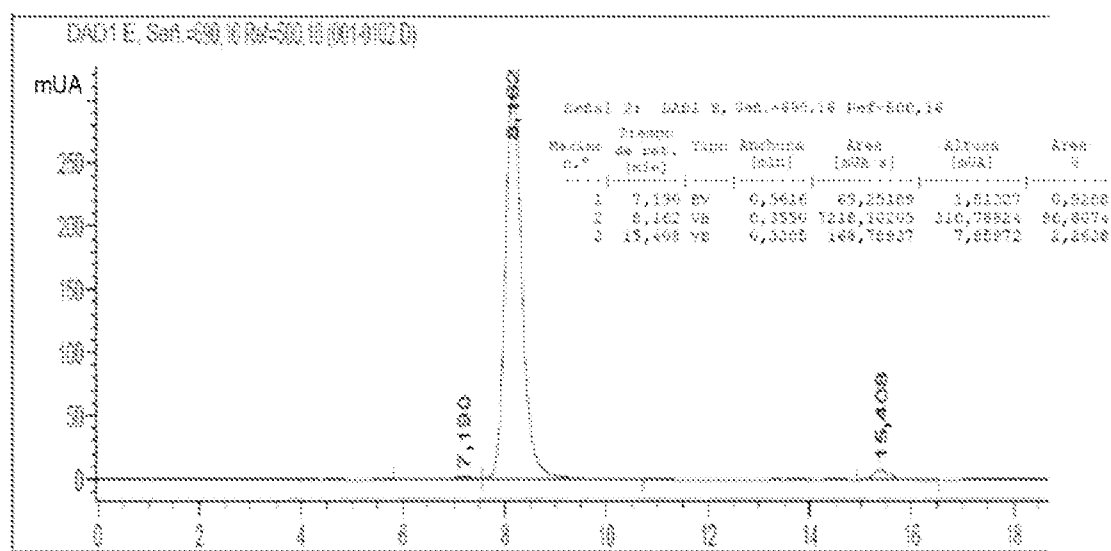


FIG. 1B

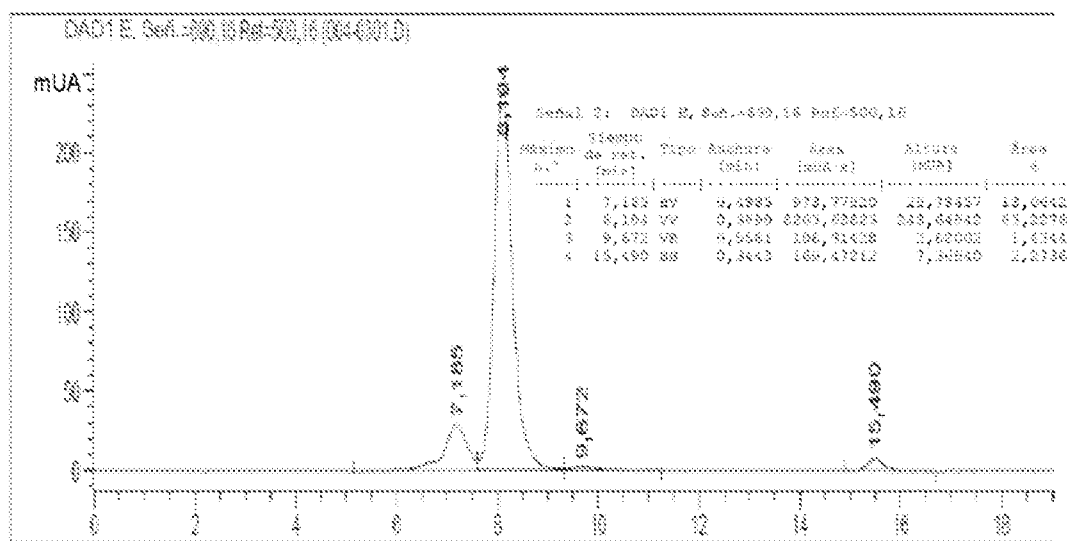


FIG. 2A

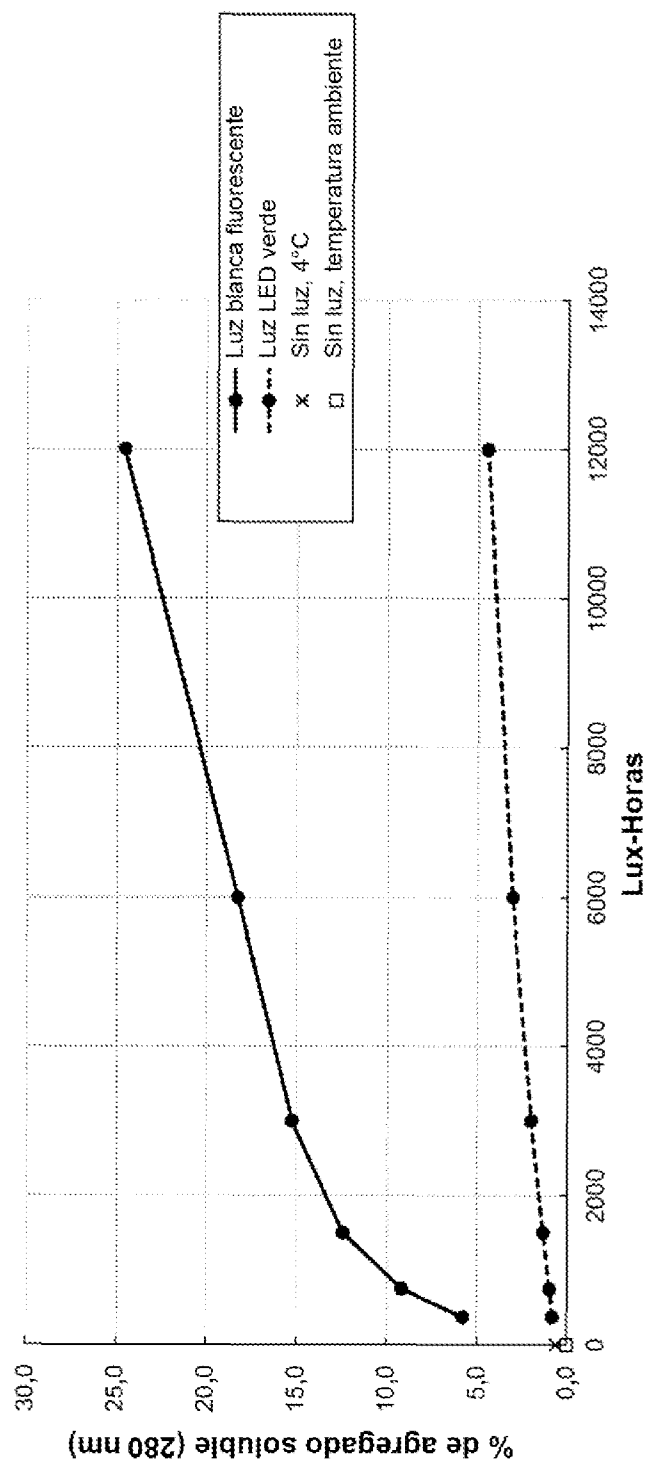


FIG. 2B

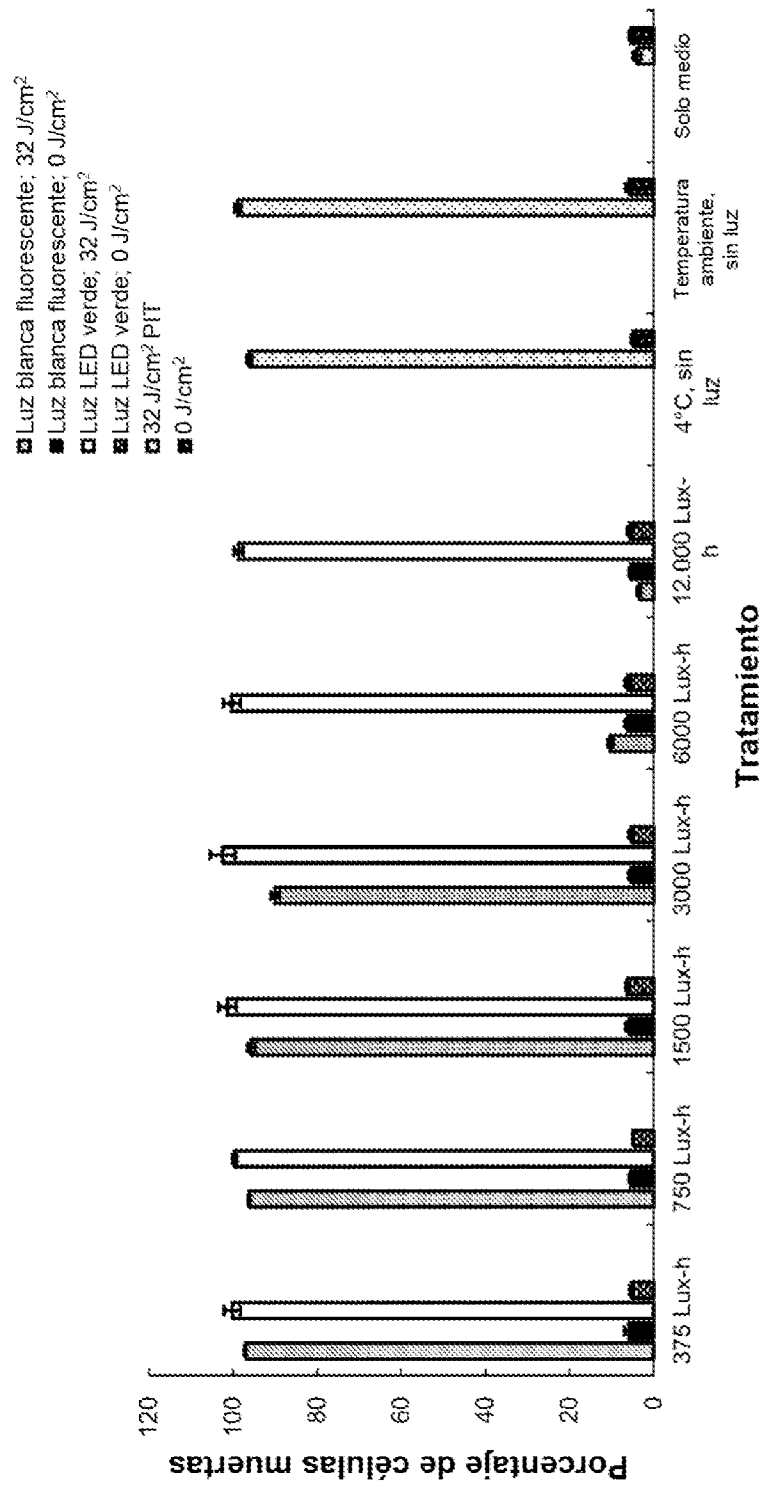


FIG. 2C

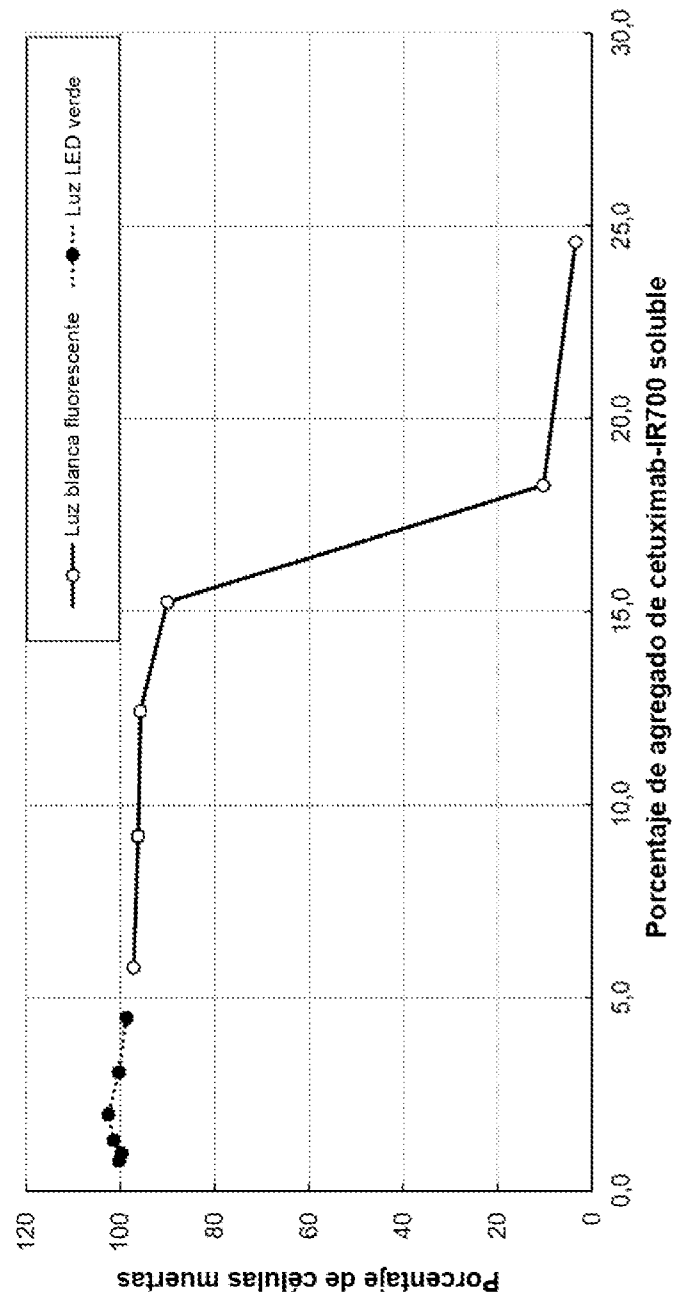


FIG. 3

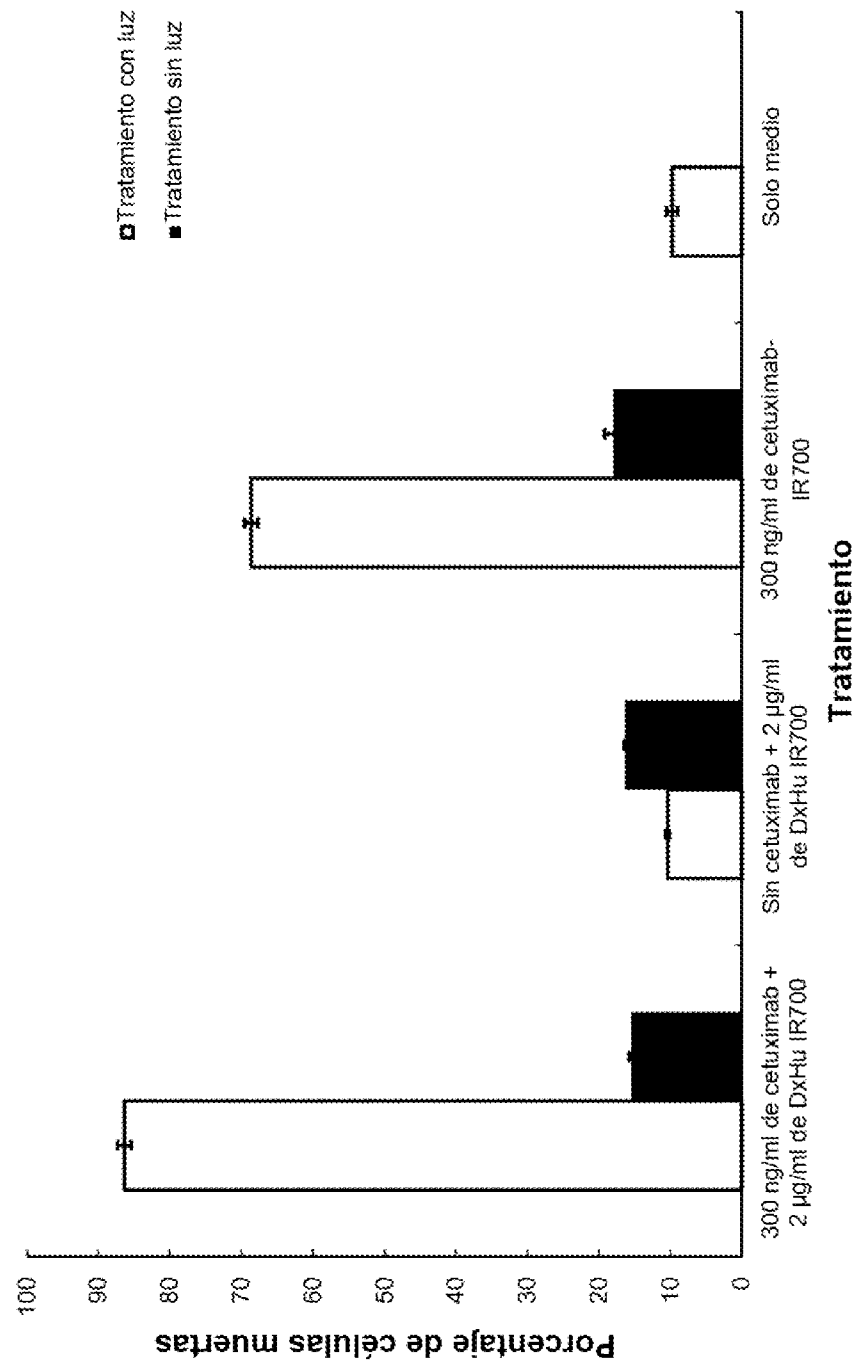


FIG. 4A

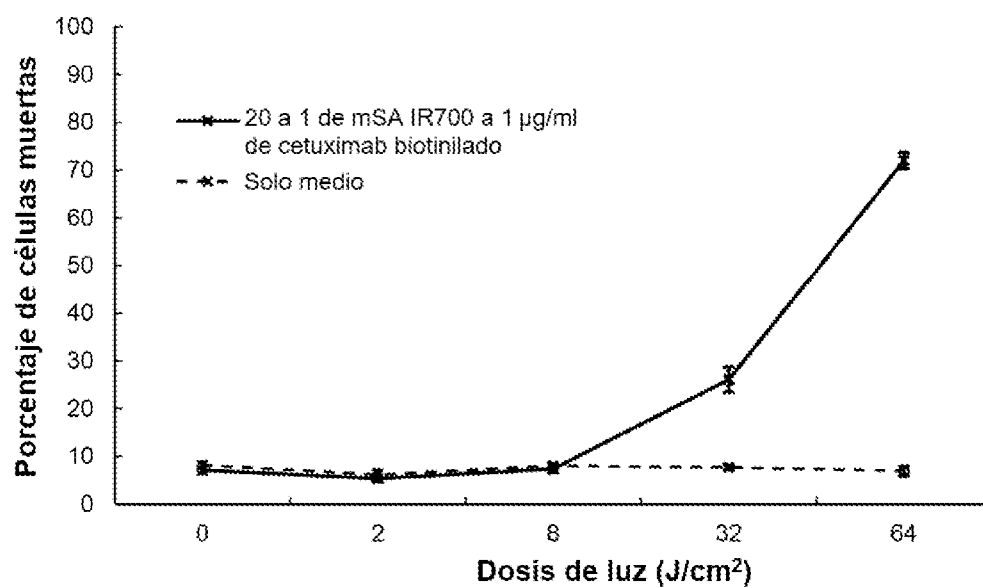


FIG. 4B

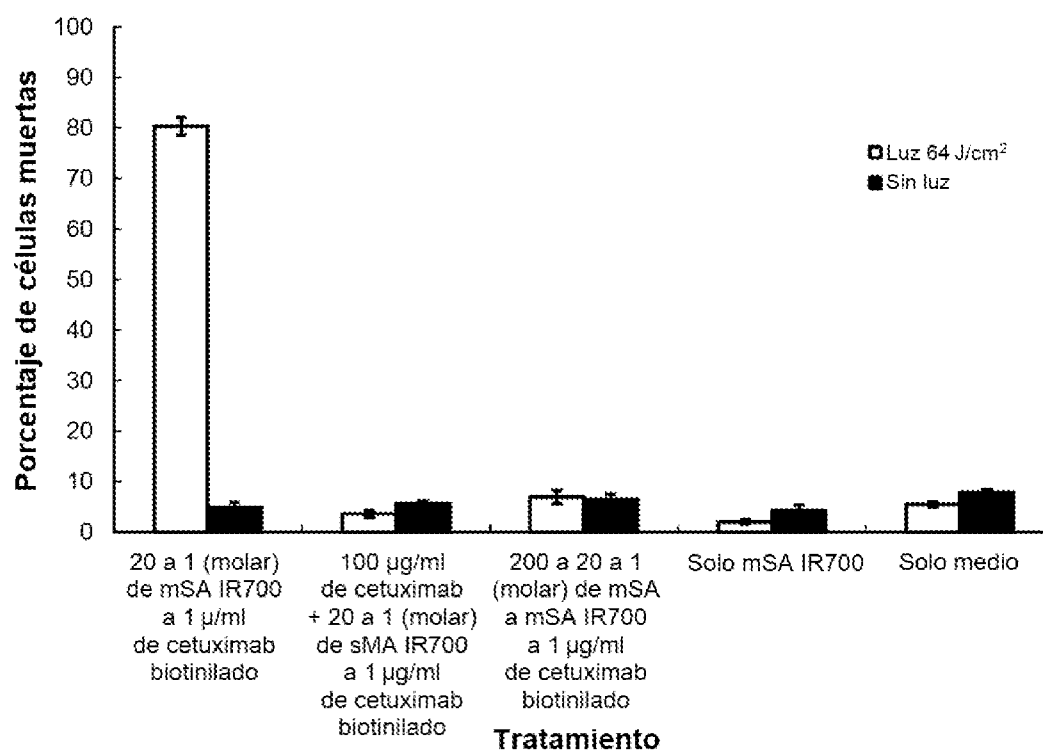


FIG. 4C

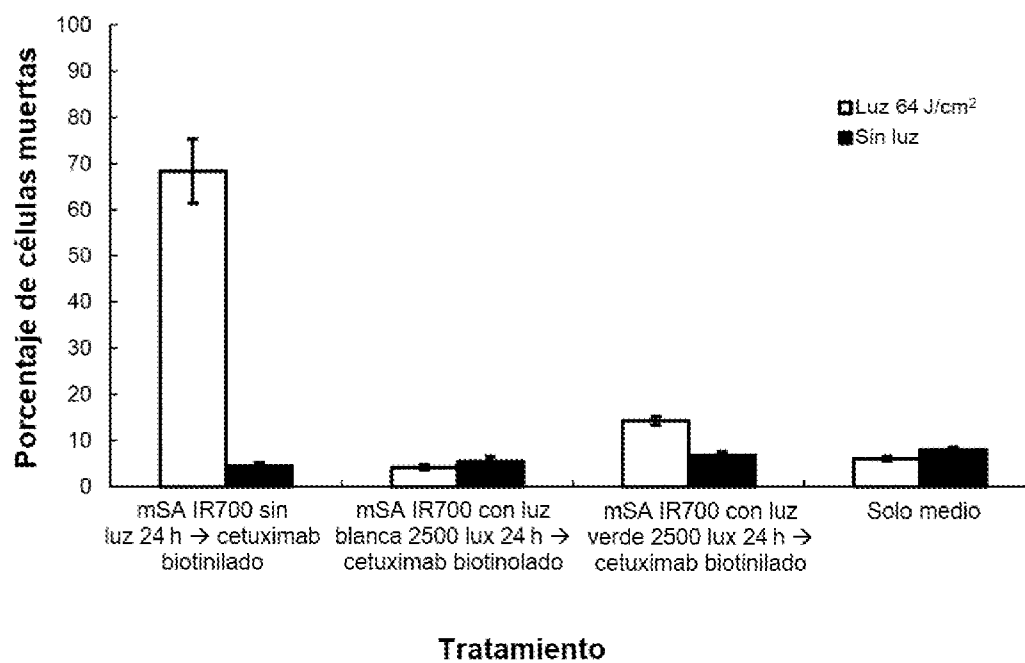


FIG. 5A

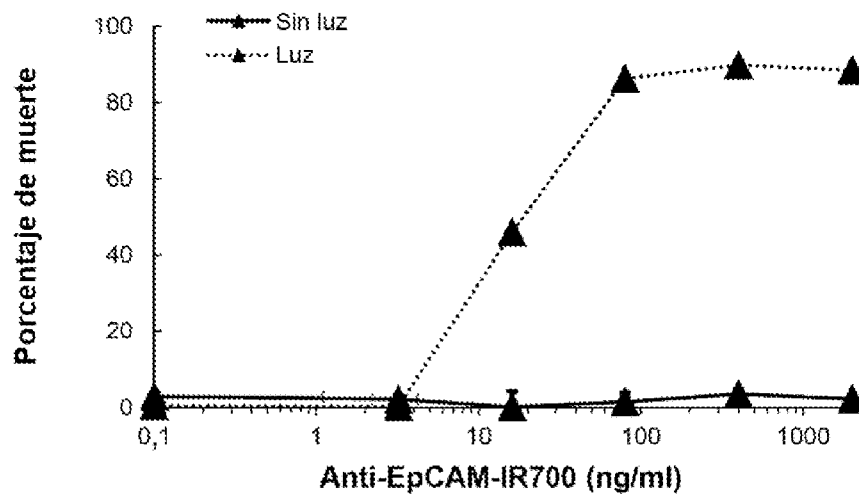


FIG. 5B

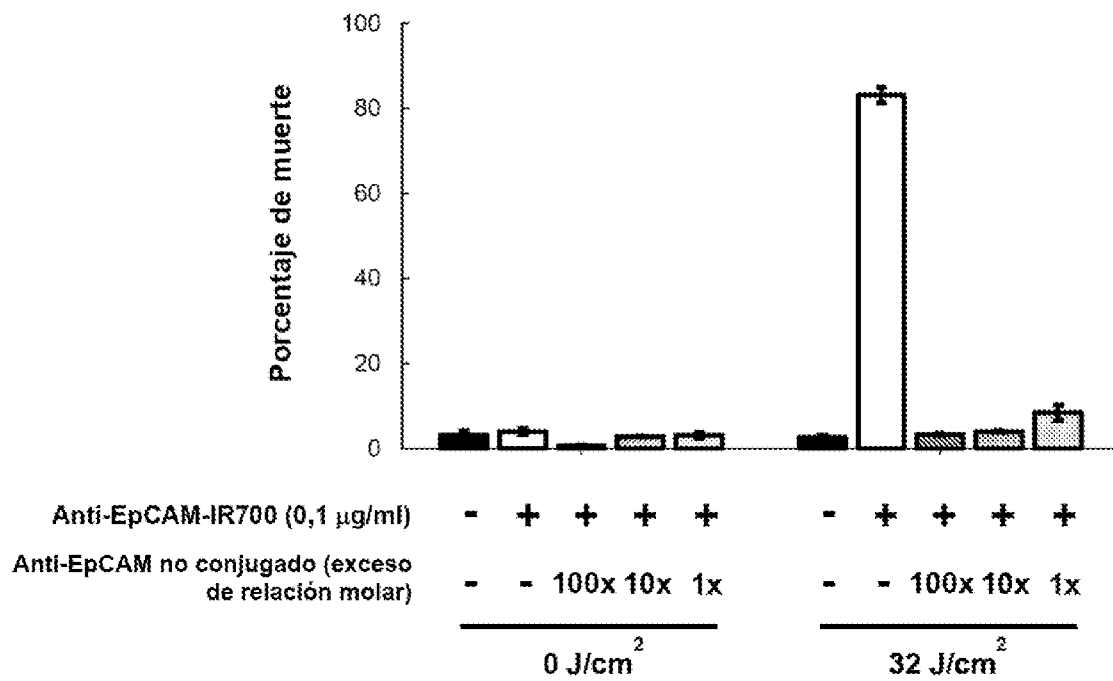


FIG. 6

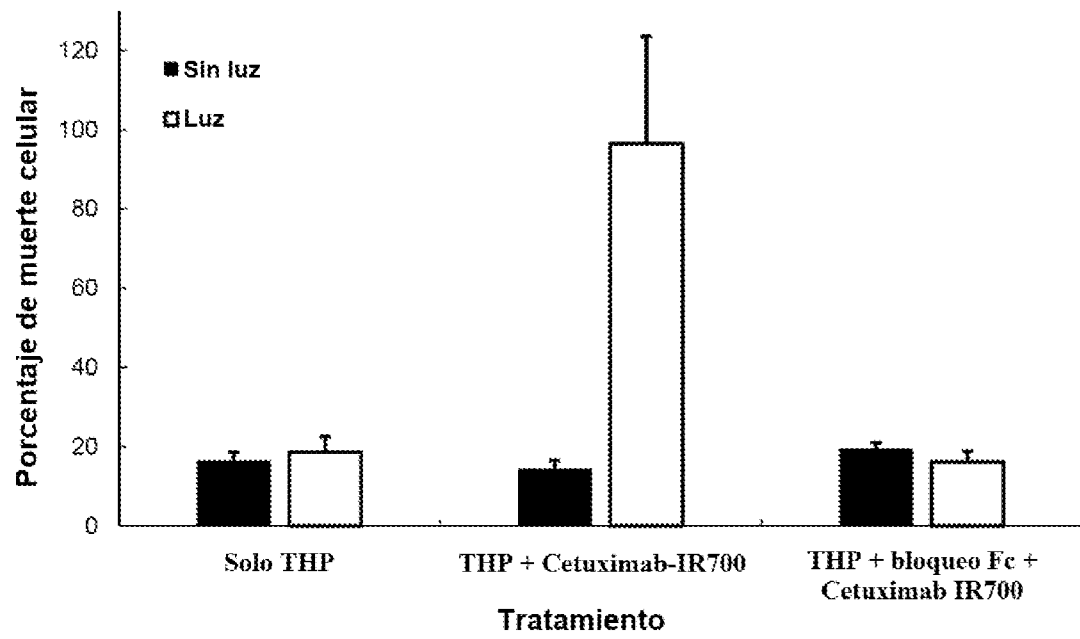


FIG. 7A

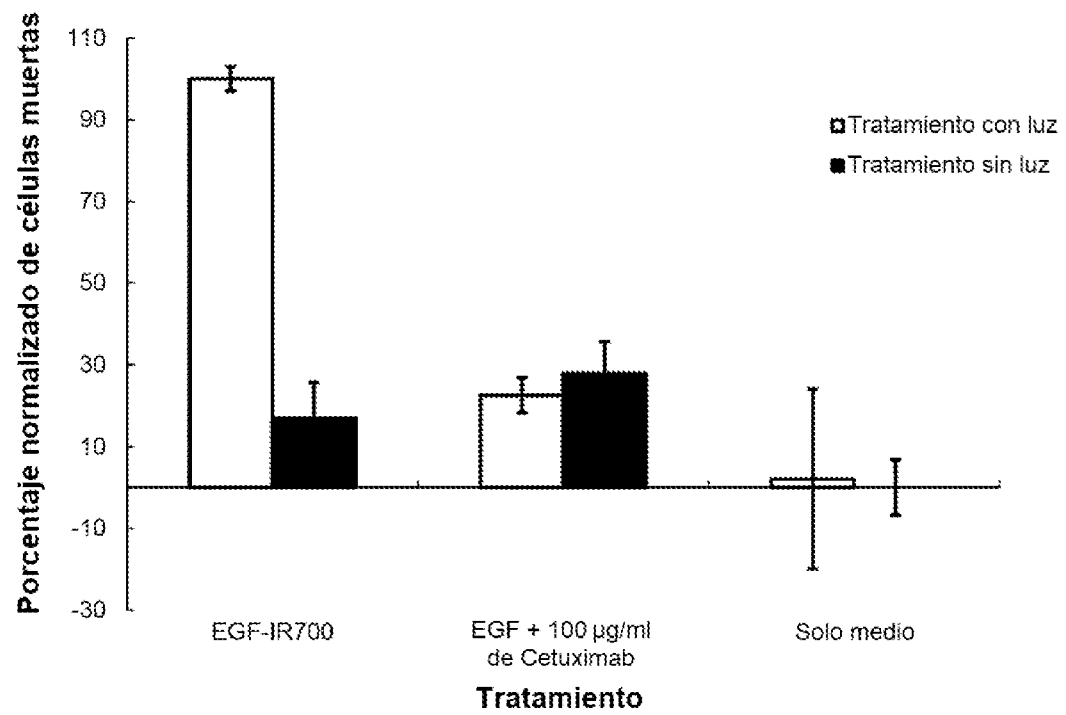


FIG. 7B

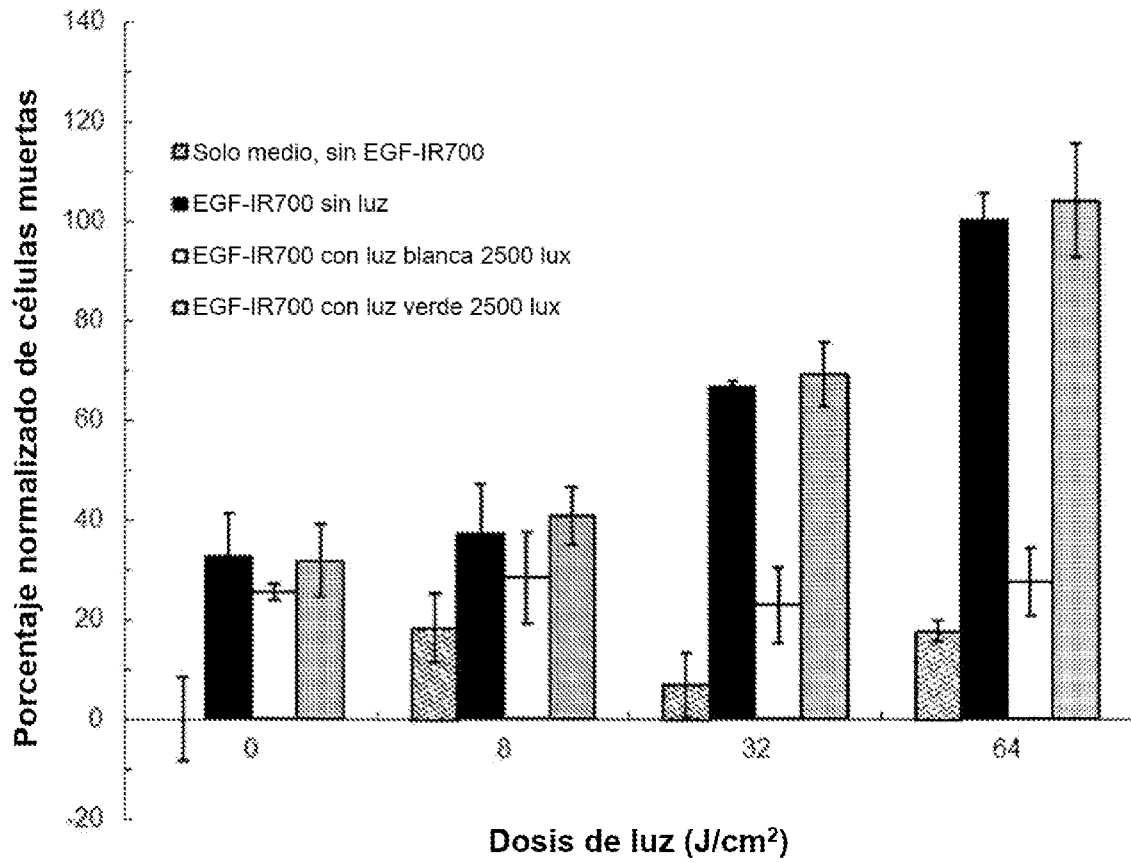


FIG. 8A

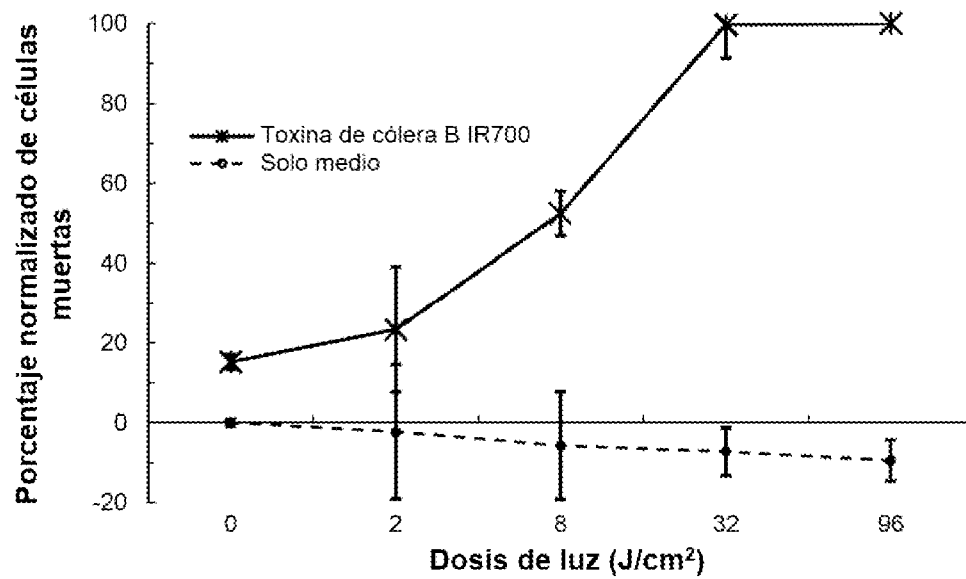


FIG. 8B

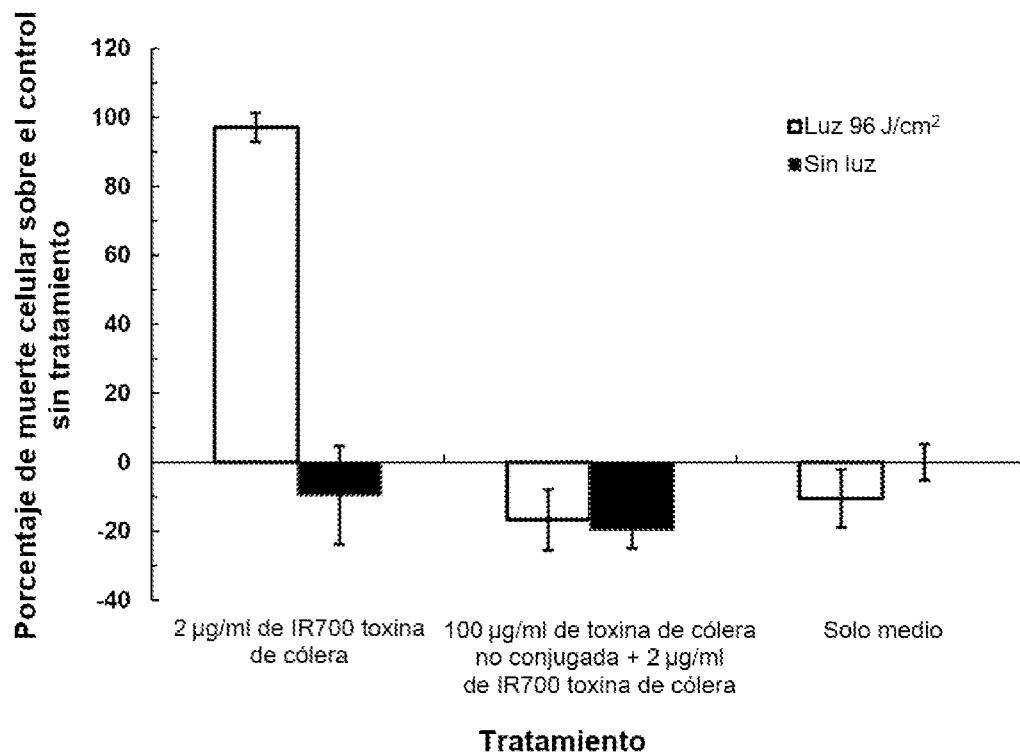


FIG. 8C

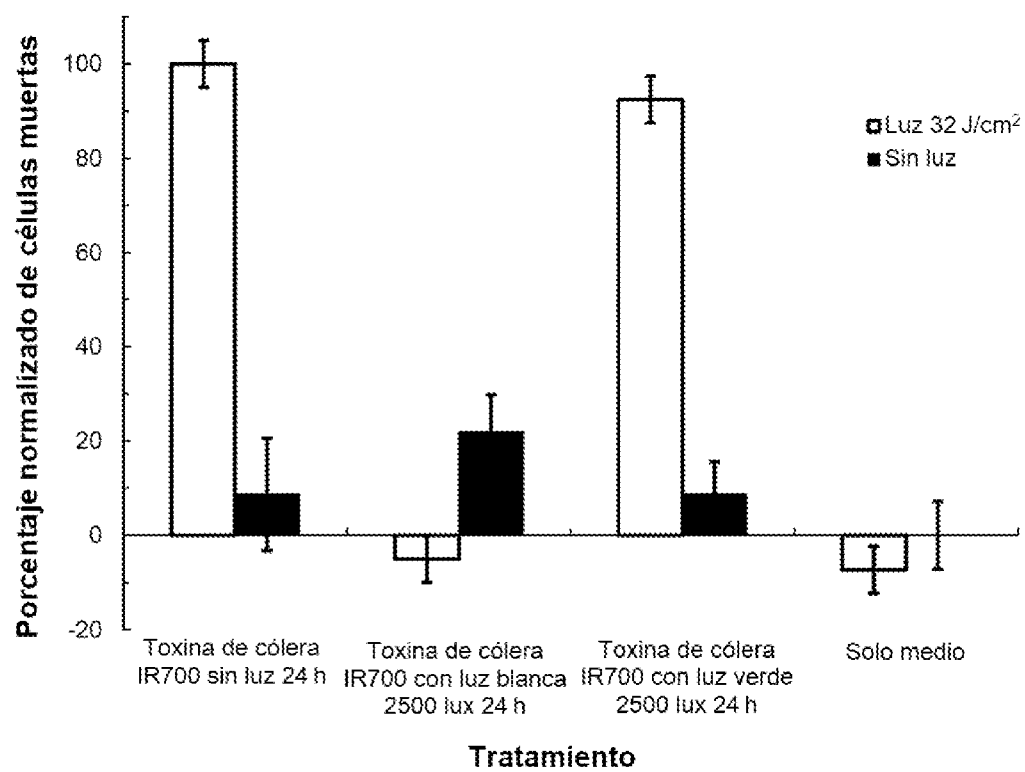


FIG. 9A

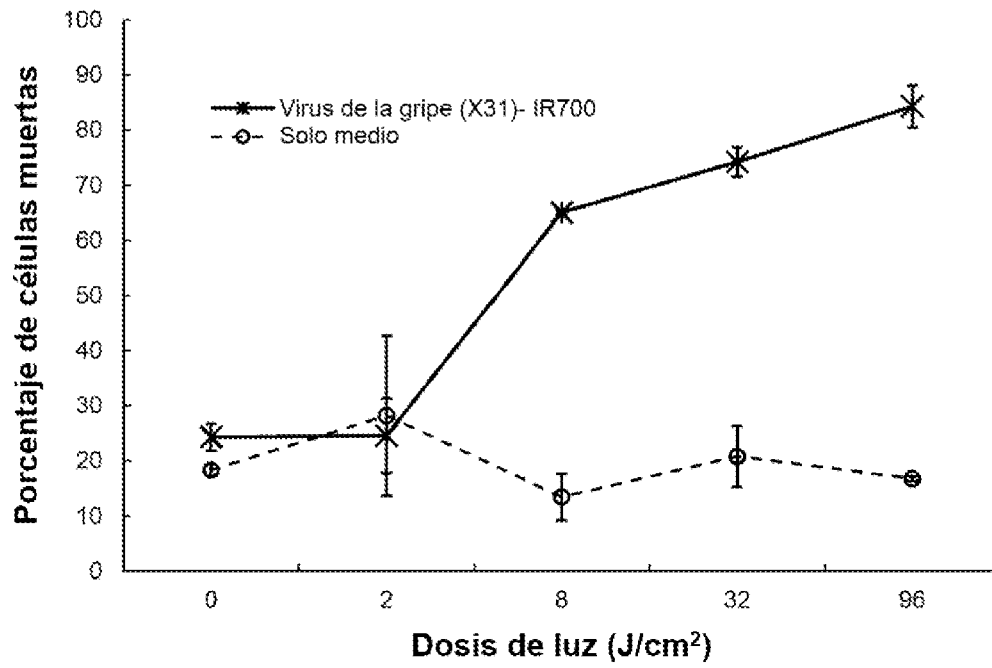


FIG. 9B

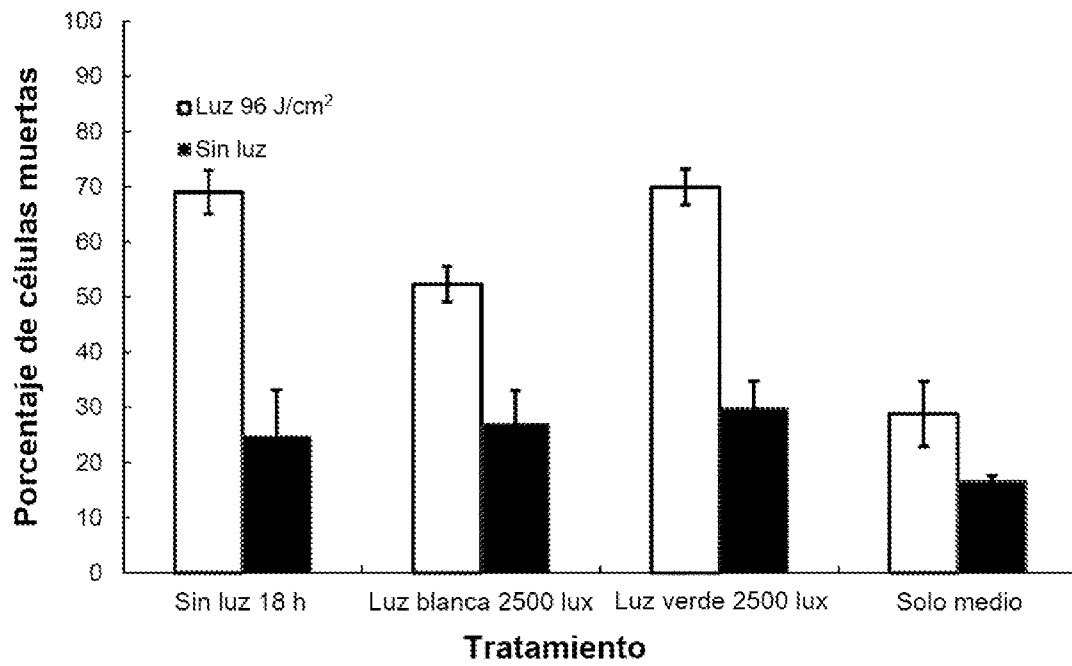


FIG. 10A

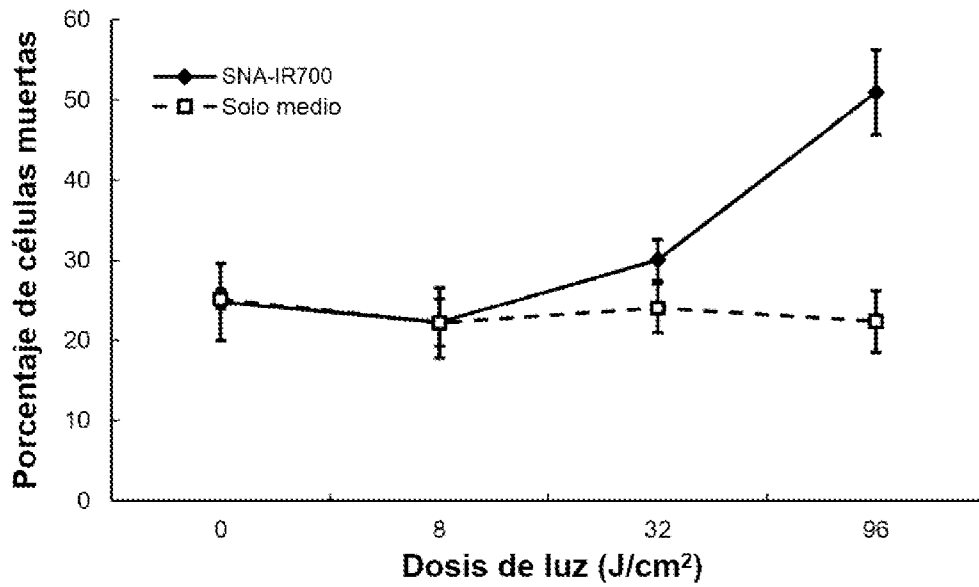


FIG. 10B

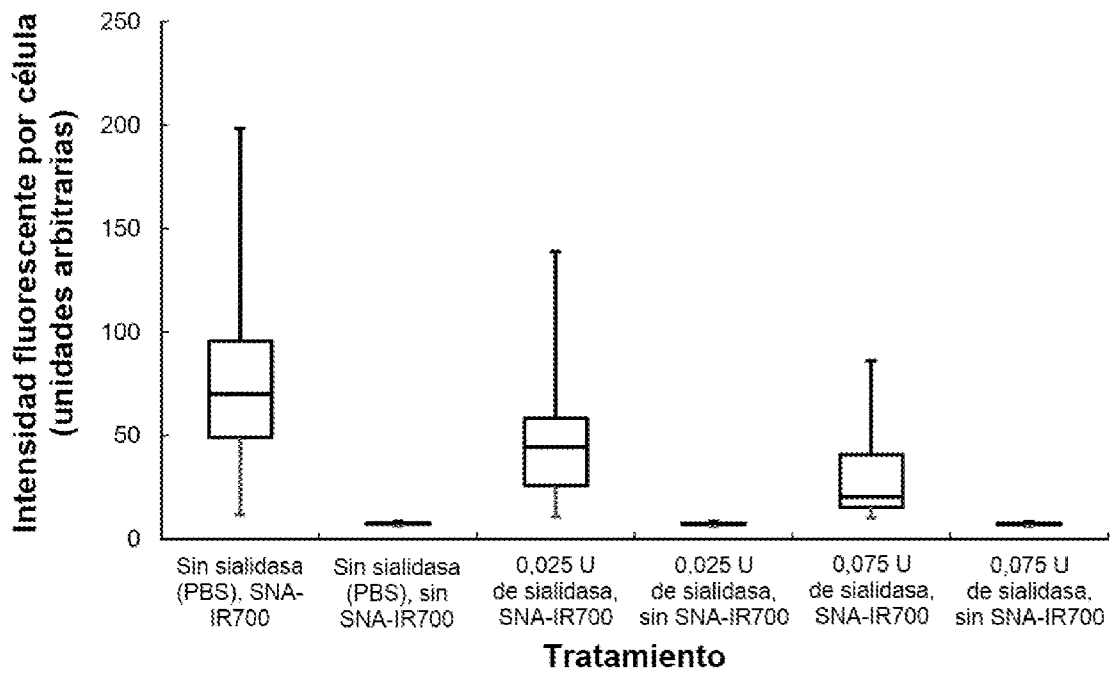


FIG. 11

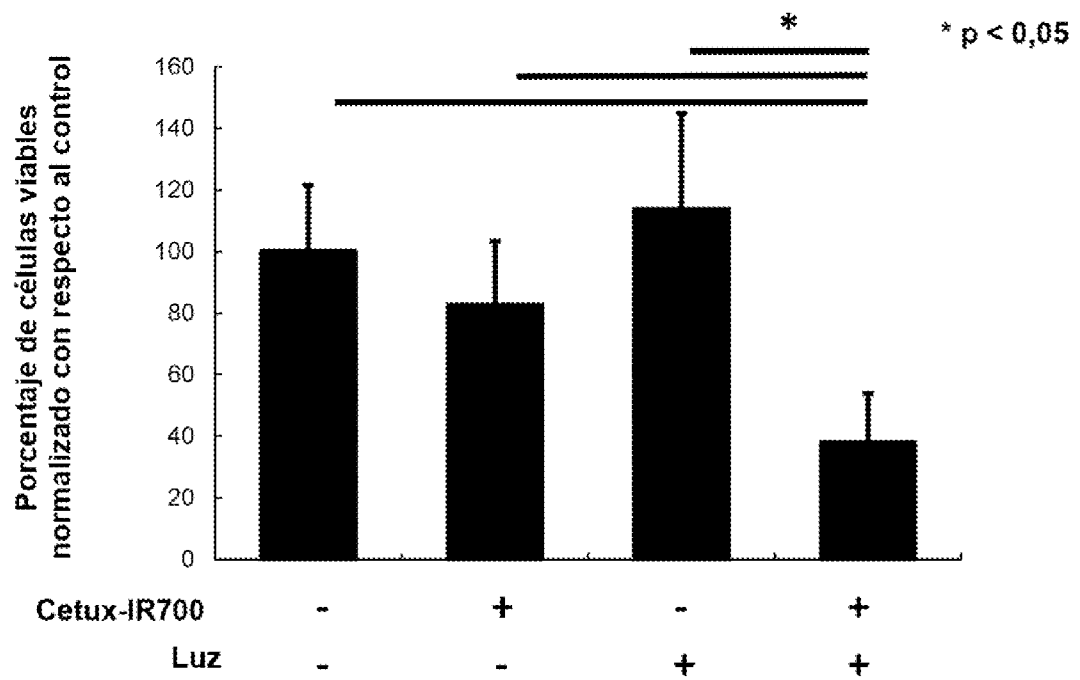


FIG. 12

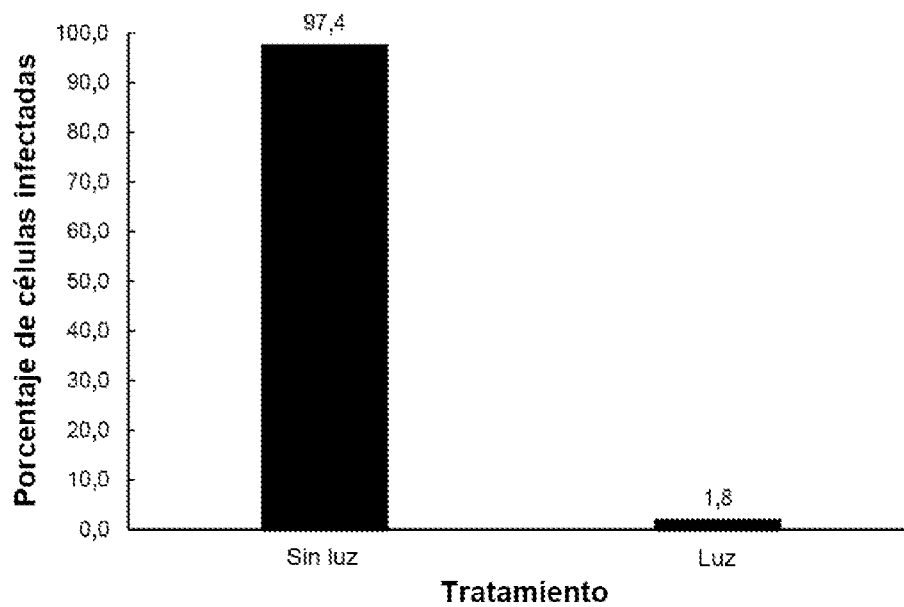


FIG. 13

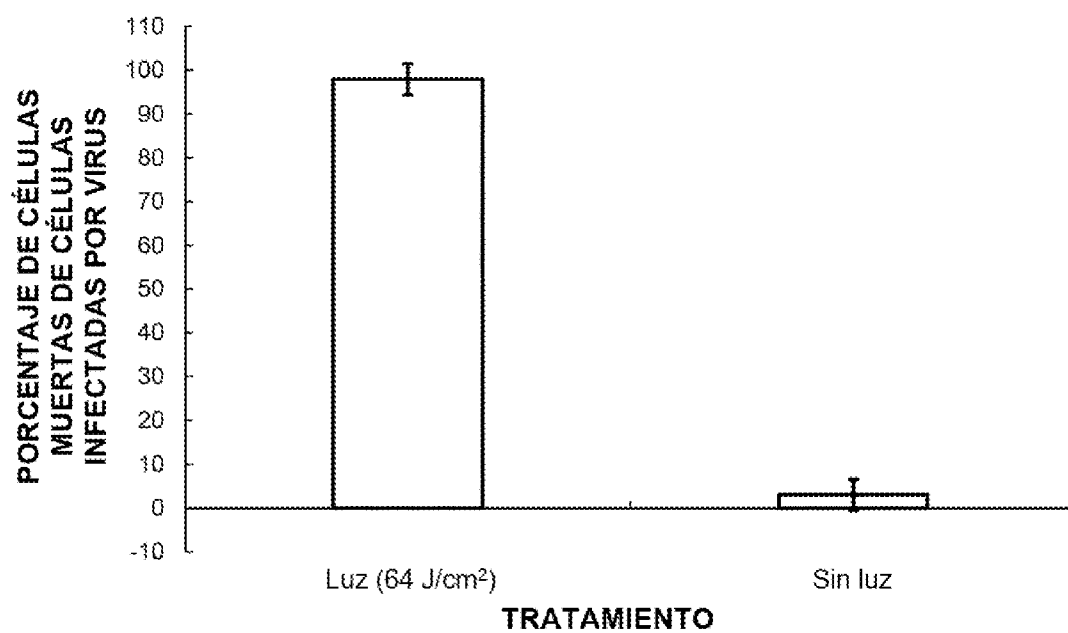


FIG. 14

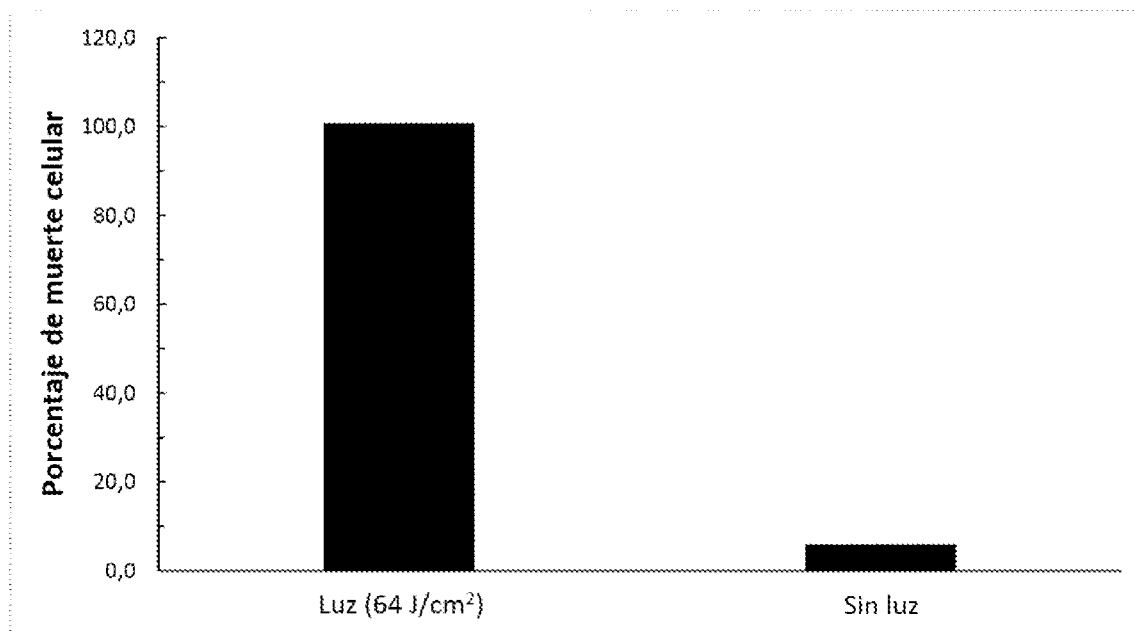


FIG. 15A

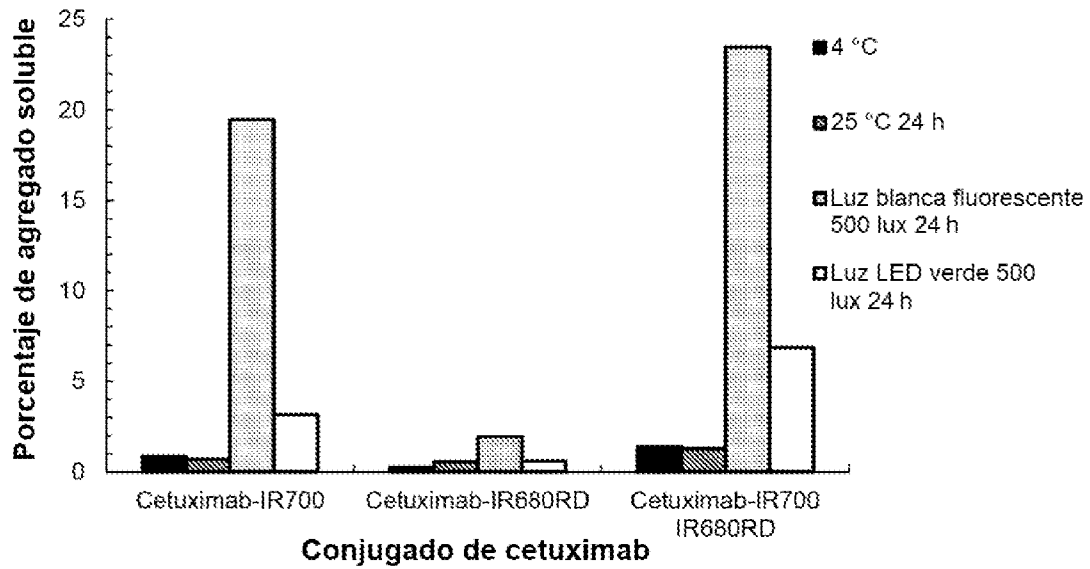


FIG. 15B

