(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 031930 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.03.29

(21) Номер заявки
201591284

(22) Дата подачи заявки
2014.01.30

(51) Int. Cl. ***C07K 19/00*** (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 49/14 (2006.01)

(54) МОЛЕКУЛА СЕЛЕКТИВНОЙ ДОСТАВКИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТКАНИ

(31) **61/758,680**
(32) **2013.01.30**
(33) **US**
(43) **2016.04.29**
(86) **PCT/US2014/013942**
(87) **WO 2014/120974 2014.08.07**

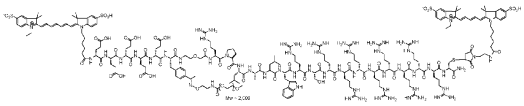
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АВЕЛАС БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Гонзалез Хесус, Лю Цзюньцзе (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(56) US-A1-20050107583
JIANG, TAO, et al., "Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides", PNAS, 21 December 2004, Vol. 101, No. 51, p. 17867-17872. See the whole document
US-A1-20120114563
VAN VLERKEN, LILIAN E. et al., "Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery", Pharmaceutical Research, 29 March 2007, Vol. 24, No. 8, p. 1405-1414. See the whole document
US-A1-20110286915
US-A1-20010021763

(57) В изобретении предлагается молекула селективной доставки в соответствии с SDM-41 для доставки пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань. Также предложены образец злокачественной ткани, содержащий молекулу SDM-41, и способ доставки пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань с использованием молекулы SDM-41.



SDM-41

031930 B1

031930 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет по предварительной патентной заявке США с серийным номером 61/758680, поданной 30 января 2013 г., которая включена в настоящий документ путем отсылки в полном объеме.

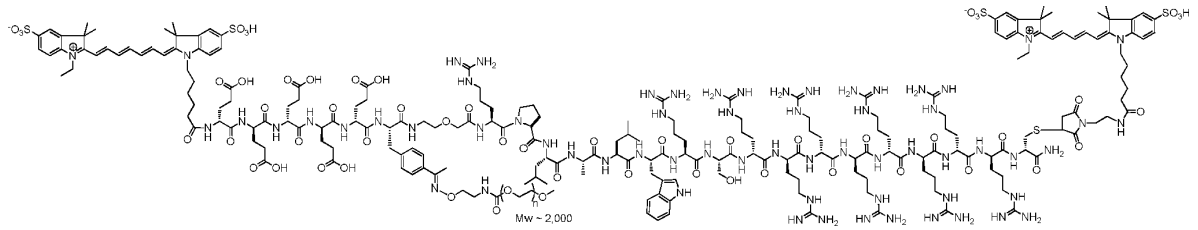
Уровень техники

Документ US 20050107583 A1 (JIANG, TAO et al.) 19 мая 2005 г. можно принять в качестве наиболее близкого аналога настоящего изобретения. Документ US 20050107583 описывает молекулу для транспортировки фрагмента "карго" через клеточную мембрану, причем указанная молекула имеет структуру A-X-B-C, в которой C представляет собой часть, содержащую фрагмент "карго", B представляет собой пептидную часть длиной от около 5 до около 20 основных аминокислот, A представляет собой пептидную часть длиной от около 2 до около 20 кислотных аминокислот и X представляет собой расщепляемый линкер длиной от около 2 до около 100 атомов, соединяющий A с B-C, который может быть расщеплен в физиологических условиях.

Тем не менее, до сих пор существует необходимость в молекулах селективной доставки для направленной доставки визуализирующих агентов в представляющую интерес ткань, в частности злокачественную ткань.

Сущность изобретения

В настоящем документе предлагается молекула селективной доставки в соответствии с SDM-41 для доставки пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань:



SDM-41.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагаются образцы злокачественной ткани, содержащие молекулу, имеющую формулу SDM-41. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы, ткань колоректального рака, ткань сквамозной карциномы, ткань рака кожи, ткань рака предстательной железы, ткань меланомы, ткань рака щитовидной железы, ткань рака яичника или злокачественную ткань лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой злокачественную ткань лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань сквамозной карциномы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака кожи.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагаются способы доставки пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань, включающие приведение злокачественной ткани в контакт с молекулой в соответствии с SDM-41. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы, ткань колоректального рака, ткань сквамозной карциномы, ткань рака кожи, ткань рака предстательной железы, ткань меланомы, ткань рака щитовидной железы, ткань рака яичника или злокачественную ткань лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой злокачественную ткань лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань сквамозной карциномы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака кожи.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагаются способы визуализации злокачественной ткани у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие (a) введение индивидууму молекулы SDM-41 и (b) визуализацию по меньшей мере одного из визуализирующих агентов SDM-41. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы, ткань колоректального рака, ткань сквамозной карциномы, ткань рака кожи, ткань рака предстательной железы, ткань меланомы, ткань рака щитовидной железы, ткань рака яичника или злокачественную ткань лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой злокачественную ткань лимфатических узлов. В некоторых

вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань сквамозной карциномы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака кожи. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает хирургическое удаление злокачественной ткани у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хирургический край, окружающий злокачественную ткань, является уменьшенным. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает подготовку образца ткани, полученного из удаленной злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадирование злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает визуализацию Forsters/резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) между флуоресцирующим фрагментом и гасящим флуоресценцию фрагментом молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает визуализацию визуализирующих агентов при помощи визуализации соотношения эмиссий методом резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). В некоторых вариантах осуществления визуализирующие агенты детектируют при помощи системы камер. В некоторых вариантах осуществления молекула SDM-41 вводится внутривенно. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань визуализируется в ходе операции. В некоторых вариантах осуществления патолог обнаруживает злокачественную ткань на основании визуализации визуализирующих агентов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано, что скорость опосредованного MMP-7 расщепления SDM-41 возрастает при увеличении концентрации SDM-41, что согласуется с кинетикой Михаэлиса-Ментен (пример 2a).

На фиг. 2 представлены изображения донора (слева), акцептора (в середине) и соотношение интенсивностей эмиссии флуоресценции (справа) для SDM-41 (пример 3a).

На фиг. 3 показан график разброса данных по соотношениям интенсивностей эмиссии положительных и отрицательных лимфатических узлов с использованием SDM-41 в мышиной модели метастатических лимфатических узлов (пример 3b).

На фиг. 4 показана ROC-кривая, построенная путем изменения порогового значения, используемого для определения предсказания положительного или отрицательного метастатического потенциала на основании данных по соотношениям интенсивностей эмиссии с использованием SDM-41 в модели метастатических лимфоузлов (пример 3b).

На фиг. 5 показано изменение соотношения величин интенсивностей флуоресценции SDM-41 в гомогенизированной злокачественной ткани (M1120909A2, M1121603A2, M1121797A6) и здоровой ткани (M1120909B2, M1121797B6, M1121603B2) от пациентов с раком молочной железы, индивидуальные кинетические кривые (пример 4). Злокачественная ткань (M112090A2, M1121603A2 и M1121797A6) расщепляет SDM-41 быстрее, чем нормальная ткань (M112090B2, M1121603B2 и M1121797B6).

На фиг. 6 показано, что гомогенизированная злокачественная ткань молочной железы человека расщепляет SDM-41 до более высокой степени (~3-кратно) по сравнению с соседней здоровой тканью, полученной от этого же самого пациента (пример 4).

Подробное описание изобретения

Молекулы селективной доставки (SDM) обеспечивают возможность направленной доставки терапевтических агентов и/или визуализирующих агентов в специфические клетки и/или ткани. В некоторых вариантах осуществления молекулы селективной доставки содержат (a) последовательность, определяющую молекулярный транспорт или удерживание в ткани (часть B); (b) карго-фрагменты (части DA и DB), связанные с частью A, B или X; (c) линкер X; (d) макромолекулярный носитель и (e) кислую последовательность (часть A), которая является эффективной в отношении ингибирования или предотвращения поглощения клетками или удерживания в ткани. В некоторых вариантах осуществления расщепление линкера X, который обеспечивает отделение части A от части B, является эффективным в отношении обеспечения поглощения или удерживания части B и присоединенного карго в клетках или ткани. Однако молекулы селективной доставки могут подвергаться быстрому фармакокинетическому клиренсу с коротким периодом полувыведения из плазмы, широким распределением и медленным вымыванием из множества нецелевых тканей с неспецифическим поглощением. Таким образом, существует потребность в молекуле селективной доставки с увеличенной циркуляцией in vivo, увеличенным накоплением в целевой ткани относительно нецелевой ткани, модулированной селективностью экстравазации и модулированным биораспределением. Что касается визуализирующих средств, существует потребность в повышении контрастности целевой ткани относительно фоновой ткани.

Некоторые определения

Используемые в настоящем документе термины имеют следующие значения, если не указано иное.

Используемый здесь термин "нацеливающая молекула" относится к любому агенту (например, пептиду, белку, полимеру - нуклеиновой кислоте, аптамеру или малой молекуле), который взаимодействует (например, связывается) с представляющей интерес мишенью. Представляющей интерес мишенью может являться ткань, клетка, клеточная структура (например, органелла), белок, пептид, полисахарид или полимер нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая молекула представляет собой любой агент, который взаимодействует (например, связывается) с одной или несколькими злокачественными клетками субъекта.

Термин "PEG" означает полимер полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления PEG является полидисперсным. В некоторых вариантах осуществления PEG является дискретным.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо и относятся к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков. Термины употребляют по отношению к природным аминокислотным полимерам, а также аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой неприродные аминокислоты (например, аминокислотный аналог). Термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки (а именно, антигены), где аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями. Используемый здесь термин "пептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, как правило, от 2 до около 50 остатков в длину. В определенных вариантах осуществления длина пептида варьирует от около 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 или 11 до около 50, 45, 40, 45, 30, 25, 20 или 15 остатков. В определенных вариантах осуществления длина пептида варьирует от около 8, 9, 10, 11 или 12 остатков до около 15, 20 или 25 остатков. Когда в настоящем документе представлена аминокислотная последовательность, предусматриваются также варианты L-, D- или бета аминокислотной последовательности, а также ретро, инверсионные и ретроинверсионные изоформы. Пептиды также включают аминокислотные полимеры, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются синтетическими химическими аналогами соответствующей природной аминокислоты, а также природные аминокислотные полимеры. Кроме того, термин применяется в отношении аминокислот, соединенных пептидной связью или другими модифицированными связями (например, когда пептидная связь заменена α-сложным эфиром, β-сложным эфиром, тиоамидом, фосфонамидом, карбаматом, гидроксилатом и т.п. (см., например, Spatola, (1983), Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins, 7:267-357), когда амид заменен на насыщенный амин (см., например, Skiles et al., патент США № 4496542, который включен в описание путем отсылки, и Kaltenbronn et al., (1990), p. 969-970 в Proc. 11th American Peptide Symposium, ESCOM Science Publishers, The Netherlands, и т.п.).

Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют таким же образом, что и природные аминокислоты. К природным аминокислотам относятся аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, а также аминокислоты, которые впоследствии модифицируются, например гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют сходную основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е. α-атом углерода, связанный с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные остовы пептидов, но сохраняют ту же самую основную химическую структуру, как в природной аминокислоте. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от обычной химической структуры аминокислоты, но которые функционируют сходным образом с природной аминокислотой. Аминокислоты представляют собой D-аминокислоты или L-аминокислоты.

Аминокислоты могут быть названы в настоящем документе либо с помощью общепринятых трехбуквенных обозначений, либо с помощью однобуквенных обозначений, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Специалисты в данной области признают, что отдельные замены, делеции и добавления в пептидную, полипептидную или белковую последовательность, которые изменяют, добавляют или удаляют отдельную аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности, представляют собой "консервативно модифицированный вариант", в котором изменение приводит к замене аминокислоты на химически схожую аминокислоту. В данной области хорошо известны таблицы консервативных замен, которые обеспечивают функционально схожие аминокислоты. Такие консервативно модифицированные варианты представляют собой дополнения и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели согласно изобретению.

Используемый здесь термин "метка" относится к молекуле, которая содействует визуализации и/или детекции нацеливающей молекулы, раскрытой здесь. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой флуоресцентную метку.

Выражение "специфически связывается" в отношении взаимодействия между нацеливающей молекулой, раскрытой здесь, и мишенью (например, очищенным белком, злокачественными клетками или злокачественной тканью, опухолью или метастатическим поражением, метастазами, или лимфатическим узлом или метастатическим лимфатическим узлом) относится к формированию высокоаффинной связи между нацеливающей молекулой и мишенью. Кроме того, термин означает, что нацеливающая молекула обладает низкой аффинностью в отношении не мишеней.

Термины "селективное связывание", "селективность" и им подобные относятся к преимущественному взаимодействию агента с одной молекулой по сравнению с другой. Предпочтительно взаимодействия между нацеливающей молекулой, описанной здесь, и мишенью являются как специфическими, так и селективными. Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления агент разработан для "спе-

цифического связывания" и "селективного связывания" двух разных, но сходных мишеней без связывания с другими нежелательными мишенями.

Термины "индивидуум", "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяемо. Используемые здесь указанные термины обозначают любое млекопитающее (т.е. виды любых порядков, семейств и родов в пределах таксономической группы животных: хордовые:позвоночные:млекопитающие). В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек. Ни один из терминов не требует или не ограничивается ситуацией, характеризующейся контролем (например, постоянным или периодическим) со стороны медицинского работника (например, врача, дипломированной медицинской сестры, медицинской сестры высшей квалификации, помощника врача, вспомогательного персонала или работника госпиталя).

Используемые здесь термины "ввести", "вводить", "введение" и им подобные относятся к способам, которые могут быть использованы для осуществления доставки агентов или композиций в желательный участок биологического действия. Эти способы включают, но без ограничения, парентеральное введение (например, внутривенное, подкожное, интраперитонеальное, внутримышечное, внутрисосудистое, интратекальное, интравитреальное, инфузионное или местное). Методики введения, которые необязательно используют с агентами и способами, описанными здесь, включают, например, описанные в руководстве Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, current ed.; Pergamon; and Remington's, Pharmaceutical Sciences (current edition), Mack Publishing Co., Easton, Pa.

Термин "фармацевтически приемлемый", используемый здесь, относится к материалу, который не оказывает влияния на биологическую активность или свойства агентов, описанных здесь, и является относительно нетоксичным (т.е. токсичность материала значительно превосходит пользу материала). В некоторых случаях фармацевтически приемлемый материал можно вводить индивидууму без вызывания значительных нежелательных биологических эффектов или значительного взаимодействия пагубным образом с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

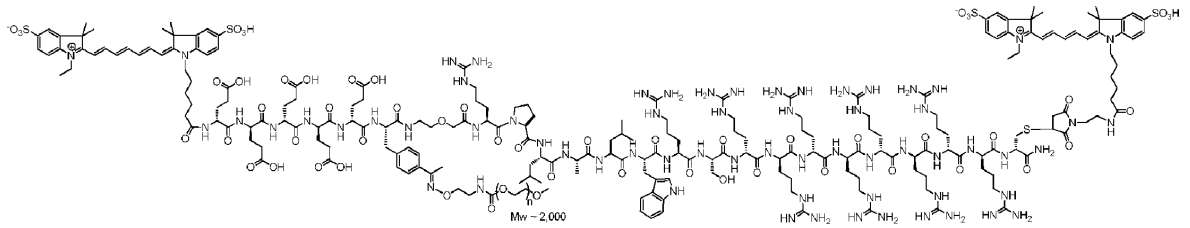
Термин "хирургическая операция", используемый здесь, относится к любому способу, который может быть использован для исследования, манипуляции, изменения или вызывания эффекта в ткани путем физического вмешательства. Эти способы включают, но не ограничиваются, открытое хирургическое вмешательство, эндоскопическую хирургию, лапароскопическую хирургию, малоинвазивную хирургию, роботизированную хирургию и любые процедуры, которые могут воздействовать на злокачественную ткань, такие как резекция опухоли, абляция злокачественной ткани, стадирование рака, диагностика рака, стадирование лимфоузлов, детекция сторожевых лимфоузлов или терапия рака.

Термин "направленная хирургия", используемый здесь, относится к любой хирургической процедуре, в которой хирург использует визуализирующий агент для направления хирургической операции.

Термин "рак", используемый здесь, относится к любому заболеванию, связанному с неконтролируемым ростом или пролиферацией клеток в организме человека. Рак может дополнительно характеризоваться способностью клеток к миграции из первичного участка и распространению в отдаленные участки (т.е. метастазированию). Рак может представлять собой саркому, карциному, лимфому, лейкоз, бластому или герминогенные опухоли. Рак может возникать в различных тканях, включая, но без ограничения, легкие, молочную железу, яичники, толстую кишку, пищевод, прямую кишку, кости, предстательную железу, мозг, поджелудочную железу, мочевой пузырь, почки, печень, клетки крови, лифоузлы, щитовидную железу, кожу и желудок.

Молекулы селективной доставки

В настоящем документе предлагается молекула селективной доставки в соответствии с SDM-41:



Молекула селективной доставки SDM-41 подпадает под формулу I, имеющую структуру

$$[c_M\text{-}M]\text{-}[[D_A\text{-}c_A]\text{-}(A\text{-}X\text{-}B)\text{-}[c_B\text{-}D_B]]$$

Формула I,

в которой X представляет собой расщепляемый линкер;

A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 9 кислых аминокислот;

B представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 7 до 9 основных аминокислот;

c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 0-1 аминокислоту;

M представляет собой полимер полиэтиленгликоль (PEG);

каждый D_A и D_B независимо представляет собой визуализирующий агент;

$[c_M\text{-}M]$ присоединен в любом положении на A или X;

[D_A-c_A] присоединен к любой аминокислоте на A или X;

[c_B-D_B] присоединен к любой аминокислоте на B.

В некоторых вариантах осуществления A и B не содержат одинакового числа кислых и основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления число основных аминокислот в B больше, чем число кислых аминокислот в A. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой пептид, содержащий от 5 до 9 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления B представляет собой пептид, содержащий 8 или 9 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой пептид, содержащий 5 или 9 последовательных глутаматов, и B представляет собой пептид, содержащий 8 или 9 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления A представляет собой пептид, содержащий 5 последовательных глутаматов, и B представляет собой пептид, содержащий 8 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо представляет собой 0-1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо выбран из природной аминокислоты или неприродной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо выбран из D-аминокислоты, L-аминокислоты, α-аминокислоты, β-аминокислоты или γ-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо выбран из любой аминокислоты, содержащей свободную тиольную группу, любой аминокислоты, содержащей N-концевую аминогруппу, и любой аминокислоты с боковой цепью, способной формировать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо выбран из D-цистеина, D-глутамата, лизина и пара-4-ацетил-L-фенилаланина. В некоторых вариантах осуществления c_B представляет собой любую аминокислоту, содержащую свободную тиольную группу. В некоторых вариантах осуществления c_B представляет собой D-цистеин. В некоторых вариантах осуществления c_A представляет собой любую аминокислоту, содержащую N-концевую аминогруппу. В некоторых вариантах осуществления c_A представляет собой D-глутамат. В некоторых вариантах осуществления c_A представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления c_M представляет собой любую аминокислоту с боковой цепью, способной формировать оксимовую или гидрозоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В некоторых вариантах осуществления c_M представляет собой пара-4-ацетил-L-фенилаланин. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется протеазой. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется матриксной металлопротеиназой. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность, которая расщепляется MMP2, MMP7, MMP9 или MMP14. В некоторых вариантах осуществления X содержит пептидную связь. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность, выбранную из PLGLAG, PLG-C(me)-AG, RPLALWRS, ESPAYYTA, DPRSFL, PPRSFL, RLQLKL и RLQLK(Ac). В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность PLGLAG. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность PLG-C(me)-AG. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность RPLALWRS. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность DPRSFL. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность PPRSFL. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность RLQLKL. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность RLQLK(Ac). В некоторых вариантах осуществления D_A и D_B представляют собой пару донорного и акцепторного флуоресцентных фрагментов, между которым может происходить Forsters/резонансный перенос энергии. В некоторых вариантах осуществления D_A и D_B представляют собой Cy5 и Cy7. В некоторых вариантах осуществления D_A и D_B представляют собой Cy5 и IRDye750. В некоторых вариантах осуществления D_A и D_B представляют собой Cy5 и IRDye800. В некоторых вариантах осуществления D_A и D_B представляют собой Cy5 и ICG. В некоторых вариантах осуществления D_A и D_B представляют собой флуоресцирующий фрагмент и гасящий флуоресценцию фрагмент.

Часть A.

В некоторых вариантах осуществления A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 2 до 20 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть A содержит от около 2 до около 20 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть A содержит от около 5 до около 20 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую от 5 до 9 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую от 5 до 8 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую от 5 до 7 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 5 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 6 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 7 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 8 кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 9 кислых аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 2 до около 20 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 5 до около 20 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 9 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 8 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 7 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 5 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 6 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 7 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 8 последовательных кислых аминокислот. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 9 последовательных кислых аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 2 до около 20 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 5 до около 20 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 9 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 8 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 7 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 5 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 6 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 7 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 8 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 9 кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 2 до около 20 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 5 до около 20 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 9 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 8 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 7 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 6 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 7 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 8 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 9 последовательных кислых аминокислот, выбранных из аспартатов и глутаматов.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 2 до около 20 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 5 до около 20 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 9 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 8 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 7 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 5 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 6 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 7 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 8 глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 9 глутаматов.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 2 до около 20 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть А содержит от около 5 до около 20 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 9 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 8 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 7 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления А имеет последовательность, содержащую 5 последовательных

глутаматов. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 6 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 7 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 8 последовательных глутаматов. В некоторых вариантах осуществления A имеет последовательность, содержащую 9 последовательных глутаматов.

В некоторых вариантах осуществления часть A содержит 5 последовательных глутаматов (т.е. EEEEE или eeeee). В некоторых вариантах осуществления часть A содержит 9 последовательных глутаматов (т.е. EEEEEEEEE или eeeeeeeee).

Кислая часть A может включать аминокислоты, которые не являются кислыми. Кислая часть A может содержать другие фрагменты, такие как отрицательно заряженные фрагменты. В вариантах осуществления молекулы селективной доставки, описанной здесь, кислая часть A может представлять собой отрицательно заряженную часть, предпочтительно содержащую от около 2 до около 20 отрицательных зарядов при физиологическом значении pH, которая не включает аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления величина отрицательного заряда в части A является приблизительно такой же, как величина положительного заряда в части B. В некоторых вариантах осуществления величина отрицательного заряда в части A отличается от величины положительного заряда в части B. В некоторых вариантах осуществления наблюдается улучшенное поглощение в ткани молекулы селективной доставки, при этом величина отрицательного заряда в части A отличается от величины положительного заряда в части B. В некоторых вариантах осуществления наблюдается улучшенная растворимость молекулы селективной доставки, при этом величина отрицательного заряда в части A отличается от величины положительного заряда в части B. В некоторых вариантах осуществления наблюдается более быстрое поглощение в ткани молекулы селективной доставки, при этом величина отрицательного заряда в части A отличается от величины положительного заряда в части B. В некоторых вариантах осуществления наблюдается более высокое поглощение в ткани молекулы селективной доставки, при этом величина отрицательного заряда в части A отличается от величины положительного заряда в части B.

Часть A представляет собой L-аминокислоты или D-аминокислоты. В вариантах осуществления изобретения D-аминокислоты являются предпочтительными для сведения к минимуму иммуногенности и неспецифического расщепления фоновыми пептидазами или протеазами. Известно, что клеточное поглощение последовательностей олиго-D-аргинина является таким же удовлетворительным или лучше по сравнению с олиго-L-аргининами.

Будет понятно, что часть A может включать нестандартные аминокислоты, такие как, например, гидроксилизин, десмозин, изодесмозин или другие нестандартные аминокислоты. Часть A может включать модифицированные аминокислоты, включая посттрансляционно модифицированные аминокислоты, такие как, например, метилированные аминокислоты (например, метилгистидин, метилированные формы лизина и т.д.), ацетилированные аминокислоты, амидированные аминокислоты, формилированные аминокислоты, гидроксилированные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты или другие модифицированные аминокислоты. Часть A также может включать фрагменты пептидомиметиков, включая части, связанные непептидными связями, и аминокислоты, связанные или присоединенные к неаминокислотным частям.

Молекулы селективной доставки, раскрытые здесь, являются эффективными, когда A находится на аминоконце или когда A находится на карбоксиконце, т.е. любая ориентация пептидных связей является допустимой.

Часть B.

В некоторых вариантах осуществления B представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 15 основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 20 основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 12 основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 9 основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 8 основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 9 основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 8 основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 7 основных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 20 последовательных основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 12 последовательных основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 9 последовательных основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 8 последовательных основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 9 последовательных основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 8 последовательных основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 7 последовательных основных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 20 основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 12 основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 9 основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 8 основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 9 основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 8 основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 7 основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 20 последовательных основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 12 последовательных основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 9 последовательных основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 8 последовательных основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 9 последовательных основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 8 последовательных основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 7 последовательных основных аминокислот, выбранных из аргининов, гистидинов и лизинов.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 20 аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 12 аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 9 аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 8 аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 9 аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 8 аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 7 аргининов.

В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 20 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 5 до около 12 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 9 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит от около 7 до около 8 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 9 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 8 последовательных аргининов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть B содержит 7 последовательных аргининов.

Основная часть B может включать аминокислоты, которые не являются основными. Основная часть B может содержать другие фрагменты, такие как положительно заряженные фрагменты. В некоторых вариантах осуществления основная часть B может представлять собой положительно заряженную часть, предпочтительно имеющую от около 5 до около 20 положительных зарядов при физиологическом значении pH, которая не включает аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления величина негативного заряда в части A приблизительно равна величине положительного заряда в части B. В некоторых вариантах осуществления величина отрицательного заряда в части A отличается от величины положительного заряда в части B.

Часть B представляет собой L-аминокислоты или D-аминокислоты. В вариантах осуществления изобретения D-аминокислоты являются предпочтительными для сведения к минимуму иммуногенности и неспецифического расщепления фоновыми пептидазами или протеазами. Известно, что клеточное поглощение последовательностей олиго-D-аргинина является таким же удовлетворительным или лучше по сравнению с олиго-L-аргининами.

Будет понятно, что часть B может включать нестандартные аминокислоты, такие как, например, гидроксилизин, десмозин, изодесмозин, или другие нестандартные аминокислоты. Часть B может включать модифицированные аминокислоты, включая посттрансляционно модифицированные аминокислоты, такие как, например, метилированные аминокислоты (например, метилгистидин, метилированные формы лизина и т.д.), ацетилированные аминокислоты, амидированные аминокислоты, формилированные аминокислоты, гидроксилированные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты или другие модифицированные аминокислоты. Часть B может также включать фрагменты пептидомиметиков, включая части, связанные непептидными связями, и аминокислоты, связанные или присоединенные к неаминокислотным частям.

В вариантах осуществления, в которых X представляет собой пептид, расщепляемый протеазой, может быть предпочтительно соединить C-конец X с N-концом B таким образом, чтобы новый амино-

конец, образовавшийся в результате расщепления X, вносил дополнительный положительный заряд, который увеличивает положительные заряды, уже присутствующие в B.

Группа для конъюгирования (c).

В некоторых вариантах осуществления карго (например, D_A и D_B) и макромолекулярные носители (M) присоединены опосредованно к A-X-B.

В некоторых вариантах осуществления карго (например, D_A и D_B) и макромолекулярные носители (M) присоединены напрямую к A-X-B с помощью группы для конъюгирования (c_A, c_B и c_M). В некоторых вариантах осуществления карго (например, D_A и D_B) и макромолекулярные носители (M) присоединены опосредованно к A-X-B с помощью реакционноспособной группы для конъюгирования (c_A, c_B и c_M). В некоторых вариантах осуществления карго (например, D_A и D_B) и макромолекулярные носители (M) присоединены опосредованно к A-X-B с помощью ортогонально ориентированной реакционноспособной группы для конъюгирования (c_A, c_B и c_M). В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 0-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 2 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 3 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 4 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 5 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой 10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления c_A, c_B и c_M независимо представляют собой дериватизированную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления множество карго (D) присоединено к группе для конъюгирования - дериватизированной аминокислоте.

В некоторых вариантах осуществления группа для конъюгирования содержит лиганд рецептора.

В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо содержит природную аминокислоту или неприродную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо содержит D-аминокислоту, L-аминокислоту, α-аминокислоту, β-аминокислоту или γ-аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо содержит любую аминокислоту, имеющую свободную тиольную группу, любую аминокислоту, имеющую свободную аминогруппу, любую аминокислоту, имеющую N-концевую аминогруппу, и любую аминокислоту с боковой цепью, способной формировать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо содержит D-цистеин, D-глутамат, лизин и пара-4-ацетил-L-фенилаланин. В некоторых вариантах осуществления c_B содержит любую аминокислоту, имеющую свободную тиольную группу. В некоторых вариантах осуществления c_B содержит D-цистеин. В некоторых вариантах осуществления c_A содержит любую аминокислоту, имеющую N-концевую аминогруппу. В некоторых вариантах осуществления c_A содержит D-глутамат. В некоторых вариантах осуществления c_A содержит лизин. В некоторых вариантах осуществления c_A содержит любую аминокислоту с боковой цепью, способной формировать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В некоторых вариантах осуществления c_A содержит пара-4-ацетил-L-фенилаланин.

В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо выбран из природной аминокислоты или неприродной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо выбран из D-аминокислоты, L-аминокислоты, α-аминокислоты, β-аминокислоты и γ-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо представляет собой любую аминокислоту, имеющую свободную тиольную группу, любую аминокислоту, имеющую свободную аминогруппу, любую аминокислоту, имеющую N-концевую аминогруппу, и любую аминокислоту с боковой цепью, способной формировать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В некоторых вариантах осуществления каждый c_A, c_B и c_M независимо выбран из D-цистеина, D-глутамата, лизина и пара-4-ацетил-L-фенилаланина. В некоторых вариантах осуществления c_B представляет собой любую аминокислоту, имеющую свободную тиольную группу. В некоторых вариантах осуществления c_B представляет собой D-цистеин. В некоторых вариантах осуществления c_A представляет собой любую аминокислоту, имеющую N-концевую аминогруппу. В некоторых вариантах осуществления c_A представляет собой D-глутамат. В некоторых вариантах осуществления c_A представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления c_M представляет собой любую аминокислоту с боковой цепью, способной формировать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В некоторых вариантах осуществления c_M представляет собой пара-4-ацетил L-фенилаланин.

Карго (D).

Визуализирующие агенты.

В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент представляет собой краситель. В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент представляет собой флуоресцентный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления флуоресцентный фрагмент выбран из флуоресцентного белка, флуоресцентного пептида, флуоресцентного красителя, флуоресцентного материала или их комбинации.

Все флуоресцентные фрагменты охвачены термином "флуоресцентный фрагмент". Специфические примеры флуоресцентных фрагментов, представленные здесь, являются иллюстративными и не ограничивают флуоресцентные фрагменты, предназначенные для использования с раскрытыми здесь направленно воздействующими молекулами.

Примеры флуоресцентных красителей включают, но без ограничения, ксантены (например, родамины, родолы и флуоресцеины, а также их производные); биманы; кумарины и их производные (например, умбеллиферон и аминометил-кумарины); ароматические амины (например, дансил; красители на основе квадратной кислоты); бензофураны; флуоресцентные цианины; индокарбоцианины; карбазолы; дицианометилен-пираны; полиметин; оксабензантран; ксантен; пирилиум; карбостил; перилен; акридон; хинакридон; рубрен; антрацен; коронен; фенантрецен; пирен; бутадиен; стилбен; порфирин; фталоцианин; хелатные комплексы с металлом лантанидом; хелатные комплексы с редкоземельными металлами; и производные таких красителей.

Примеры флуоресцеиновых красителей включают, но без ограничения, 5-карбоксифлуоресцеин, флуоресцеин-5-изотиоцианат, флуоресцеин-6-изотиоцианат и 6-карбоксифлуоресцеин.

Примеры родаминовых красителей включают, но без ограничения, тетраметилродамин-6-изотиоцианат, 5-карбокситетраметилродамин, 5-карбоксиродоловые производные; тетраметил- и тетраэтилродамин, дифенилдиметил- и дифенилдиэтилродамин, динафтилродамин, родамина 101 сульфонилхлорид (реализуемый под торговым названием TEXAS RED®).

Примеры цианиновых красителей включают, но без ограничения, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, IRDYE680, Alexa Fluor 750, IRDye800CW, ICG.

Примеры флуоресцентных пептидов включают зеленый флуоресцентный белок GFP (Green Fluorescent Protein) или производные GFP (например, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, ECFP, Cerulean, CyPet, YFP, Citrine, Venus, YPet).

Флуоресцентные метки могут быть обнаружены любым подходящим способом. Например, детекцию флуоресцентной метки можно проводить путем возбуждения флуорохрома соответствующей длиной световой волны и детекции полученной флуоресценции, например, с помощью флуоресцентного микроскопа, визуально, посредством фотографической пленки, с использованием электронных детекторов, таких как приборы с зарядовой связью (CCD), фотоумножители, и т.п.

В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент мечен позитронно-активным изотопом (например, ^{18}F) для позитронно-эмиссионной томографии (PET), испускающим гамма-излучение изотопом (например, ^{99m}Tc) для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT), или парамагнитной молекулой или наночастицей (например, хелатом Gd^{3+} или покрытой наночастицей магнетита) для магнитно-резонансной визуализации (MRI).

В некоторых вариантах осуществления визуализирующей агент мечен хелатом гадолиния, частицей оксида железа, супермагнитной частицей оксида железа, сверхмалой парамагнитной частицей, агентом, содержащим хелат марганца или галлий.

Примеры хелатов гадолиния включают, но без ограничения, диэтилентриамин-пентауксусную кислоту (DTPA), 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA) и 1,4,7-триазациклононан-N,N',N"-триуксусную кислоту (NOTA).

В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент представляет собой флуорофор ближнего инфракрасного диапазона для визуализации в ближнем инфракрасном (ближнем ИК) диапазоне, люциферазу (светлячков, бактерий или кишечнополостных) или другую люминесцентную молекулу для биолюминесцентной визуализации, или наполненные перфторуглеродом везикулы для ультразвукового исследования.

В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент представляет собой ядерный зонд. В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент представляет собой радионуклидный зонд для SPECT или PET. В некоторых вариантах осуществления радионуклидный зонд выбран из хелата технеция, хелата меди, радиоактивного фтора, радиоактивного йода и хелата индия.

Примеры хелатов Tc включают, но без ограничения, HYNIC, DTPA и DOTA.

В некоторых вариантах осуществления визуализирующий агент содержит радиоактивный фрагмент, например радиоактивный изотоп, такой как ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{64}Cu, радиоактивные изотопы Lu и др.

В некоторых вариантах осуществления молекулу селективной доставки в соответствии с формулой I, содержащую визуализирующий агент, используют в направленной хирургии. В некоторых вариантах осуществления молекулу селективной доставки преимущественно локализуют в злокачест-

венные или другие нежелательные ткани (т.е. некротические ткани). В некоторых вариантах осуществления молекулу селективной доставки в соответствии с формулой I, содержащую визуализирующий агент, используют в направленной хирургии для удаления колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления направленная хирургия, использующая молекулу селективной доставки, обеспечивает минимальное удаление здоровой ткани (т.е. незлокачественную) хирургом, насколько это возможно. В некоторых вариантах осуществления направленная хирургия, использующая молекулу селективной доставки, обеспечивает визуализацию и удаление большего количества злокачественной ткани хирургом по сравнению с удалением без присутствия молекулы селективной доставки. В некоторых вариантах осуществления хирургия представляет собой хирургию под контролем флуоресценции.

Макромолекулярные носители (M).

Термин "носитель" означает инертную молекулу, которая модулирует период полувыведения из плазмы, растворимость или биораспределение. В некоторых вариантах осуществления носитель модулирует период полувыведения из плазмы молекулы селективной доставки, раскрытой здесь. В некоторых вариантах осуществления носитель модулирует растворимость молекулы селективной доставки, раскрытой здесь. В некоторых вариантах осуществления носитель модулирует биораспределение молекулы селективной доставки, раскрытой здесь.

В некоторых вариантах осуществления носитель уменьшает поглощение молекулы селективной доставки нецелевыми клетками или тканями. В некоторых вариантах осуществления носитель уменьшает поглощение молекулы селективной доставки в хрящах. В некоторых вариантах осуществления носитель уменьшает поглощение молекулы селективной доставки в суставах по сравнению с тканью-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления носитель увеличивает поглощение молекулы селективной доставки целевыми клетками или тканями. В некоторых вариантах осуществления носитель уменьшает поглощение молекулы селективной доставки в печени по сравнению с тканью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления носитель уменьшает поглощение молекулы селективной доставки в почках. В некоторых вариантах осуществления носитель усиливает поглощение в злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления носитель усиливает поглощение в лимфатических протоках и/или лимфатических узлах.

В некоторых вариантах осуществления носитель увеличивает период полувыведения из плазмы путем снижения клубочковой фильтрации. В некоторых вариантах осуществления носитель модулирует период полувыведения из плазмы путем увеличения или уменьшения метаболизма или деградации протеазами. В некоторых вариантах осуществления носитель увеличивает поглощение опухолью за счет эффектов повышенной проницаемости и удерживания (EPR) сосудистой сети опухоли. В некоторых вариантах осуществления носитель увеличивает водную растворимость молекулы селективной доставки.

В некоторых вариантах осуществления любой M, независимо, прямо или непрямо (например, посредством c_M) присоединен к A, B или X. В некоторых вариантах осуществления любой M, независимо, присоединен к A на н-концевом полиглутамате. В некоторых вариантах осуществления любой M, независимо, присоединен к A (или н-концевому полиглутамату) с помощью ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления любой M, независимо, присоединен к B на с-концевом полиаргинине. В некоторых вариантах осуществления любой M, независимо, присоединен к B (или с-концевому полиаргинину) с помощью ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления любой M, независимо, прямо или непрямо присоединен к линкерам между X и A, X и B, B и C/N-концом, и A и C/N-концом. В некоторых вариантах осуществления ковалентная связь включает эфирную связь, тиоэфирную связь, амидную связь, оксимовую связь, углерод-углеродную связь, углерод-азотную связь, углерод-кислородную связь или углерод-серную связь.

В некоторых вариантах осуществления M выбран из белка, синтетического или природного полимера, или дендримера. В некоторых вариантах осуществления M выбран из декстрана, полимера PEG (например, PEG 0,5 кДа, PEG 2 кДа, PEG 5 кДа, PEG 12 кДа, PEG 20 кДа, PEG 30 кДа и PEG 40 кДа), альбумина или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления M представляет собой полимер PEG.

В некоторых вариантах осуществления размер M составляет от 50 до 70 кДа.

В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с альбумином. В определенных случаях альбумин исключен из клубочкового фильтрата в нормальных физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки содержит реакционноспособную группу, такую как малеимид, которая может формировать ковалентный конъюгат с альбумином. Молекула селективной доставки, содержащая альбумин, вызывает усиление накопления в опухолях расщепленных молекул селективной доставки зависимым от расщепления образом. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты альбумина обладают удовлетворительными фармакокинетическими свойствами.

В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами. В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами, имеющими среднюю молекулярную массу приблизительно 0,5 кДа (PEG 0,5 кДа). В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами,

имеющими среднюю молекулярную массу приблизительно 1 кДа (PEG 1 кДа). В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами, имеющими среднюю молекулярную массу приблизительно 2 кДа (PEG 2 кДа). В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами, имеющими среднюю молекулярную массу приблизительно 5 кДа (PEG 5 кДа). В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами, имеющими среднюю молекулярную массу приблизительно 10 кДа (PEG 10 кДа). В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами, имеющими среднюю молекулярную массу приблизительно 12 кДа (PEG 12 кДа). В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами, имеющими среднюю молекулярную массу приблизительно 20 кДа (PEG 20 кДа). В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с PEG-полимерами, имеющими среднюю молекулярную массу приблизительно 30 кДа (PEG 30 кДа). В некоторых вариантах осуществления молекулы селективной доставки, конъюгированные с PEG 30 кДа, имели более длинный период полувыведения по сравнению со свободными пептидами. В некоторых вариантах осуществления молекулы селективной доставки конъюгированы с PEG-полимерами, имеющими среднюю молекулярную массу от около 20 до около 40 кДа, которые имеют печеночный и почечный клиренс.

В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с декстраном. В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с декстраном 70 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты декстрана, представляющие смесь молекулярных масс, трудно синтезировать и очищать воспроизводимым образом.

В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована со стрептавидином.

В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки конъюгирована с пятым поколением дендримера PAMAM.

В некоторых вариантах осуществления носитель является кэпированным. В некоторых вариантах осуществления кэпирование носителя улучшает фармакокинетику и уменьшает цитотоксичность носителя путем добавления гидрофильности. В некоторых вариантах осуществления кэп выбран из следующего: ацетил, сукцинил, 3-гидроксипропионил, 2-сульфобензоил, глицидил, PEG-2 кДа, PEG-4 кДа, PEG-8 кДа и PEG-12 кДа.

Часть X (линкеры).

В некоторых вариантах осуществления линкер, состоящий из одной или нескольких аминокислот, используют для соединения пептидной последовательности A (т.е. последовательности, разработанной для ингибирования доставляющего действия пептида B) и пептидной последовательности B. В целом, пептидный линкер не обладает специфической биологической активностью, кроме соединения молекул или сохранения между ними некоторого минимального расстояния или другого пространственного расположения. Однако входящие в состав линкера аминокислоты могут быть выбраны для воздействия на некоторые свойства молекулы, такие как сворачивание, суммарный заряд или гидрофобность.

В живых клетках интактная молекула селективной доставки, раскрытая здесь, может быть неспособна входить в клетку из-за присутствия части A. Таким образом, строго внутриклеточный процесс для расщепления X будет неэффективным для расщепления X в здоровых клетках, так как часть A, предотвращающая поглощение клетками, не будет эффективно расщепляться внутриклеточными ферментами в здоровых клетках, поскольку не будет поглощаться и не будет получать доступа к таким внутриклеточным ферментам. Однако, когда клетка является поврежденной или больной (например, злокачественные клетки, гипоксические клетки, ишемические клетки, апоптотические клетки, некротические клетки), такие внутриклеточные ферменты "просачиваются" из клетки и происходит расщепление A, обеспечивая вхождение части B и/или карго в клетку, осуществляя направленную доставку части B и/или карго D в соседние клетки. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется во внеклеточном пространстве.

В определенных случаях капилляры вокруг опухолей и других участков поражения являются проницаемыми. В некоторых вариантах осуществления проницаемые капилляры усиливают способность высокомолекулярных молекул (например, с молекулярной массой около 30 кДа или выше) достигать интерстициального компартмента. В некоторых вариантах осуществления линкер X расщепляется в непосредственной близости от злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления клетки, которые не экспрессируют релевантную протеазу, но которые находятся в непосредственной близости от клеток, экспрессирующих релевантную протеазу, захватывают карго из молекулы селективной доставки, так как связывание линкера X обычно является внеклеточным. В некоторых вариантах осуществления такое неспецифическое нацеливание является эффективным при лечении опухолей благодаря гетерогенности клеток по фенотипу и стремлению устранить как можно более высокий процент подозрительных клеток.

В некоторых вариантах осуществления X представляет собой расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления линкер является гибким. В некоторых вариантах осуществления линкер является жестким.

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет линейную структуру. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет нелинейную структуру. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет разветвленную структуру. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет циклическую структуру.

В некоторых вариантах осуществления X составляет от около 6 до около 30 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 6 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 8 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 10 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 12 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 14 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 16 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 18 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 20 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 25 атомов в длину. В некоторых вариантах осуществления X составляет около 30 атомов в длину.

В некоторых вариантах осуществления линкер связывает пептидную часть A (т.е. пептидную последовательность, которая предотвращает клеточное поглощение) с пептидной частью B (т.е. доставляющей последовательностью) с помощью ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления ковалентная связь включает эфирную связь, тиоэфирную связь, аминную связь, амидную связь, оксимовую связь, гидразоновую связь, углерод-углеродную связь, углерод-азотную связь, углерод-кислородную связь или углерод-серную связь.

В некоторых вариантах осуществления X содержит пептидную связь. Пептидная связь включает L-аминокислоты и/или D-аминокислоты. В вариантах осуществления изобретения D-аминокислоты являются предпочтительными для сведения к минимуму иммуногенности и неспецифического расщепления фоновыми пептидазами или протеазами. Известно, что поглощение клетками последовательностей олиго-D-аргинина является таким же удовлетворительным или лучше, чем олиго-L-аргининов.

В некоторых вариантах осуществления линкер X разработан для расщепления в присутствии конкретных условий или в конкретной среде. В предпочтительных вариантах осуществления линкер X расщепляется в физиологических условиях. Расщепление такого линкера X может быть, например, усилено или может быть вызвано конкретными патологическими сигналами или конкретной средой, относящейся к клеткам, в которых желательна доставка карго. Разработка линкера X для расщепления под действием специфических условий, например, специфического фермента, позволяет нацеливать клеточное поглощение в специфическое местоположение, где получены такие условия. Таким образом, одним важным путем, посредством которого молекулы селективной доставки обеспечивают специфическое нацеливание клеточного поглощения на желательные клетки, ткани или области, является разработка линкерной части X, которая расщепляется под действием условий вблизи таких целевых клеток, тканей или областей.

В некоторых вариантах осуществления X представляет собой pH-чувствительный линкер. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется в условиях щелочного pH. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется в условиях кислого pH. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется протеазой, матриксной металлопротеазой или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется восстанавливающим агентом. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется окислительным агентом.

В некоторых вариантах осуществления X расщепляется MMP. Гидролитическая активность матриксных металлопротеиназ (MMP) вовлечена в инвазию и миграцию метастатических опухолевых клеток. В определенных случаях MMP обнаруживаются вблизи участков воспаления. В определенных случаях MMP обнаруживаются вблизи участков инсульта (т.е. заболевания, характеризующегося повреждением мозга в результате снижения кровотока). Таким образом, молекулы, обладающие отличительными признаками по изобретению, способны направить клеточное поглощение карго (по меньшей мере один фрагмент D) в специфические клетки, ткани или области, содержащие активные MMP во внеклеточном пространстве. В некоторых вариантах осуществления X содержит аминокислотную последовательность, выбранную из PLG-C(Me)-AG (SEQ ID NO: 1), PLGLAG (SEQ ID NO: 2) или RPLALWRS (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления X расщепляется ферментами металлопротеиназами, выбранными из MMP-2, MMP-9 или MMP-7 (MMP, вовлеченными в рак и воспаление). В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется MMP-2. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется MMP-9. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется MMP-7.

В некоторых вариантах осуществления X расщепляется протеолитическими ферментами или в восстановительной среде, которые могут обнаруживаться вблизи злокачественных клеток. Такая среда или такие ферменты обычно не обнаруживаются вблизи нормальных клеток.

В некоторых вариантах осуществления X расщепляется серинпротеазами, включая, но без ограничения, тромбин и катепсины. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется под действием катепсина K, катепсина S, катепсина D, катепсина E, катепсина W, катепсина F, катепсина A, катепсина C, катепсина H, катепсина Z или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления X расщепляется под действием катепсина K и/или катепсина S.

В некоторых вариантах осуществления X расщепляется в тканях или около тканей, страдающих гипоксией. В некоторых вариантах осуществления расщепление в гипоксических тканях или около них позволяет направленно воздействовать на злокачественные клетки и злокачественные ткани, области инфаркта и другие гипоксические области. В некоторых вариантах осуществления X содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления линкер, содержащий дисульфидную связь, преимущественно расщепляется в гипоксических областях и, таким образом, направляет доставку карго в клетки в такой области. Гипоксия, по-видимому, делает злокачественные клетки более устойчивыми к воздействию лучевой и химиотерапии, а также инициирует ангиогенез. В гипоксической среде в присутствии, например, проницаемых или некротических клеток свободные тиолы и другие восстановительные агенты становятся доступными внеклеточно, тогда как O_2, который обычно сохраняет внеклеточную среду окисленной, является в сущности истощенным. В некоторых вариантах осуществления этот сдвиг в окислительно-восстановительном балансе способствует уменьшению и расщеплению дисульфидной связи в пределах линкера X. Дополнительно к дисульфидным связям, которые извлекают выгоду из тиол-дисульфидного равновесия, в линкере X, разработанном для расщепления в гипоксической среде, используются связи, включая хиноны, которые распадаются при восстановлении до гидрохинонов.

В некоторых вариантах осуществления X расщепляется в некротической среде. Некроз часто приводит к высвобождению ферментов и другого клеточного содержимого, которые могут быть использованы для инициирования расщепления линкера X. В некоторых вариантах осуществления расщепление X некротическими ферментами (например, кальпаинами) обеспечивает поглощение карго больными клетками и соседними клетками, которые еще не стали полностью проницаемыми.

В некоторых вариантах осуществления X представляет собой кислото-неустойчивый линкер. В некоторых вариантах осуществления X содержит ацетальную или винилэфирную связь. Ацидоз наблюдается в участках поврежденной или гипоксической ткани вследствие сдвига Варбурга от окислительного фосфорилирования в сторону анаэробного гликолиза и выработки молочной кислоты. В некоторых вариантах осуществления ацидоз используется в качестве инициатора поглощения карго путем замены некоторых из аргининов в пределах B на гистидины, которые становятся катионными только при pH ниже 7.

Будет понятно, что линкер, раскрытый здесь, может включать нестандартные аминокислоты, такие как, например, гидроксилизин, десмозин, изодесмозин или другие нестандартные аминокислоты. Линкер, раскрытый здесь, может включать модифицированные аминокислоты, включая посттрансляционно модифицированные аминокислоты, такие как, например, метилированные аминокислоты (например, метилгистидин, метилированные формы лизина, и т.д.), ацетилированные аминокислоты, амидированные аминокислоты, формилированные аминокислоты, гидроксилированные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты или другие модифицированные аминокислоты. Линкер, раскрытый здесь, может также включать фрагменты пептидомиметика, включая части, связанные непептидными связями, и аминокислоты, связанные неаминокислотными частями.

В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность, выбранную из PLGLAG, PLG-C(me)-AG, RPLALWRS, ESPAYYTA, DPRSFL, PPRSFL, RLQLKL и RLQLK(Ac). В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность PLGLAG. В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность PLG-C(me)-AG. В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность PLGxAG, в которой x представляет собой любую аминокислоту (природную или неприродную). В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность RPLALWRS. В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность ESPAYYTA. В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность DPRSFL. В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность PPRSFL. В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность RLQLKL. В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность RLQLK(Ac).

В некоторых вариантах осуществления линкер X содержит пептид, выбранный из PR(S/T)(L/I)(S/T), где буквы в круглых скобках обозначают, что каждая из указанных аминокислот может находиться в этом положении в последовательности; GGAANLVRGG; SGRIGFLRTA; SGRSA; GFLG; ALAL; FK; PIC(Et)F-F, где C(Et) обозначает S-этилцистеин (цистеин с этильной группой, присоединенной к тиолу) и "-" обозначает типичный участок расщепления в этой и последующих последовательностях); GGPRGLPG; HSSKLQ; LVLA-SSSFGY; GVSQNY-PIVG; GVVQA-SCRLA; f(Pip)R-S, где "P обозначает D-фенилаланин и "Pip" обозначает пиперидин-2-карбоновую кислоту (пипеколиновую кислоту, аналог пролина, имеющий шестичленное кольцо); DEVD; GWEHDG; RPLALWRS или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления X расщепляется под действием гипоксических условий. В некоторых вариантах осуществления X содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления X содержит хинин.

В некоторых вариантах осуществления X расщепляется под действием некротических условий. В некоторых вариантах осуществления X содержит молекулу, расщепляемую кальпаином.

В некоторых вариантах осуществления X содержит 6-аминогексаноил, 5-(амино)-3-оксапентаноил

или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления X содержит дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой алкилен. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой алкенилен. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой алкинилен. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гетероалкилен.

"Алкиленовая" группа относится к алифатической углеводородной группе. Алкиленовый фрагмент является дирадикалом и может представлять собой насыщенный алкилен или ненасыщенный алкилен.

"Алкиленовый" фрагмент может содержать от 1 до 10 атомов углерода (во всех случаях, когда он появляется в настоящем документе, числовой диапазон, такой как "от 1 до 10" относится к каждому целому числу в указанном диапазоне; например, "от 1 до 10 атомов углерода" означает, что алкильная группа может состоять из 1, 2, 3 атомов углерода и т.д., вплоть до 10 атомов углерода, хотя настоящее определение также охватывает появление термина "алкилен", где числовой диапазон не указан). Алкиленовая группа может также представлять собой "низший алкилен", содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Алкиленовая группа соединений, описанных здесь, может быть обозначена как "C_1-C_4-алкилен" или сходными обозначениями. Только в качестве примера "C_1-C_4-алкилен" обозначает, что в алкиленовой цепи содержится от 1 до 4 атомов углерода, т.е. алкиленовая цепь выбрана из метилена, этилена, пропилена, изопропилена, н-бутилена, изобутилена, втор-бутилена и трет-бутилена. Типичные алиленовые группы включают, но никоим образом не ограничиваются, метилен, этилен, пропилен, изопропилен, бутилен, изобутилен, третичный бутилен, пентилен, гексилен, этенилен, пропенилен, бутенилен и т.п.

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет дирадикальную кольцевую структуру (например, арилен). Используемый здесь термин "кольцо" относится к любой ковалентно закрытой структуре. Кольца включают, например, карбоциклы (например, арилены и циклоалкилены), гетероциклены (например, гетероарилены и неароматические гетероциклены), ароматические соединения (например, арилены и гетероарилены) и неароматические соединения (например, циклоалкилены и неароматические гетероциклены). Кольца могут быть необязательно замещенными. Кольца могут быть моноциклическими или полициклическими.

Используемый здесь термин "арилен" относится к ароматическому кольцевому дирадикалу, в котором каждый из атомов, образующих кольцо, представляет собой атом углерода. Ариленовые кольца могут быть образованы из 5, 6, 7, 8, 9 или более атомов углерода. Ариленовые группы могут быть необязательно замещенными. Примеры ариленовых групп включают, но без ограничения, фенилен, нафталенилен, фенантренилен, антраценилен, флуоренилен и инденилен.

Термин "циклоалкилен" относится к моноциклическому или полициклическому неароматическому дирадикалу, в котором каждый из атомов, образующих кольцо (т.е. атомов скелета), представляет собой атом углерода. Циклоалкилены могут быть насыщенными или частично ненасыщенными. Циклоалкиленовые группы включают группы, содержащие от 3 до 10 кольцевых атомов. Циклоалкилены включают, но без ограничения, циклопропилен, циклобутилен, циклопентилен, циклогексилен, циклогептилен и циклооктилен.

В некоторых вариантах осуществления кольцо представляет собой циклоалкан. В некоторых вариантах осуществления кольцо представляет собой циклоалкен.

В некоторых вариантах осуществления кольцо представляет собой ароматическое кольцо. Термин "ароматическое" относится к планарному кольцу, имеющему систему делокализованных π-электронов, содержащую $4n+2$ π электронов, где n является целым числом. Ароматические кольца могут быть образованы из 5, 6, 7, 8, 9 или более атомов. Ароматические соединения могут быть необязательно замещенными. Термин "ароматический" включает карбоциклические ариленовые (например, фениленовые) и гетероциклические ариленовые (или "гетероариленовые", или "гетероароматические") группы (например, пиридинилен). Термин включает моноциклические или конденсированные кольцевые полициклические (т.е. кольца, которые разделяют между собой соседние пары атомов углерода) группы.

В некоторых вариантах осуществления кольцо представляет собой гетероциклен. Термин "гетероциклен" относится к дирадикальным гетероароматическим и гетероалициклическим группам, содержащим от 1 до 4 гетероатомов, каждый из которых выбран из O, S и N, при этом каждая гетероциклическая группа содержит от 4 до 10 атомов в свой кольцевой системе, при условии, что кольцо указанной группы не содержит двух соседних атомов O или S. Неароматические гетероциклические группы включают группы, содержащие только 3 атома в своей кольцевой системе, но ароматические гетероциклические группы должны содержать по меньшей мере 5 атомов в своей кольцевой системе. Гетероциклические группы включают бензоконденсированные кольцевые системы. Примером 3-членной гетероциклической группы является азиридинилен. Примером 4-членной гетероциклической группы является азетидинилен (производное азетидина). Примером 5-членной гетероциклической группы является тиазолилен. Примером 6-членной гетероциклической группы является пиридилен, и примером 10-членной гетероциклической группы является хинолинилен.

Примерами неароматических гетероциклических групп являются пирролидинилен, тетрагидрофуранилен, дигидрофуранилен, тетрагидротиенилен, тетрагидропиранилен, дигидропиранилен, тетрагидро-

тиопиранилен, пиперидинилен, морфолинилен, тиоморфолинилен, тиоксанилен, пиперазинилен, азетидинилен, оксетанилен, тиетанилен, гомопиперидинилен, оксепанилен, тиепанилен, оксазепинилен, диазепинилен, тиазепинилен, 1,2,3,6-тетрагидропиридинилен, 2-пирролинилен, 3-пирролинилен, индолинилен, 2H-пиранилен, 4H-пиранилен, диоксанилен, 1,3-диоксоланилен, пиразолинилен, дитианилен, дитиоланилен, дигидропиранилен, дигидротиенилен, дигидрофуранилен, пиразолидинилен, имидазолинилен, имидазолидинилен, 3-азабицикло[3.1.0]гексанилен, 3-азабицикло[4.1.0]гептанилен, 3H-индолилен и хинолизинилен. Примерами ароматических гетероциклических групп являются пиридинилен, имидазолилен, пиримидинилен, пиразолилен, триазолилен, пиразинилен, тетразолилен, фурилен, тиенилен, изоксазолилен, тиазолилен, оксазолилен, изотиазолилен, пирролилен, хинолинилен, изохинолинилен, индолилен, бензимидазолилен, бензофуранилен, циннолинилен, индазолилен, индолизинилен, фталазинилен, пиридазинилен, триазинилен, изоиндолилен, птеридинилен, пуринилен, оксадиазолилен, тиадиазолилен, фуразанилен, бензофуразанилен, бензотиофенилен, бензотиазолилен, бензоксазолилен, хиназолинилен, хиноксалинилен, нафтиридинилен и фуропиридинилен. Указанные выше группы могут быть C-присоединенными и/или N-присоединенными, где это возможно. Гетероциклические группы включают бензоконденсированные кольцевые системы и кольцевые системы, замещенные одним или двумя оксо (=O) фрагментами, такими как пирролидин-2-он.

В некоторых вариантах осуществления кольцо является конденсированным. Термин "конденсированный" относится к структурам, в которых два или более кольца разделяют одну или более связей. В некоторых вариантах осуществления кольцо представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления кольцо представляет собой тример. В некоторых вариантах осуществления кольцо является замещенным.

Термин "карбоциклический" или "карбоциклен" относится к дирадикальному кольцу, в котором каждый из атомов, образующих кольцо, представляет собой атом углерода. Карбоциклен включает арилен и циклоалкилен. Термин, таким образом, проводит различие между карбоцикленом и гетероцикленом ("гетероциклический"), в котором остов кольца содержит по меньшей мере один атом, который отличается от углерода (т.е. гетероатом). Гетероциклен включает гетероприлен и гетероциклоалкилен. Карбоциклены и гетероциклены могут быть необязательно замещенными.

В некоторых вариантах осуществления линкер является замещенным. Термин "необязательно замещенный" или "замещенный" означает, что рассматриваемая группа может быть замещена одной или несколькими дополнительными группами, индивидуально и независимо выбранными из C_1-C_6-алкила, C_3-C_8-циклоалкила, арила, гетероарила, C_2-C_6-гетероалициклической группы, гидрокси, C_1-C_6-алкокси, арилокси, C_1-C_6-алкилтио, арилтио, C_1-C_6-алкилсульфоксида, арилсульфоксида, C_1-C_6-алкилсульфона, арилсульфона, циано, галогено, C_2-C_8-ацила, C_2-C_8-ацилокси, нитро, C_1-C_6-галогеналкила, C_1-C_6-фторалкила и амино, включая C_1-C_6-алкиламино, и их защищенных производных. В качестве примера, необязательные заместители могут представлять собой LsRs, где каждый Ls независимо выбран из связи, -O-, -C(=O)-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)$_2$-, -NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH-, S(=O)$_2$NH-, -NHS(=O)$_2$-, -OC(=O)NH-, -NHC(=O)O-, -(C_1-C_6-алкила)- или -(C_2-C_6-алкенила)- и каждый Rs независимо выбран из H, (C_1-C_4-алкила), (C_3-C_8-циклоалкила), гетероарила, арила и C_1-C_6-гетероалкила. Необязательно замещенные неароматические группы могут быть замещены одним или несколькими оксо (=O). Защитные группы, которые могут формировать защитные производные указанных выше заместителей, известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления молекулы селективной доставки, раскрытые здесь, содержат один линкер. Использование одного механизма для опосредования поглощения как визуализирующего, так и терапевтического карго, является особенно важным, так как визуализация с безвредными следовыми количествами может быть использована для тестирования, концентрируется ли правильно последующая терапевтическая доза в ткани-мишени.

В некоторых вариантах осуществления молекулы селективной доставки, раскрытые здесь, содержат множество линкеров. В случае, когда молекула селективной доставки, раскрытая здесь, включает множество связей X, отделение части A от других частей молекулы требует расщепления всех связей X. Расщепление множества линкеров X может быть одновременным или последовательным. Множество связей X могут включать связи X, обладающие различными специфичностями, таким образом, для отделения части A от других частей молекулы требуется, чтобы молекула сталкивалась более чем с одним состоянием или средой ("внеклеточные сигналы"). Расщепление множества линкеров XX, таким образом, служит в качестве детектора комбинаций таких внеклеточных сигналов. Например, молекула селективной доставки может включать две линкерные части Xa и Xb, соединяющие основную часть B с кислой частью A. Оба линкера Xa и Xb должны отщепляться до того, как кислая частью A будет отщепляться от основной части B, обеспечивая вхождение части B и карго фрагмента C (в случае присутствия) в клетку.

Должно быть понятно, что линкерная область может связываться или с основной частью B, или карго фрагментом C независимо от другого линкера, который может присутствовать, и что, при необходимости, может быть включено более двух линкерных областей X.

Комбинации двух или более линкеров X могут быть использованы для дополнительного модулирования направленного воздействия и доставки молекул в желательные клетки, ткани или области. Комби-

нации внеклеточных сигналов используются для расширения или сужения специфичности расщепления линкеров X, при необходимости. Когда множество линкеров X соединены параллельно, специфичность расщепления является суженной, так как каждый линкер X должен расщепляться до того, как часть A будет отделяться от остальной части молекулы. Когда множество линкеров X соединено последовательно, специфичность расщепления расширяется, так как расщепление по любому линкеру X обеспечивает отделение части A от остальной части молекулы. Например, для детекции протеазы или гипоксии (т.е. для расщепления X в присутствии протеазы или гипоксии) линкер X разработан для помещения чувствительных к протеазе и чувствительных к восстановлению участков в тандеме таким образом, чтобы расщепление любого из них было достаточным для обеспечения отделения кислой части A. В альтернативном случае, для детекции присутствия протеазы и гипоксии (т.е. для расщепления X в присутствии как протеазы, так и гипоксии, но не в присутствии только одного из них) линкер X разработан для помещения чувствительного к протеазе участка по меньшей мере между одной парой цистеинов, которые соединены друг с другом дисульфидной связью. В этом случае как расщепление протеазой, так и восстановление дисульфида требуются для обеспечения отделения части A.

Дополнительные модификации.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающие молекулы согласно настоящему изобретению необязательно конъюгированы с высокомолекулярными молекулами, которые повышают мультивалентность и авидность мечения. В некоторых вариантах осуществления высокомолекулярные молекулы представляют собой водорастворимые полимеры. Примеры подходящих водорастворимых полимеров включают, но без ограничения, пептиды, сахариды, поли(винилы), поли(эфиры), поли(амины), поли(карбоновые кислоты) и т.п. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер представляет собой декстран, полиэтиленгликоль (PEG), полиоксиалкилен, полисиаловую кислоту, крахмал или гидроксиэтиловый крахмал. Любой подходящий способ используют для конъюгирования пептидов с водорастворимыми полимерами (см., например, Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2nd Ed., Academic Press, Inc. 2008).

Фармацевтические композиции.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, содержащие молекулу селективной доставки в соответствии с SDM-41.

Фармацевтические композиции в настоящем документе формулированы с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, включая вспомогательные вещества и вспомогательные средства, которые содействуют обработке активных агентов в препараты, которые применяются фармацевтически. Надлежащая лекарственная форма зависит от выбранного пути введения. Краткое описание фармацевтических композиций можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins, 1999).

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, раскрытая здесь, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый разбавитель(и), вспомогательное вещество(а) или носитель(и). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают другие медицинские или фармацевтические агенты, носители, адъюванты, такие как консервирующие, стабилизирующие, смачивающие или эмульгирующие агенты, вещества, способствующие растворению, соли для регулирования осмотического давления и/или буферы. Кроме того, фармацевтические композиции также содержат другие терапевтически ценные вещества.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, раскрытую здесь, вводят субъекту любым подходящим путем введения, включая, но без ограничения, парентеральное (внутривенное, подкожное, интраперитонеальное, внутримышечное, внутрисосудистое, интратекальное, интравитреальное, инфузионное или местное) введение.

Лекарственные формы, подходящие для внутримышечной, подкожной, перитуморальной или внутривенной инъекции, включают физиологически приемлемые стерильные водные и неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, а также стерильные порошки для восстановления в стерильные растворы или дисперсии для инъекции. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или носителей включают воду, этанол, полиолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин, кремофор и т.п.), их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащая текучесть поддерживается, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ. Лекарственные формы, подходящие для подкожной инъекции, также содержат необязательные добавки, такие как консервирующие, смачивающие, эмульгирующие и диспергирующие агенты.

Для внутривенных инъекций активный агент необязательно формулирован в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнка, раствор Рингера или физиологический солевой буфер.

Парентеральные инъекции необязательно включают болюсную инъекцию или непрерывную инфузию. Лекарственные формы для инъекции необязательно представлены в стандартной лекарственной форме, например в ампулах или контейнерах для множества доз с добавленным консервантом. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная здесь, находится в форме, подходящей для парентеральной инъекции, в виде стерильных суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных носителях, и содержит вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Фармацевтические лекарственные формы для парентерального введения включают водные растворы активного агента в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии необязательно приготовлены в виде подходящих масляных инъекционных суспензий.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная здесь, представлена в виде стандартных лекарственных форм, подходящих для однократного введения точных доз. В стандартной лекарственной форме композиция разделена на стандартные дозы, содержащие соответствующие количества активного агента, раскрытого здесь. В некоторых вариантах осуществления стандартная доза представлена в форме упаковки, содержащей дискретные количества композиции. Неограничивающими примерами являются упакованные таблетки или капсулы, а также порошки во флаконах или ампулах. В некоторых вариантах осуществления водные суспензионные композиции упакованы в одноразовые контейнеры, содержащие однократную дозу. В альтернативном варианте используют повторно закрываемые контейнеры, содержащие множество доз, и в этом случае в композицию обычно добавляют консервант. Только в качестве примера составы для парентеральной инъекции представлены в виде стандартной лекарственной формы, которая включает, но не ограничивается, ампулы, или в контейнерах, содержащих множество доз, с добавленным консервантом.

Способы применения.

Молекула селективной доставки SDM-41 обеспечивает направленную доставку пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагаются способы доставки пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань, включающие приведение в контакт представляющей интерес ткани с молекулой в соответствии с SDM-41.

Злокачественная ткань.

В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес ткань является злокачественной тканью (или раковой). В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы, ткань колоректального рака, ткань сквамозной карциномы, ткань рака кожи, ткань рака предстательной железы, ткань меланомы, ткань рака яичника, злокачественную ткань лимфатических узлов или ткань рака щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань злокачественную ткань лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой злокачественную ткань сквамозной карциномы. В некоторых вариантах осуществления злокачественная ткань представляет собой ткань рака кожи.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой СПИД-ассоциированный рак (например, связанную со СПИДом лимфому), рак анального канала, базально-клеточную карциному, рак желчных протоков (например, внепеченочных), рак мочевого пузыря, рак костей (остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому), рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия (например, рак матки), эпендимому, рак пищевода, рак глаз (например, внутриглазную меланому и ретинобластому), рак желудочно-кишечного тракта (желудка), эмбрионально-клеточную опухоль (например, экстракраниальную, экстрагонадную, овариальную), рак головы и шеи, лейкоз, рак губ и полости рта, рак печени, рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак яичника, рак поджелудочной железы, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, рак почек, рак кожи, рак тонкого кишечника, плоскоклеточный рак, рак яичек, рак щитовидной железы, рак мочеиспускательного канала и посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение (PTLD).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак лимфатической системы (например, лимфому).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой β-клеточные опухоли. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой опухоль из предшественников β-клеток (например, β-клеточный лимфобластный лейкоз/лимф ома) и опухоль из периферических β-клеток (например, β-клеточный хронический лимфолейкоз/пролимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (мелкоклеточная лимфоцитарная (SL) NHL), лимфоплазмоцитарную лимфому/иммуноцитому, лимфому из клеток зоны мантии, лимфому из клеток центра фолликула, фолликулярную лимфому (например, цитологические степени: I (мелкоклеточная), II (смешанная мелкоклеточная и крупноклеточная), III (крупноклеточная) и/или подтипы: диффузный и преимущественно мелкоклеточный тип), лимфому

низкой степени/фолликулярную неходжкинскую лимфому (NHL), лимфому промежуточной степени/фолликулярную NHL, β-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (например, экстранодулярную (например, MALT-тип +/- моноцитоподобные β-клетки) и/или нодальную (например, +/- моноцитоподобные β-клетки)), лимфому из клеток маргинальной зоны селезенки (например, +/- ворсинчатые лимфоциты), волосатоклеточный лейкоз, плазмацитому/плазмаклеточную миелому (например, миелому и множественную миелому), диффузную β-крупноклеточную лимфому (например, первичную медиастинальную (тимусную) β-клеточную лимфому), диффузную NHL промежуточной степени, лимфому Беркитта, β-клеточную лимфому высокой степени, Беркитт-подобную иммунобластную NHL высокой степени, лимфобластную NHL высокой степени, мелкоклеточную с нерасщепленными клетками NHL высокой степени, массивную NHL, СПИД-ассоциированную лимфому и макроглобулинемию Вальденстрема).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой Т-клеточный и/или предположительный NK-клеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет рак Т-клеток-предшественников (лимфома/лейкоз Т-лимфобластов-

предшественников) и рак периферических Т-клеток и NK-клеток (например, Т-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/пролимфоцитарный лейкоз и крупноклеточный гранулярный лимфоцитарный лейкоз (LGL) (например, Т-клеточного типа и/или NK-клеточного типа), кожную Т-клеточную лимфому (например, грибовидный микоз/синдром Сезари), неспециализированные недифференцированные Т-клеточные лимфомы (например, цитологические категории (например, клетки среднего размера, смешанные средние и крупные клетки), крупные клетки, лимфоэпителиоидные клетки, печеночно-селезеночную γδ Т-клеточную лимфому, и подкожную панникулитную Т-клеточную лимфому), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AILD), ангиоцентрическую лимфому, кишечную Т-клеточную лимфому (например, ассоциированную с +/- с энтеропатией), Т-клеточную лимфому/лейкоз взрослых (ATL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL) (например, CD30+, Т- и нуль-клеточных типов), анапластическую крупноклеточную лимфому и лимфому, подобную лимфоме Ходжкина).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой болезнь Ходжкина.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой хронический миелоцитарный I (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз и острый миелоцитарный лейкоз (например, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой жидкую опухоль или плазмацитому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой экстрамедуллярную плазмацитому, солитаную миелому и множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления плазмацитома представляет собой множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой аденокарциному. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой саркому, нейроэндокринную опухоль, мелкоклеточный рак, дуктальный рак или лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой рак предстательной железы стадии A (рак не может пальпироваться во время исследования прямой кишки). В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой рак предстательной железы стадии B (т.е. опухоль вовлекает больше ткани в пределах предстательной железы, она может пальпироваться во время исследования прямой кишки или может быть обнаружена с помощью биопсии, которую проводят в связи с высоким уровнем PSA). В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой рак предстательной железы стадии C (т.е. рак распространился наружу предстательной железы в близлежащие ткани). В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой рак предстательной железы стадии D. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой андрогеннезависимый рак предстательной железы (AIPC). В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой андрогензависимый рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы является рефракторным к гормональной терапии. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы является, по существу, рефракторным к гормональной терапии. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы является, по существу, рефракторным к химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека, который имеет ген, генетическую мутацию или полиморфизм, ассоциированные с раком предстательной железы (например, RNASEL/HPC1, ELAC2/HPC2, SR-A/MSR1, CHEK2, BRCA2, PON1, OGG1, MIC-1, TLR4 и PTEN) или имеет одну или несколько лишних копий гена, ассоциированного с раком предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы является HER2-положительным. В неко-

торых вариантах осуществления рак предстательной железы является HER2-отрицательным.

В некоторых вариантах осуществления рак метастазировал и характеризуется циркулирующими опухолевыми клетками.

Применение визуализации.

Молекула селективной доставки SDM-41 обеспечивает направленную доставку пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику визуализировать/получать изображение специфической ткани.

В настоящем документе предлагаются способы доставки пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань, включающие приведение в контакт представляющей интерес ткани с молекулой SDM-41.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагаются способы доставки пары акцепторных и донорных флуоресцентных фрагментов, между которыми может происходить Forsters/резонансный перенос энергии, в представляющую интерес ткань, включающие приведение в контакт злокачественной ткани с SDM-41.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагаются способы визуализации злокачественной ткани у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие (a) введение индивидууму молекулы SDM-41 и (b) визуализацию по меньшей мере одного из визуализирующих агентов SDM-41.

В некоторых вариантах осуществления направленная доставка пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику визуализировать/получать изображение злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику осуществить удаление (или хирургическое удаление) злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику осуществить удаление (или хирургическое удаление) злокачественной ткани с уменьшением хирургических краев. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику осуществить удаление (или хирургическое удаление) опухоли/злокачественной ткани или уменьшить вероятность того, что некоторая злокачественная ткань останется не удаленной. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику сократить объем злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань молочной железы снижает вероятность необязательных операций и повторных операций.

В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику более точно взять образец (например, биопсия (например, эксцизионная биопсия, рассечение, биопсия, аспирационная биопсия или биопсия иглой)) злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику визуализировать/получать изображение злокачественной ткани в извлеченной ткани, содержащей здоровую ткань. Возможность идентификации злокачественной ткани может помочь патологу определить участок для патологической оценки и уменьшает вероятность того, что патолог пропустит злокачественную ткань и отберет образец здоровой ткани, который может давать ложноотрицательный результат. В некоторых вариантах осуществления злокачественную ткань, удаленную после применения молекулы SDM-41, используют для приготовления патологического материала или среза. В некоторых вариантах осуществления злокачественную ткань, удаленную после применения молекулы SDM-41, используют для приготовления патологического материала или среза, который используют для диагностики ткани как злокачественной или доброкачественной.

В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань молочной железы позволяет медицинскому работнику точно определить стадию рака, давая возможность принять решение о медицинском лечении. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань молочной железы позволяет медицинскому работнику наблюдать за размером злокачественной ткани или распространением (например, метастатическими поражениями) злокачественной ткани. В некоторых вариантах осуществления направленная доставка визуализирующего агента в злокачественную ткань позволяет медицинскому работнику разработать эффективный режим лечения.

В некоторых вариантах осуществления молекулу селективной доставки SDM-41, содержащую пару визуализирующих агентов, применяют в направленной хирургии. В некоторых вариантах осуществления молекула селективной доставки преимущественно локализуется в злокачественных тканях. В некоторых вариантах осуществления молекулу селективной доставки в соответствии с SDM-41, содержащую пару визуализирующих агентов, применяют в направленной хирургии для удаления колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления направленная хирургия, использующая молекулу селективной дос-

тавки, позволяет хирургу извлекать как можно меньшее количество здоровой (т.е. не злокачественной) ткани, насколько это возможно. В некоторых вариантах осуществления направленная хирургия, использующая молекулу селективной доставки, позволяет хирургу визуализировать и извлекать больше количество злокачественной ткани, чем он мог бы извлекать без молекулы селективной доставки. В некоторых вариантах осуществления хирургия представляет собой направляемую флуоресценцией хирургию. Визуализирующие агенты

Пара визуализирующих агентов представляет собой флуоресцентные красители, представляющие собой флуоресцентные цианины Cy5 и Cy7.

Исходные материалы.

В настоящем документе предлагается молекула пептид P-16, имеющая аминокислотную последовательность:

eeeeeF(4-Ac)oRPLALWRSrrrrrrrrc

в которой o представляет собой 5-(амино-3-оксапентаноил);

F(4-Ac) представляет пара-ацетил-(L)-фенилаланин.

В некоторых вариантах осуществления молекула дополнительно содержит полимер полиэтиленгликоль (PEG). В некоторых вариантах осуществления PEG-полимер ковалентно связан с молекулой на субъединице F(4-Ac). В некоторых вариантах осуществления молекула содержит группы, которые могут быть расположены ортогонально. В некоторых вариантах осуществления группы, которые могут быть расположены ортогонально, выбраны из амина, тиола и ацетил-фенилаланина. В некоторых вариантах осуществления молекула содержит амин, тиол и ацетил-фенилаланин.

PEG-полимер имеет среднюю молекулярную массу приблизительно 2 кДа. В некоторых вариантах осуществления PEG(2k) представляет собой α-амино-ω-амид поли(этиленгликоль) со средней молекулярной массой приблизительно 2 кДа. В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагается применение молекулы в синтезе молекулы в соответствии с формулой I.

В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагается молекула, имеющая аминокислотную последовательность:

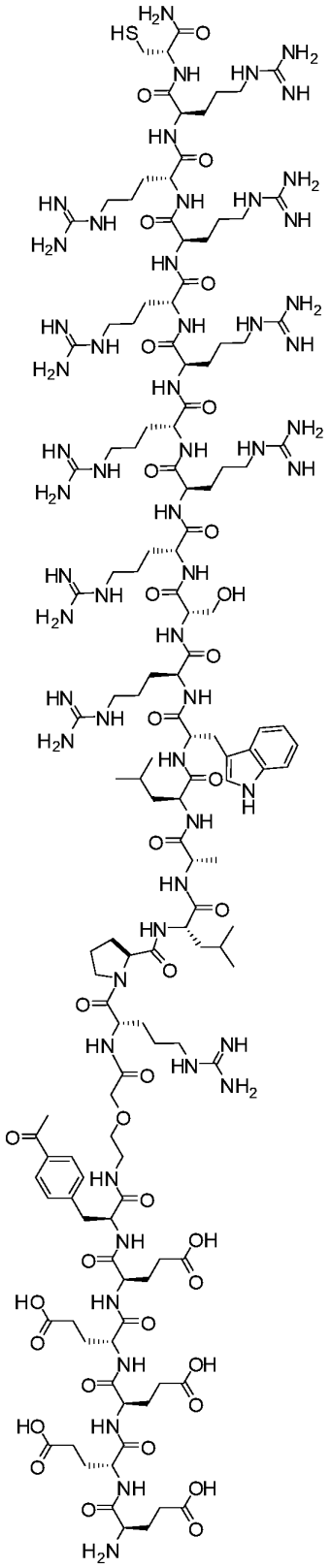
eeeeeF(4-Ac)oRPLALWRSrrrrrrrrc

в которой все глутаматы и аргинины могут представлять собой D-аминокислоты;

o представляет 5-(амино-3-оксапентаноил).

В некоторых вариантах осуществления молекула дополнительно содержит флуоресцентный фрагмент. В настоящем документе в определенных вариантах осуществления предлагается применение молекулы в синтезе молекулы в соответствии с SDM-41.

Пептид P-16.



Примеры

Материалы и способы.

Ацетонитрил, глицин, ацетофенон и анилин степени очистки HPLC получали от фирмы Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Очищенную соду собирали через систему очистки воды Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Сложный эфир 3-малеимидопропионовой кислоты-Pfp получали от фирмы Molecular Biosciences (Boulder, CO). Буфер PBS-EDTA получали от фирмы Teknova (Hollister, CA). Буфер PBS (pH 8,5, 0,5 M) получали от фирмы Boston Bioproducts (Ashland, MA). Трифторуксусную кислоту (TFA) получали от фирмы Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Диметилформамид (DMF) и N-метилморфолин (NMM) получали от фирмы Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). α-Меркаптоэтил-ω-метокси, поли-

оксиэтилен (Mw ~2000, ~5000, ~20000 и ~40000) [mPEG(2K)-SH, mPEG(5K)-SH, mPEG(20K)-SH, mPEG(40K)-SH] и α-аминоксил-ω-метокси, полиоксиэтилен (Mw ~2000, ~5000, ~10000, ~20000 и ~40000) [mPEG(2K)-ONH_2, mPEG(5K)-ONH2, mPEG (10K)-ONH_2, mPEG(20K)-ONH_2, mPEG(40K)-ONH_2] получали от фирмы NOF America Corporation (Irvine, CA). mPEG(lK)-$NHNH_2$ (Mw ~1000) получали от фирмы Nanocs (New York). IRDye 800CW малеимид (Mal-IRDye) и IRDye 750 сукцинимидиловый сложный эфир получали от фирмы Li-Cor Biosciences (Lincoln, NE). Лиофилизированные пептиды с β-1 по β-18 получали от фирмы PolyPeptide Group (San Diego, CA).

Анализ LC-MS проводили на системе Agilent 1200 SL series в комбинации с AB SCIEX API 3200, оснащенном CTC PAL автосэмплером, функционирующим при 4°C, вакуумным дегазатором, насосом для двухкомпонентных смесей, детектором UV-VIS с аналитическим программным обеспечением Analyst 1.5 и колонкой Phenomenex (Kinetex 2,6 мкм C18 100A, 100×2,1 мм) или на разделительном модуле Waters 2695, оснащенном детектором поглощения на двух длинах волн Waters 2487 в комбинации с масс-спектрометром с ионной ловушкой Finnigan LCQ Deca XP. Оборудование управляется аналитическим программным обеспечением Xcalibur и соединен с колонками Peeke Scientific (Titan 200 5 мкм, C18-MC, 50/100×2,1 мм).

Препаративную HPLC проводили на системе Agilent (Agilent 1200 series) и колонке Thermo Scientific (Hypersil Gold C18, 5 мкм, 250×10 мм), или на системе препаративной HPLC Waters Delta Prep и колонке Varian (F75L, C18, 15 мкм, 1200 г), или на системе Waters PrepLC System, оснащенной детектором поглощения на двух длинах волн Waters 2487, коллектором фракций Fraction Collector III, программным обеспечением Masslynx и колонкой Thermo Scientific (Hypersil Gold C18, 5 мкм, 250×10 мм) или колонкой Phenomenex (luna, C18(2), 5 мкм, 100A AX 150×30 мм). Подвижная фаза состояла из градиента вода (0,05% TFA) (растворитель A)/ацетонитрил (0,05% TFA) (растворитель B). Центрифугирование проводили при 4°C на центрифуге Eppendorf 5810R или Beckman Microfuge® 18.

Сокращения.

Стандартные однобуквенные сокращения аминокислот использовали во всех последовательностях. Обозначения в нижнем регистре обозначают D-аминокислоты. Все пептиды были амидированы на C-конце.

o: 5-(амино-3-оксапентаноил);

$F_{(4\text{-}Ac)}$: пара-ацетил-(b)-фенилаланин;

C(Me): S-метил-(L)-цистеин.

PEG(3K): α-амид-ω-амид-поли(этиленгликоль) со средней молекулярной массой 3000 Да;

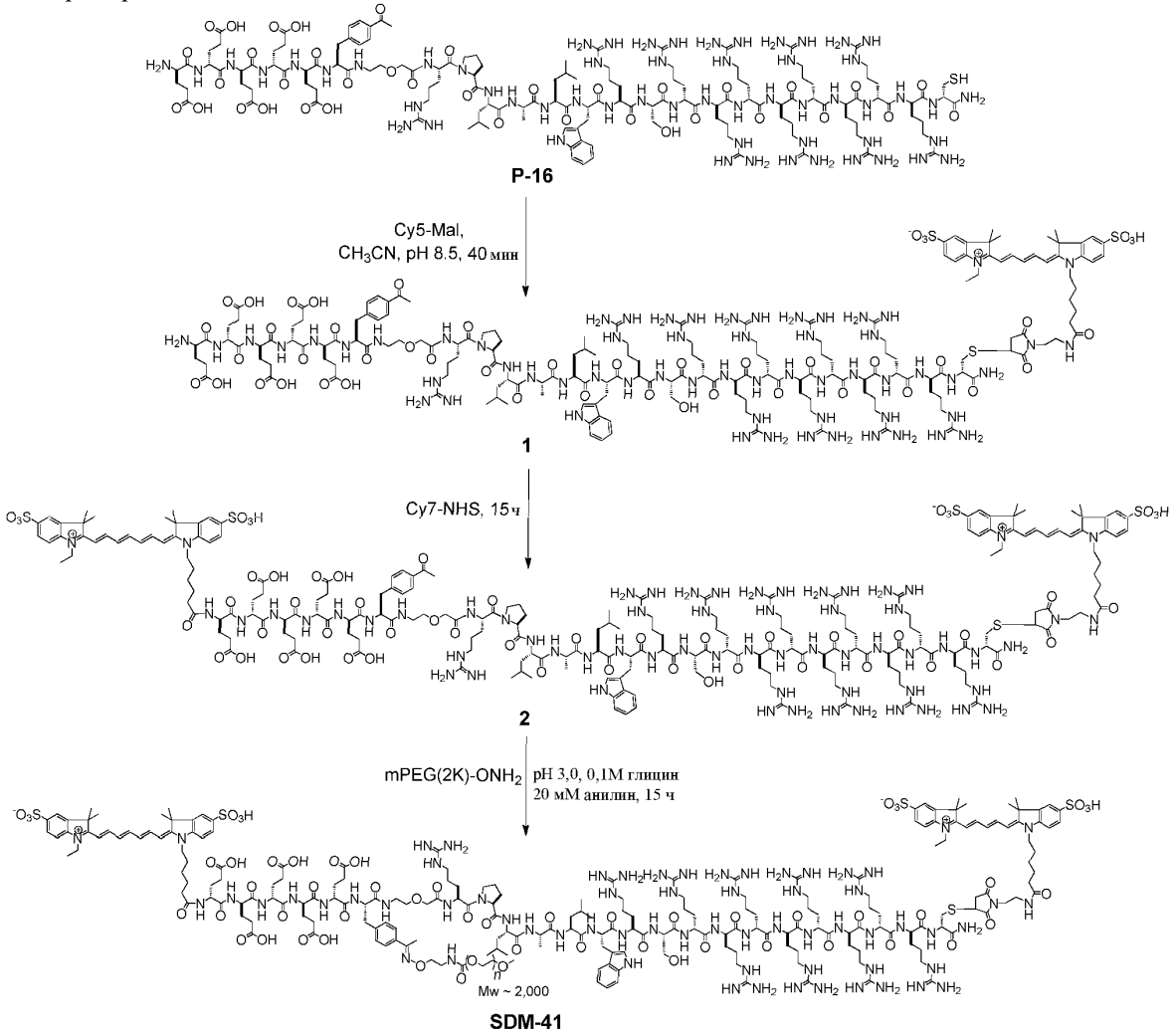
mPEG(2K): α-карбокси-ω-метокси-поли(этиленгликоль) со средней молекулярной массой 2000 Да;

mPEG(5K): α-карбокси-ω-метокси-поли(этиленгликоль) со средней молекулярной массой 5000 Да;

Ac: ацетил;

(Aeo): 2-(2-2(аминоэтокси)этокси)ацетил.

Пример 1. Синтез SDM-41 из пептида P-16



Синтез промежуточного соединения 2.

В раствор пептида P-16 (10 мг, 2,0 мкмоль) в ацетонитриле (0,5 мл) и буфере PBS (0,5 мл, pH 8,5, 0,5 М) при комнатной температуре при перемешивании в условиях темноты добавляли малеимид Cy5 (2,3 мг, 2,7 мкмоль). Реакцию контролировали посредством LC-MS и завершали через 40 мин. В реакционную смесь добавляли Cy7-NHS с последующим буфером PBS (1,0 мл, pH 8,5, 0,5 М). После перемешивания в течение 15 ч смесь очищали методом HPLC с получением промежуточного соединения 2 (3,8 мг, 32%).

Рассчитано: $[M+3H]^{3+}$ ($C_{211}H_{319}N_{62}O_{53}S_5$) m/z = 1577; Обнаружено ESI: $[M+3H]^{3+}$ ($C_{211}H_{319}N_{62}O_{53}S_5$) m/z = 1577.

Синтез молекулы селективной доставки SDM-41.

Смесь промежуточного соединения 2 (3,8 мг, 0,65 мкмоль) и mPEG(2K)-ONH_2 (2,5 мг, 1,1 мкмоль) в глициновом буфере (1,0 мл, 0,1 М, 20 мМ анилин, pH 3,0) и ацетонитрила (0,5 мл) перемешивали при комнатной температуре в условиях темноты в течение 15 ч. После завершения реакции добавляли ацетофенон (7 мкл, 60 мкмоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Очистка методом RP-HPLC обеспечила получение молекулы селективной доставки SDM-41 (2,1 мг, 40%).

Пример 2а. Зависимое от ферментов усиление флуоресценции и изменения цвета.

Молекулу селективной доставки 41 растворяли в буфере TCNB (pH 7,5) при комнатной температуре. Концентрация SDM-41 составляла от 0,156 до 5 мкМ. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофотометре Spectromax M2 (Molecular Devices). Возбуждение образца осуществляли на длине волны 620 нм и эмиссию измеряли при 670 нм (Cy5). Расщепление пептида инициировали добавлением MMP-7 при конечной концентрации 1 нМ. Степень расщепления измеряли как относительное изменение интенсивности флуоресценции Cy5 за 1 мин, которое затем конвертировали в концентрацию Cy5-пептида с помощью стандартной кривой для расчета k_{cat} и K_m для опосредованного MMP-7 расщепления SDM-41 (фиг. 1). Данные показывают, что SDM-41 является субстратом для MMP-7 и генерирует флуорогенный FRET-сигнал при расщеплении ферментом.

Пример 3а. Детекция in vivo метастазов рака в лимфатических узлах при помощи FRET с применением молекул селективной доставки (SDM).

Флуоресцентное мечение метастатических шейных лимфатических узлов после внутривенного и перитуморального введения флуоресцентных SDM у несущих опухоль мышей.

Следующую модель и анализы использовали для определения способности флуоресцентных SDM выявлять метастазы рака в лимфатических узлах у иммунокомпетентных мышей BALB/c (Charles River, Wilmington, MA 01887), несущих сингенные опухоли уха.

Мышиная модель.

Мышей помещали по 4 особи в группе в одноразовые индивидуально вентилируемые клетки с твердым поликарбонатным полом (системы IVC) (Innovive, Inc., San Diego, CA 92121), при этом мыши имели свободный доступ к стандартной лабораторной пище (номер по каталогу 2018, Harlan Laboratories, Inc. Indianapolis, IN 46250) и питьевой воде. Животных содержали в контролируемых условиях (цикл света/темноты 12 ч/12 ч) в течение по меньшей мере 5 дней до имплантации опухолевых клеток. Все экспериментальные процедуры проводили согласно утвержденному IACUC протоколу EB11-002-009A. Мышиные клетки опухоли 4T1 (ATCC® Number: CRL-2539™) и карциномы молочной железы (Polyoma Middle T 8119 субклон "PyMT 8119") из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA 20108) и Университета Сан-Диего, Калифорния (University of San Diego, California, UCSD, La Jolla, CA 92093) соответственно выращивали по-отдельности с использованием методов, применяемых для стандартных клеточных культур. Опухолевые клетки (4×10^5 опухолевых клеток/50 мкл/мышь) суспендировали в DPBS/Matrigel™ (1:1 об./об.) и инъецировали подкожно в ушную раковину мышей над хрящом ушной раковины для индукции первичной опухоли. Изображения in vivo метастатических шейных лимфатических узлов у несущих опухоль уха мышей, которых использовали в качестве суррогатной мышиной модели метастатического рака молочной железы, получали через 17-20 дней после имплантации опухолевых клеток.

Введение соединения.

Для внутривенного введения (инъекция в хвостовую вену) SDM мышей удерживали во вращающемся хвостовом инъекторе (номер по каталогу RTI, Braintree Scientific, Inc., Braintree, MA 02185) и тестируемое соединение (5-120 мкМ; 100 мкл/мышь) инъецировали мышам с помощью инсулинового шприца $28G^{1/2}$ (номер по каталогу 14-826-79, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ 07417). Для выполнения перитуморальной инъекции SDM каждую включенную в исследование мышь анестезировали путем интраперитонеального введения смеси кетамин/ксилазин (Ketaject® & Xyla-ject®, Phoenix Pharmaceuticals, St. Joseph, MO 64506) и тестируемое соединение (5-120 мкМ; 30-60 мкл/ухо) вводили подкожно вокруг первичной опухоли и контралатеральной ушной раковины с использованием иглы 30G PrecisionGlide™ (номер по каталогу 305106, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ 07417). После введения каждую мышь возвращали в приписанную клетку и содержали в контролируемых условиях до исследования путем флуоресцентной визуализации шейных лимфатических узлов через 1-24 ч.

Флуоресцентная визуализация.

Для получения изображений шейных лимфатических узлов каждую мышь глубоко анестезировали вводимой интраперитонеально смесью кетамин/ксилазин. Глубоко анестезированных мышей переносили на черный пробковый (black cork) коврик (4×4 дюйма, Quartet®, ACCO Brands, Lincolnshire, IL 60069, USA) для тупой диссекции и получения изображений шейных лимфатических узлов при помощи оснащенного компьютером флуоресцентного стереомикроскопа (SZX10, Olympus Optical, CO, LTD, Japan), снабженного соответствующими фильтрами для выделения флуоресценции для детекции интенсивности одного флуорофора и соотношения интенсивностей флуоресценции двух флуорофоров. Например, для визуализации SDM с Cy5 и Cy7 на основе FRET использовали фильтры для Cy5 и Cy7. После получения флуоресцентного изображения in vivo (см. ниже для метода "ratio imaging method") шейные лимфатические узлы хирургически удаляли, фиксировали в 10%-ном забуференном формалине и обрабатывали для гистологического исследования (окрашивали гематоксилином и эозином) для оценки корреляции флуоресценция/рак и определения диагностической эффективности SDM.

Метод получения изображения соотношений интенсивностей эмиссии (Emission Ratio Imaging Method).

Флуоресцентные изображения получали при помощи стереомикроскопа Olympus SZX10 Research Stereo Microscope (Olympus America, Center Valley, PA). Для SDM с Cy5 и Cy7 на основе FRET использовали фильтр возбуждения, центрированный при 620 нм (Chroma ET620/60x, Chroma Technology Corp. Bellows Falls, VT), и фильтры эмиссии, центрированные при 700 и 810 нм (Chroma filters ET700/75m и ET810/90m), для получения двух изображений при разных длинах волн эмиссии. Изображения получали с помощью камеры Orca-R2 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ), соединенной с компьютером на базе Windows. Использовали два способа определения соотношений интенсивностей эмиссии для лимфатических узлов. В одном способе интенсивность усредняли по представляющей интерес области (ROI), включающей часть или все представляющие интерес лимфатические узлы. Затем рассчитывали соотношение интенсивностей эмиссии на основании данных по интенсивностям для каждой представляющей интерес об-

ласти.

Roi соотношение интенсивностей эмиссии = (roiInt1/Exp1)/(roiInt2/Exp2), (уравнение 1)

в котором roiInt1 = средняя интенсивность для ROI при длине волны 1 эмиссии с фильтром ET700/75m;

Exp1 = время экспозиции, используемое для Int1;

roiInt2 = средняя интенсивность для ROI при длине волны 2 эмиссии с фильтром ET810/90m;

Exp2 = время экспозиции, используемое для Int2.

Второй способ, используемый для определения соотношений интенсивностей эмиссии, основан на усреднении соотношения интенсивностей эмиссии из представляющей интерес области (ROI), включающей часть или все представляющие интерес лимфатические узлы, взятые из изображения соотношения интенсивностей эмиссии. Изображения соотношений интенсивностей эмиссии получали с использованием модифицированного уравнения 1, которое включало масштабный фактор таким образом, чтобы значения пикселов находились в интервале между 0 и 255 для 8-битного изображения.

Px отношение интенсивностей эмиссии = k * (pxInt1/Exp1)/(pxInt2/Exp2), (уравнение 2)

в котором K = масштабный фактор;

pxInt1 = пиксельная интенсивность при длине волны 1 эмиссии с фильтром ET700/75m;

Exp1 = время экспозиции, используемое для Int1;

pxInt 2 = пиксельная интенсивность при длине волны 2 эмиссии с фильтром ET810/90m;

Exp 2 = время экспозиции, используемое для Int2.

Пример изображений соотношений интенсивностей эмиссии, полученных с использованием уравнения 2, в котором Exp1 = 0,7 с, Exp2 = 2,5 с и k=24 для SDM-41, представлен на фиг. 2, где показаны изображения донора (слева), акцептора (в середине) и соотношение интенсивностей эмиссии флуоресценции (справа) для SDM-41.

Соотношения интенсивностей эмиссии для лимфатических узлов показали количественно схожие результаты при использовании обоих методов.

Лимфатические узлы были идентифицированы как метастатические или неметастатические патологом на основании окрашивания H&E. Контрастность соотношений интенсивностей эмиссии (Emission ratio contrast) для каждой SDM (молекулы селективной доставки) затем количественно определяли путем деления среднего соотношения интенсивностей эмиссии метастатических лимфатических узлов на среднюю эмиссию неметастатических лимфатических узлов и вычитания единицы, как показано в уравнении 3

$$ERC = MetAV/ConAV - 1, \text{ (уравнение 3)}$$

в котором ERC = контрастность соотношений интенсивностей эмиссии;

MetAV = среднее соотношение интенсивностей эмиссии метастатических лимфатических узлов;

ConAV = среднее соотношение интенсивностей эмиссии неметастатических лимфатических узлов.

Несмотря на пригодность для детекции злокачественных лимфатических узлов, контрастность, составляющая от 20 до 50%, считается низкой, от 50 до 100% считается удовлетворительной, при этом выше 100% считается превосходной.

Пример 3b. Высокая диагностическая чувствительность и специфичность в отношении SDM в модели метастатических лимфатических узлов.

Важными характеристиками диагностического агента являются чувствительность и специфичность. Чувствительность относится к способности корректно выявлять положительные реакции. При этом специфичность относится к способности корректно выявлять отрицательные реакции.

Следующую модель и анализы использовали для определения способности флуоресцентных SDM детектировать метастазы рака в лимфатических узлах у иммунокомпетентных мышей BALB/c (Charles River, Wilmington, MA 01887), несущих сингенные опухоли уха.

В качестве примера высокой диагностической эффективности FRET с применением SDM использовали данные, полученные на мышиной модели метастатических лимфатических узлов 4T1 с использованием SDM-41. SDM-41 вводили посредством IV инъекции через хвостовую вену. Лимфатические узлы мышей визуализировали через 3-6 ч путем получения изображения соотношения интенсивностей флуоресценции, как описано ранее, для определения, имеет ли лимфатический узел высокое соотношение (диагностирован как положительный по раку) или низкое соотношение (диагностирован как отрицательный по раку). Чувствительность и специфичность определяли на основании анализа так называемой "характеристической кривой" (Receiver operating characteristic, ROC) или ROC-кривой. Для анализа ROC-кривой данные разделяли на бинарную классификацию положительных и отрицательных результатов на основании порогового значения для соотношения интенсивностей эмиссии. ROC-кривая позволяет построить зависимость доли истинно положительных результатов (true positive rate) от доли ложноположительных результатов (false positive rate).

Истинно положительные, ложноположительные, истинно отрицательные и ложноотрицательные результаты определяли путем сравнения прогноза, основанного на данных по соотношениям интенсивностей эмиссии флуоресценции и пороговом значении с положительным или отрицательным распределением, сделанным патологом с использованием окрашивания H&E. Значения соотношений интенсивно-

стей эмиссии для положительных и отрицательных результатов по раку (определенных с помощью окрашивания H&E сертифицированным патологом) показаны на фиг. 3. Две популяции были полностью разделены, демонстрируя 100% диагностическую чувствительность и специфичность в этой модели рака молочной железы с метастазами в лимфатических узлах. Пороговое значение плавно регулировалось от низкого до высокого для получения полной ROC-кривой от (1, 1) или всех положительных результатов до (0, 0) или всех отрицательных результатов. ROC-кривая показана на фиг. 4. Для построения этой кривой использовали данные, полученные от -32 лимфатических узлов. Следует отметить, что чувствительность и специфичность могут быть определены для каждой точки на ROC-кривой. Эти данные демонстрируют 100% диагностическую чувствительность и специфичность в отношении отделения злокачественных лимфатических узлов от незлокачественных. Чувствительность относится к способности корректно диагностировать истинно положительный результат, тогда как специфичность относится к способности корректно диагностировать отрицательный результат.

Уравнения, используемые для создания ROC-кривой, показаны ниже.

$$TPR = TP/(TP + FN);$$

$$FPR = FP/(FP + TN),$$

где TPR = истинно положительный результат;

FPR = ложноположительный результат;

TP = число истинно положительных результатов;

TN = число истинно отрицательных результатов;

FP = число ложноположительных результатов;

FN = число ложноотрицательных результатов.

В этом примере чувствительность и специфичность составляют 100% для всех пороговых значений между ~4,3 и ~5. Это означает, что все лимфатические узлы были корректно идентифицированы с помощью метода соотношений интенсивностей эмиссии на основе FRET по сравнению с гистопатологией, считающейся золотым стандартом. В целом, величины чувствительности и специфичности, составляющие >90%, считаются очень высокими.

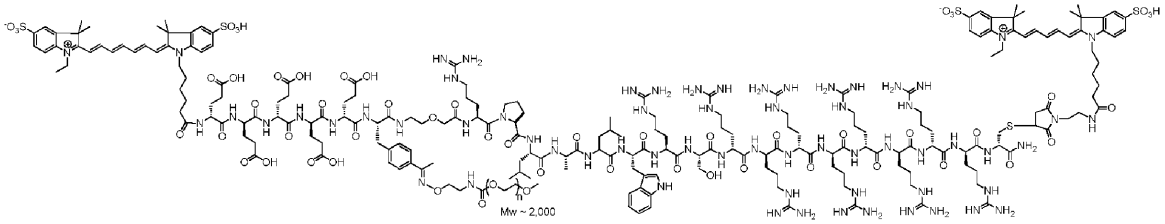
Пример 4. Анализ человеческой ткани ex vivo: расщепление SDM и FRET-ответ, соотношение интенсивностей эмиссии в злокачественной ткани человека в сравнении с незлокачественной тканью.

Образцы человеческой ткани рака молочной железы и нормальной человеческой ткани молочной железы (полученной из Cancer Human Tissue Network) гомогенизировали в холодном буфере TCNB (pH 7,5, 50 мМ Tris-HCl, 10 мМ $CaCl_2$, 150 мМ NaCl и 0.05% Brij35) при 100 мг/200 мкл путем воздействия ультразвука (VCX500, Sonics & Materials Inc, Newtown, CT). Затем гомогенаты центрифугировали при 15000×g при 4°C в течение 20 мин, супернатанты собирали. Для расщепления 45 мкл супернатантов тканей (конечный объем: 50 мкл) в анализе использовали 500 нМ SDM-41, если не указано иное. Анализ проводили с использованием спектрометра SpectraMax M2 с программным обеспечением SoftMax Pro v4.5. Сигналы флуоресценции (***ex, 620 нм, ***em, 670 нм), (***ex, 620 нм, ***em, 773 нм) и (***ex, 720 нм; ***em, 773 нм), где ***ex и ***em обозначают длины волн возбуждения и эмиссии соответственно, измеряли как функцию времени при комнатной температуре. Образцы измеряли в трех повторностях. В таблице показана ткань, полученная от пациента с раком молочной железы, используемая для диагностического анализа ex vivo флуоресценции SDM-41. На фиг. 5 показано изменение соотношения интенсивностей флуоресценции SDM-41 в гомогенизированной злокачественной и здоровой ткани, полученной от пациентов с раком молочной железы. Злокачественная ткань (МП2090А2, М1121603А2 и М1121797А6) расщепляет SDM-41 быстрее, чем нормальная ткань ((М112090В2, М1121603В2 и М1121797В6) и обеспечивает диагностическое считывание злокачественной ткани рака молочной железы. На фиг. 6 показано изменение соотношения интенсивностей флуоресценции SDM-41 в гомогенизированной злокачественной и здоровой ткани, полученной от этих же самых пациентов с раком молочной железы. Злокачественная ткань расщепляет SDM-41 быстрее и обеспечивает диагностическое считывание злокачественной ткани рака молочной железы.

	Возраст/Пол/ Раса	Диагноз	Номер образца
Пациент 1	63/женский/белая	Плеоморфная лобулярная карцинома	Опухоль: M1120909A2
			Нормальная:M1120 909B2
Пациент 2	69/женский/белая	Инвазивная дуктальная карцинома	Опухоль: M1121797A6
			Нормальная: M1121797B6
Пациент 3	69/женский/белая	Инвазивная дуктальная карцинома	Опухоль: M1121603A2
			Нормальная: M1121603B2

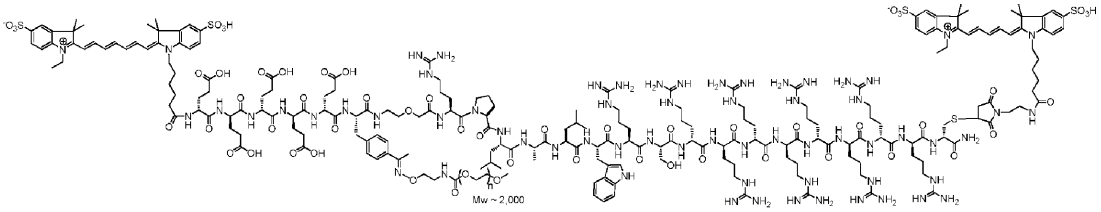
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула селективной доставки в соответствии с SDM-41 для доставки пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань:



SDM-41.

2. Образец злокачественной ткани, содержащий молекулу, имеющую формулу SDM-41

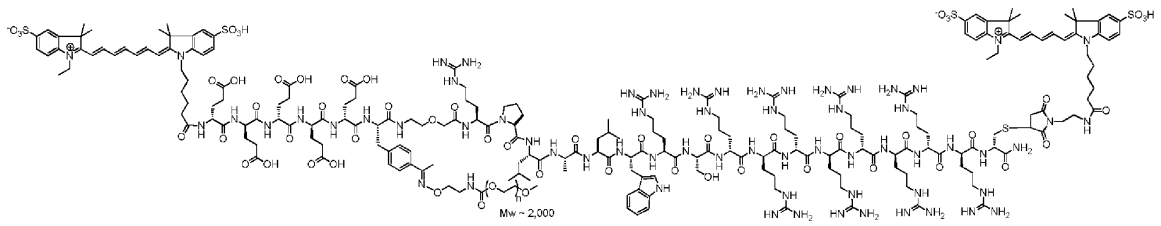


SDM-41.

3. Образец злокачественной ткани по п.2, представляющий собой патологический материал или срез.

4. Образец ткани по п.2, при этом злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы, ткань колоректального рака, ткань сквамозной карциномы, ткань рака кожи, ткань рака предстательной железы, ткань меланомы, ткань рака щитовидной железы, ткань рака яичника, злокачественную ткань лимфатических узлов, ткань рака шейки матки, ткань рака легкого, ткань рака поджелудочной железы, ткань рака головы и шеи или ткань рака пищевода.

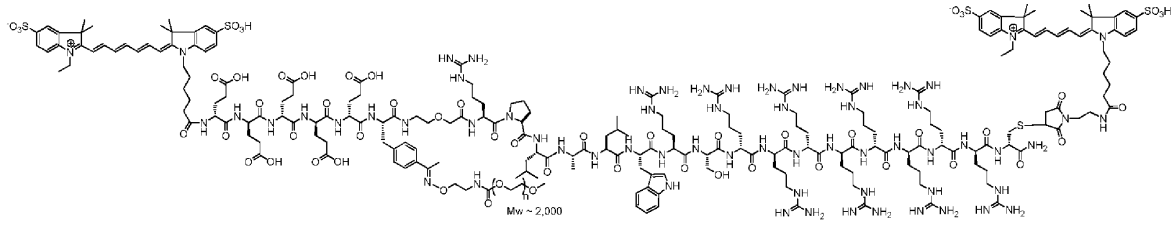
5. Способ доставки пары визуализирующих агентов в злокачественную ткань, включающий приведение в контакт злокачественной ткани с молекулой в соответствии с SDM-41



SDM-41.

6. Способ визуализации злокачественной ткани у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий:

(a) введение индивидууму молекулы SDM-41, которая локализуется в злокачественной ткани у индивидуума:



SDM-41;

(b) визуализацию по меньшей мере одного из визуализирующих агентов SDM-41.

7. Способ по п.5 или 6, в котором злокачественная ткань представляет собой ткань рака молочной железы, ткань колоректального рака, ткань сквамозной карциномы, ткань рака кожи, ткань рака предстательной железы, ткань меланомы, ткань рака щитовидной железы, ткань рака яичника, злокачественную ткань лимфатических узлов, ткань рака шейки матки, ткань рака легкого, ткань рака поджелудочной железы, ткань рака головы и шеи или ткань рака пищевода.

8. Способ по п.6, дополнительно включающий хирургическое удаление злокачественной ткани у индивидуума.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что хирургический край, окружающий злокачественную ткань, уменьшается.

10. Способ по п.8, дополнительно включающий подготовку образца ткани из удаленной злокачественной ткани.

11. Способ по п.6, дополнительно включающий стадирование злокачественной ткани.

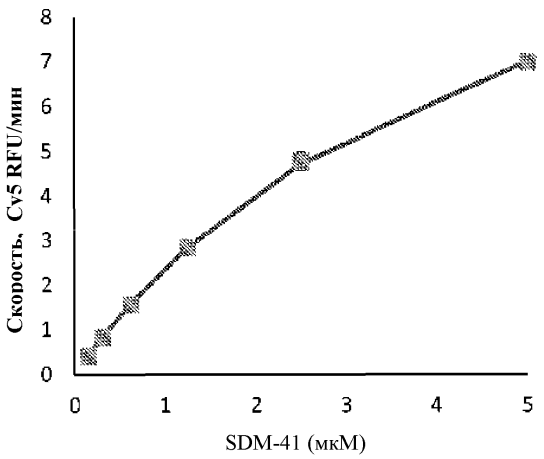
12. Способ по п.6, дополнительно включающий визуализацию визуализирующих агентов при помощи визуализации соотношения эмиссий методом резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET).

13. Способ по п.6, в котором визуализирующие агенты детектируют при помощи системы камер.

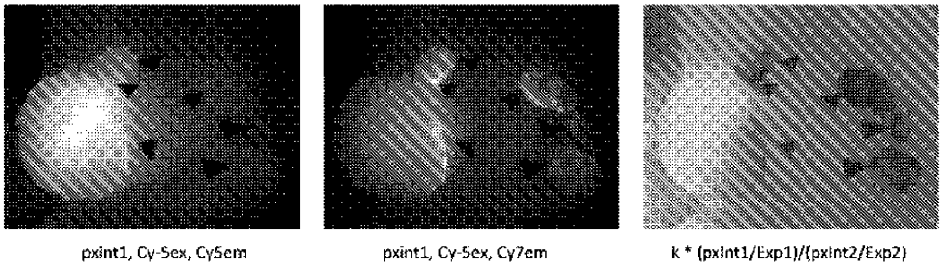
14. Способ по п.5 или 6, в котором молекула вводится внутривенно.

15. Способ по п.6, в котором злокачественная ткань визуализируется в ходе операции.

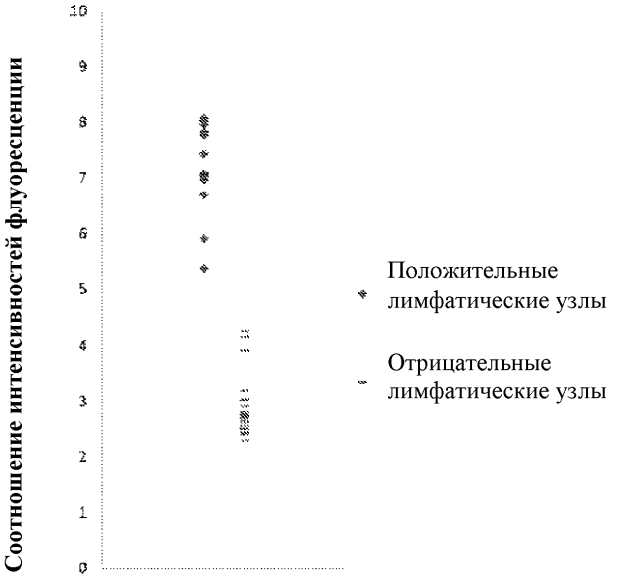
16. Способ по п.6, в котором патолог обнаруживает злокачественную ткань на основании визуализации визуализирующих агентов.



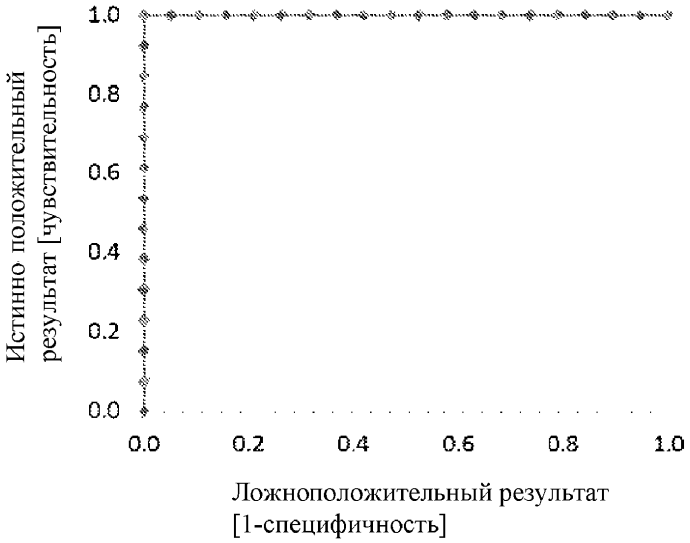
Фиг. 1



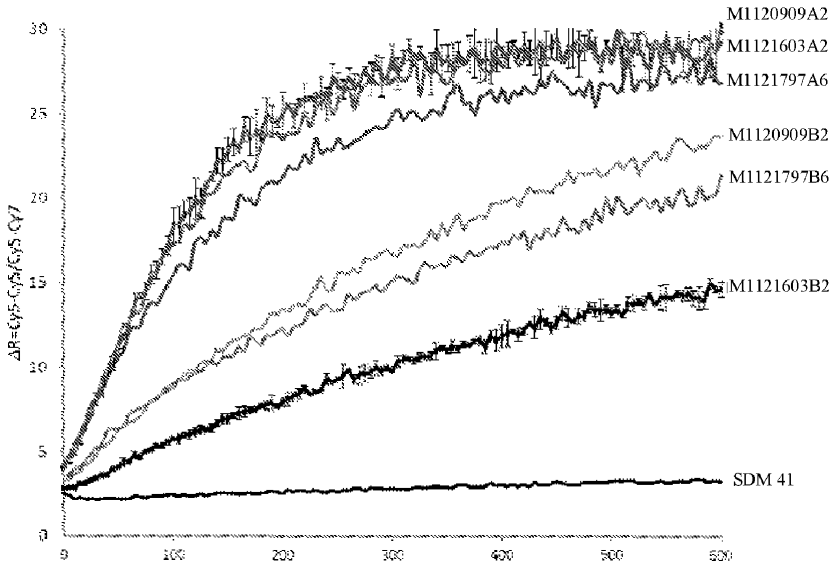
Фиг. 2



Фиг. 3

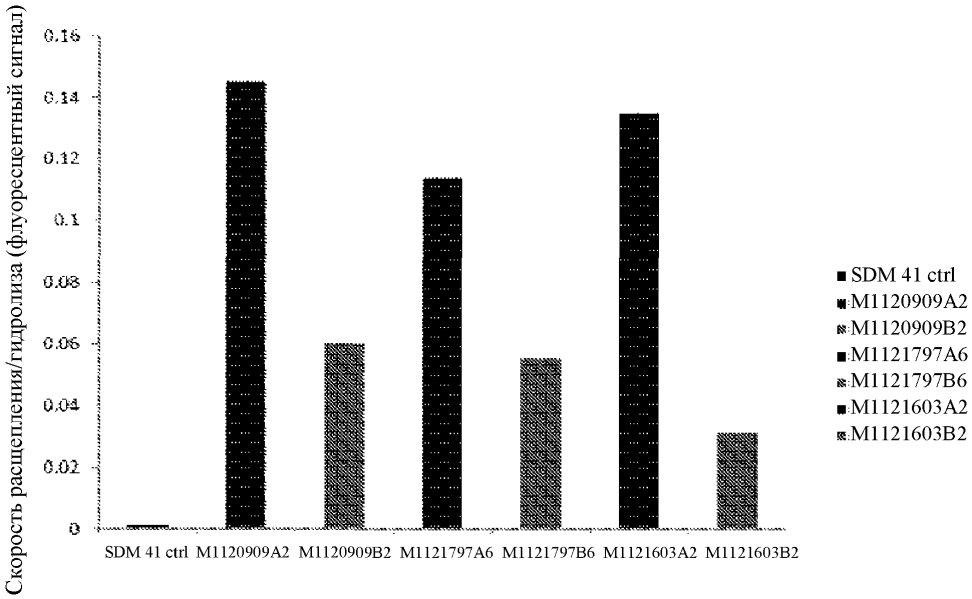


Фиг. 4



Время, мин

Фиг. 5



Фиг. 6