



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 7/06 (2006.01)

C07F 1/08 (2006.01)

C07F 3/02 (2006.01)

C07F 13/00 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61K 31/28 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009110226/04, 23.08.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.08.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.08.2006 US 60/839,409

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2010 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 10.05.2012 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: CHALEX V. ET AL, RGD-PORPHYRIN
CONJUGATES SYNTHESIS AND POTENTIAL
APPLICATION IN PHOTODYNAMIC
THERAPY, EUROPEAN JOURNAL OF
ORGANIC CHEMISTRY, 2003, v.8, p.1486-1493.
CHALEX V. ET AL, EFFICIENT SYNTHESIS OF
RGD-CONTAINING CYCLIC
PEPTIDE-PORPHYRIN CONJUGATES BY
RING-CLOSING METATHESIS ON SOLID
SUPPORT, TETRAHEDRON LETTERS, 2004,
v.45, p.5295-5299. (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 23.03.2009(86) Заявка РСТ:
IL 2007/001055 (23.08.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/023378 (28.02.2008)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ШЕРЦ Ави́гдор (IL),
САЛОМОН Йо́рам (IL),
РУБИНШТЕИН Эфра́т (IL),
БРЭНДИС Алекса́ндр (IL),
ЭРЕН Дорон (IL),
НЕЙМАНН Ка́рин (IL)

(73) Патентообладатель(и):

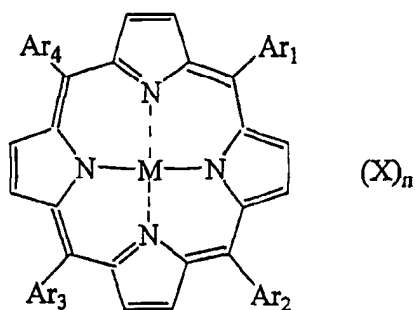
ЙЕДА РИСЕРЧ ЭНД ДИВЕРЛОПМЕНТ
КО. ЛТД (IL)

(54) КОНЬЮГАТЫ RGD-ПЕПТИДОВ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ПОРФИРИНА ИЛИ (БАКТЕРИО)ХЛОРОФИЛЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

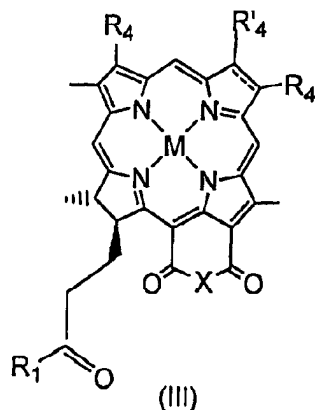
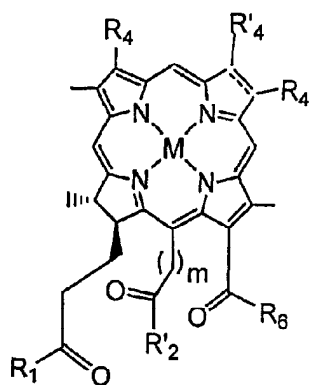
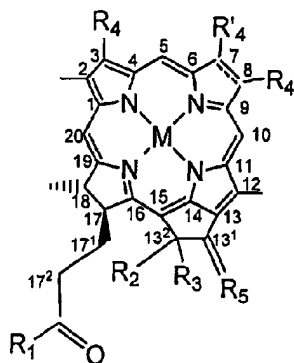
(57) Реферат:

Изобретение относится к
фотосенсибилизаторам, а именно к

конъюгату RGD-содержащего пептида или RGD-
пептидомиметика и фотосенсибилизатора,
выбранного из тетраарилпорфирина формулы:



или хлорофилла или бактериохлорофилла
формул I, II или III;



в котором тетраарилпорфирин или указанное производное хлорофилла или бактериохлорофилла формулы I, II или III содержит, по меньшей мере, один остаток RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика. Значения М и радикалов соответствуют указанным в формуле изобретения. Также предложены фармацевтическая композиция, способ диагностики опухолей динамической флуоресцентной визуализацией, молекулярная магнитно-резонансная томография (МРТ) для диагностики опухолей и способ фотодинамической терапии опухолей. Изобретение позволяет получить конъюгат RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика и фотосенсибилизатора, который применяется в способах фотодинамической терапии и диагностики опухолей. 6 н. и 17 з.п. ф-лы, 75 ил., 43 пр., 5 табл.

(56) (продолжение):

STERNBERG E.D., PORPHYRIN-BASED PHOTSENSITIZERS FOR USE IN PHOTODYNAMIC THERAPY, TETRAHEDRON, 1998, v.54, p.4151-4202. SOL V. ET AL, AMINO PORPHYRINS AS PHOTOINHIBITORS OF GRAM-POSITIVE AND - NEGATIVE BACTERIA, BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISSTRY LETTERS, 2004, v.14, №16, p.4207-4211. RU 2193038 C2, 20.11.2002.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 450 018** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07F 3/02 (2006.01)
C07F 13/00 (2006.01)
C07F 15/00 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 31/28 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009110226/04, 23.08.2007**

(24) Effective date for property rights:
23.08.2007

Priority:

(30) Convention priority:
23.08.2006 US 60/839,409

(43) Application published: **27.09.2010 Bull. 27**

(45) Date of publication: **10.05.2012 Bull. 13**

(85) Commencement of national phase: **23.03.2009**

(86) PCT application:
IL 2007/001055 (23.08.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/023378 (28.02.2008)

Mail address:

**129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**ShERTs Avigdor (IL),
SALOMON Joram (IL),
RUBINShTEIN Ehfrat (IL),
BREhNDIS Aleksandr (IL),
EhREN Doron (IL),
NEJMANN Karin (IL)**

(73) Proprietor(s):

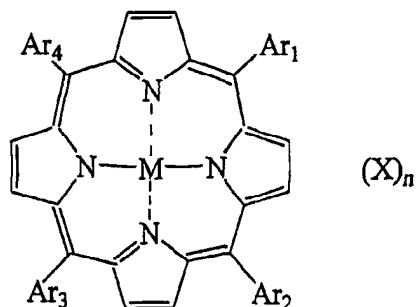
**JEDA RISERCh EhND DIVERLOPMENT KO.
LTD (IL)**

(54) CONJUGATE OF RGD-PEPTIDES AND PHOTOSENSITISERS OF PORPHYRIN OR (BACTERIO)CHLOROPHYLL AND APPLICATION THEREOF

(57) Abstract:

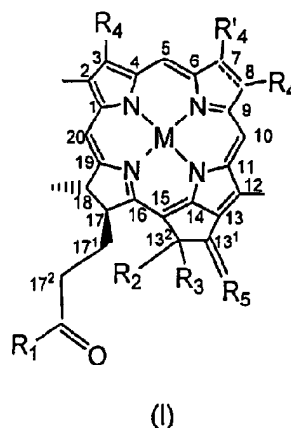
FIELD: medicine.

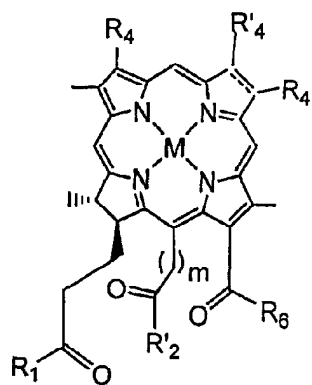
SUBSTANCE: invention refers to photosensitisers, namely to a conjugate of RGD-containing peptide or RGD-peptidomimetic and a photosensitiser selected from tetraarylporphyrin of formula:



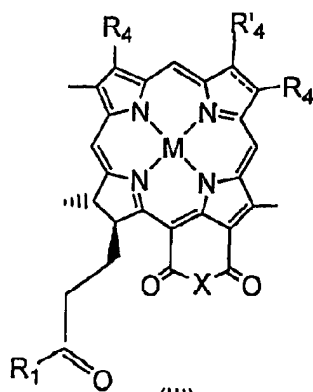
or

chlorophyll or tbacteriochlorophyll of formulae





(II)



(III)

or

tetraarylporphyrin or said chlorophyll or bacteriochlorophyll derivative of formula I, II or III contains at least one residue of the RGD-containing peptide or RGD-peptidomimetic. The values of M and radicals is related with those specified in the patent claim. Also, there are offered a pharmaceutical composition, a diagnostic technique for tumours by dynamic fluorescent visualisation, molecular magnetic resonant tomography (MPT) for diagnosing tumours and a method of photodynamic therapy of tumours.

EFFECT: invention provides producing the conjugate of the RGD-containing peptide or RGD-peptidomimetic and the photosensitiser which is applied in methods of photodynamic therapy and diagnosing of tumours.

wherein

23 cl, 75 dwg, 43 ex, 5 tbl

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фотосенсибилизаторам и, в частности, к новым конъюгатам производных порфирина, хлорофилла и бактериохлорофилла с пептидами, содержащими RGD-мотив, или с RGD-пептидомиметиками, к их
5 получению и их применению в способах фотодинамической терапии и диагностики опухолей и различных сосудистых заболеваний, таких как возрастная дегенерация желтого пятна, в условиях *in vivo*.

Определения и сокращенные обозначения

10 AMD: возрастная дегенерация желтого пятна; Bchl_a: бактериофилла: пентациклический 7,8,17,18-тетрагидропорфирин с 5 изоциклическим кольцом, центральным атомом Mg, фитилом или геранилгеранилом в положении 17³, COOCH₃ группой в положении 13², атомом Н в положении 13², метильными группами в
15 положениях 2, 7, 12, 18, ацетильной группой в положении 3 и этильной группой в положении 8, соединение 1 в данном документе; Bphe: бактериофеофитин (Bchl, в котором центральный атом Mg замещен на два атома Н); Bpheid: бактериофеофорбид (C-17²-свободная карбоновая кислота, полученная из Bphe, без центрального атома металла); Chl: хлорофилл; EC: эндотелиальные клетки; ECM:
20 внеклеточный матрикс; NIR: ближняя область инфракрасного света; Pd-Bpheid: Pd-бактериофеофорбида; ФДТ: фотодинамическая терапия; RGD-4C: циклический нонапептид CDCRGDCFC-NH₂; родобактериохлорин: тетрациклический 7,8,17,18-тетрагидропорфирин, содержащий CH₂CH₂COOH группу в положении 17, -COOH в
25 положении 13, метильные группы в положениях 2, 7, 12, 8 и этильные группы в положениях 3 и 8; ROS: молекулы реакционноспособного кислорода; VTI: направленная на сосуды визуализация; VTP: направленная на сосуды ФДТ.

В заявке использовали систему нумерации IUPAC для производных бактериохлорофилла. С использованием данной номенклатуры природные
30 бактериофиллы имеют два эфира карбоновой кислоты в положениях 13² и 17², однако они эстерифицированы в положениях 13² и 17².

Уровень техники

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой нехирургическое лечение
35 опухолей, в которой объединяются нетоксичные лекарственные препараты и безопасное фотосенсибилизирующее облучение с образованием цитотоксичных реакционноспособных молекул кислорода *in situ*. Данный метод является более избирательным по сравнению с обычной химиотерапией опухолей и лучевой терапией.

40 ФДТ опухолей включает комбинацию введенного фотосенсибилизатора и локальную доставку света, сами по себе оба фактора являются безвредными агентами, но в присутствии молекулярного кислорода они способны продуцировать цитотоксичные молекулы кислорода (ROS), которые могут приводить к инактивации
45 клеток. Будучи бинарной терапевтической системой, ФДТ обеспечивает более высокую специфичность и обладает потенциалом проявления большей избирательности, но является не менее деструктивной по сравнению с обычно используемой химиотерапией или лучевой терапией (Dougherty et al., 1998; Bonnett et al., 1999; Kessel and Dougherty, 1999; Mazon, 1999; Hahn and Glatstein, 1999).

50 Порфирины в клинике применялись в качестве основных фотосенсибилизирующих средств. Оптимальное проникновение света в ткани происходит при 650-800 нм. Натриевая соль порфимера (Photofrin®, торговое название Axcan Pharma Inc.)

является первым в мире официально разрешенным для применения средством для фотодинамической терапии, которое получают из гематопорфирина-IX обработкой кислотами, и оно получило разрешение Федерального управления по контролю за продуктами питания и лекарственными препаратами для лечения карциномы пищевода и эндобронхиальной немелклеточной карциномы легких, представляет собой комплекс мономеров, димеров и высших олигомеров.

Большое количество работ было посвящено синтезу индивидуальных чистых соединений так называемых сенсibilизаторов «второго поколения» - которые поглощают в длинноволновой области света; была хорошо установлена их структура и время их удерживания в опухолевых клетках существенно отличается от их удерживания в коже и нормальных тканях. Для оптимизации эффективности лекарственных препаратов на основе порфирина в целях терапии и диагностики было предложено несколько производных порфирина, в которых, например, имелся центральный атом металла (иной чем Mg) в виде комплекса с четырьмя пиррольными циклами, и/или периферические заместители в пиррольных циклах были модифицированы и/или макроцикл был дигидрирован в производные хлорофилла (хлорины) или тетрагидрирован в производные бактериохлорофилла (бактериохлорины).

За счет их интенсивного поглощения в благоприятных областях спектра (650-850 нм) и их легкой деградации после проведения лечения хлорофилл (Chl) и бактериохлорофилл (BChl) были признаны в качестве превосходных сенсibilизаторов для ФДТ опухолей, и они обладают более совершенными свойствами по сравнению с порфиринами. Бактериохлорофиллы обладают потенциальными преимуществами по сравнению с хлорофиллами, поскольку они имеют интенсивные полосы поглощения в ближней инфракрасной области света при значительно более длинных волнах, чем производные хлорофилла.

Направленное действие на сосуды опухолей

Направленные фотодинамические реагенты для деструкции сосудистой сети опухолей, в противоположность самим опухолевым клеткам, могут предложить терапевтические преимущества, поскольку рост и развитие опухолевых клеток критически зависят от постоянной доставки кислорода и питательных веществ (Ruoslahti, 2002). Подобное повреждение сосудов включает образование тромба и дальнейшее ограничение перфузии крови через опухоль (Huang et al., 1997). Кроме того, предполагается, что направленность на слой эндотелиальных клеток сосудов опухоли (ЕС) приводит к усилению проникновения терапевтических макромолекул в опухолевую строму (Huang et al., 1997; Burrows and Thorpe, 1994). Несмотря на то, что кровеносные сосуды опухолей могут изменяться под влиянием микроокружения опухоли и приобретать ассоциированный с опухолью «почерк», они не являются злокачественными и, вероятно, в меньшей степени становятся резистентными к лекарственным препаратам. Кроме того, в том случае, когда агент с направленным действием против сосудов также активен и против опухолевых клеток, то можно ожидать дополнительные преимущества в отношении эффективности. Таким образом, при объединении антивазкулярных свойств с противоопухолевой цитотоксической активностью в одном препарате можно ожидать повышение его эффективности и, следовательно, необходимая эффективная цитотоксическая доза будет ниже. Было показано, что в дополнении к ЕС опухолевые клетки в одном случае составляют часть люминальной мозаики опухолевых кровеносных сосудов (Ruoslahti, 2002; Chang et al., 2000). Следовательно,

полагают, что данные опухолевые клетки непосредственно «омываются» кровью и свободно контактируют с терапевтическими макромолекулами, которые иначе не могут пройти через эндотелиальный барьер.

5 Избирательное направленное действие на сосуды может основываться на различной чувствительности и последующей ответной реакции на воздействие терапевтических средств у опухолевых и нормальных кровеносных сосудов. Альтернативно различный эндоцитоз может способствовать избирательному поглощению цитотоксических и других терапевтических средств. На основании 10 результатов недавно проведенных исследований было высказано предположение о наличии специфических органных/тканевых свойств сосудистых ЕС (Ruoslahti, 2002). Кровеносные сосуды в различных тканях, вероятно, экспрессируют тканеспецифические эндотелиальные маркеры, которые большей частью остаются неизвестными. Патологические процессы, такие как воспаление, ишемия и 15 злокачественное преобразование, также могут накладывать свой «почерк» на соответствующую сосудистую сеть (Ruoslahti, 2002; Ruoslahti and Rajotte, 2000; Ruoslahti, 2000; Rajotte et al., 1998; Arap et al., 1998). Биохимические показатели, которые характеризуют кровеносные сосуды в опухолях, могут включать связанные с ангиогенезом молекулы, такие как некоторые интегрины. Интегрины $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ и $\alpha_5\beta_1$ были идентифицированы в экспрессирующих профилях, типичных для ангиогенных сосудистых ЕС, ассоциированных с опухолями, ранами, воспалительной тканью, и во время ремоделирования сосудов (Brooks et al., 1994a; Brooks et al., 1994b; Brooks et al., 1995; Elceiri and Cheresch, 1999). Также в этом 25 отношении были описаны рецепторы факторов роста эндотелиальных клеток, протеазы, пептидазы, клеточные поверхностные протеоглики и компоненты внеклеточного матрикса (ECM) (Ruoslahti, 2000). Данный богатый набор гетерогенных молекул и процессов может обеспечивать новые возможности для направленной доставки лекарственных препаратов. 30

Для достижения данной цели шел поиск различных стратегий. Циркулирующие пептиды, пептидомиметики или антитела, направленные на специфические сайты-мишени в сосудистой сети, являются привлекательными в качестве носителей для лекарственных препаратов и диагностических средств; они обеспечивают 35 теоретические преимущества по сравнению с конъюгатами, которые направлены непосредственно на опухолевые клетки, большей частью расположенные под физиологическими барьерами, такими как стенка кровеносных сосудов.

Chaleix et al., 2003 раскрывают синтез конъюгатов RGD-порфирина в качестве 40 потенциальных кандидатов для применения в ФДТ, в которых неметаллированный порфириновый цикл замещен в каждом из положений 10, 15, 20 4-метилфенилом или ацетилированным глюкозилфенилом и в положении 5 остатком линейного RGD-содержащего пептида, связанного с макроциклом через спейсер.

Избирательное поглощение RGD-содержащих пептидов эндотелиальными и 45 опухолевыми клетками, опосредованное интегринами $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$

Мотив аргинин-глицин-аспарагиновая кислота Arg-Gly-Asp (RGD) компонентов ECM, подобно фибронектину (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984) и витронектину, связывается с интегринами (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987; D'Souza SE et al., 1991; Joshi et al., 1993; Koivunen et al., 1994). Опосредованная интегрином адгезия приводит к внутриклеточным сигнальным событиям, которые регулируют выживаемость, пролиферацию и миграцию клеток. Известно 25 интегринов и, по меньшей мере, восемь из которых связываются с RGD-мотивом в качестве основной распознающей 50

последовательности в их лигандах.

Данные, полученные при скрининге RGD-содержащих пептидов методом фагового дисплея (Pasqualini and Ruoslahti, 1996), свидетельствуют об их избирательном связывании с эндотелиальным слоем в опухолевых кровеносных сосудах (Ruoslahti, 1996; Pasqualini et al., 1997). Поскольку сообщалось, что экспрессия интегринов является высокой в активированных, но в большей степени ограничивается в покоящихся ЕС, то небольшие синтетические RGD-содержащие пептиды были предложены в качестве антагонистов, нарушающих рост сосудистого эндотелия и опухолевых клеток. Также RGD-пептиды ингибируют передачу сигналов, оказывают влияние на миграцию клеток и индуцируют регрессию и апоптоз опухолевых клеток (Su et al., 2002). RGD-аналоги применяют для визуализации опухолей (Haubner et al., 2001), для антиангиогенных подходов (Kawaguchi et al., 2001; Pasqualini et al., 2000) и для направленной доставки радионуклеотидов (van Hagen et al., 2000) и химиотерапевтических препаратов (Arap et al., 1998; Zitzmann et al., 2002).

Также интегрин экспрессируется на злокачественных клетках и, следовательно, играют важную роль в инвазии, метастазировании, пролиферации и апоптозе раковых клеток. Метастатическое распространение опухолевых клеток в предпочтительные органы может представлять собой явление клеточного хоминга, который зависит от адгезивного взаимодействия опухолевых клеток и органно-специфических эндотелиальных маркеров (Ruoslahti and Rajotte, 2000). Посредством связывания интегрин с эндотелиальными или опухолевыми клетками RGD-пептиды способны модулировать передвижение клеток в условиях *in vivo* ингибированием соединения ЕСМ опухолевых клеток и ЕС опухолевых клеток, которое является обязательным для метастатического процесса. Результаты нескольких исследований показали, что RGD-содержащие соединения могут нарушать метастатические процессы опухолевых клеток в условиях *in vitro* (Goligorsky et al., 1998; Romanov and Goligorsky, 1999) и в условиях *in vivo* (Saiki et al., 1989; Hardan et al., 1993).

Пептиды, которые являются специфическими для отдельных интегринов, представляют большой интерес и возможное медицинское значение. Интегрин $\alpha_v\beta_3$ был первым интегрином, для которого была показана связь с ангиогенезом в опухолях. RGD-пептиды, которые специфически блокируют интегрин $\alpha_v\beta_3$, являются потенциальными ингибиторами ангиогенеза в опухолях и сетчатке, остеопороза и их можно использовать для направленной доставки лекарственных препаратов к сосудистой сети опухолей (Assa-Munt et al., 2001). Сочетание противоопухолевого препарата доксорубицина или проапоптотического пептида со связывающимся с интегрином $\alpha_v\beta_3$ RGD-пептидом обеспечило соединения, которые были более активными и менее токсичными по сравнению с немодифицированными препаратами при тестировании против опухолевых ксенотрансплантатов у мышей (Ruoslahti, 2000; Arap et al., 1998; Arap et al., 2002; Ellerby et al., 1999).

В патенте США №6576239, Европейском патенте 0927045 B1 и заявке WO 98/010795 (все принадлежат Burnham Institute, заявители: E. Ruoslahti and R. Pasqualini) раскрывается конъюгат, содержащий опухолевый пептид хоминга, включающий аминокислотную последовательность RGD или NGR, в котором указанный опухолевый пептид хоминга связан с терапевтическим или диагностическим фрагментом, при условии, что указанная группа не является фаговой частицей. Терапевтический фрагмент может представлять цитотоксическое средство или противоопухолевый химиотерапевтический препарат, такой как доксорубин.

Конъюгат избирательно попадает к ангиогенной сосудистой сети при введении в условиях *in vivo*. Пептид хоминга опухолей может представлять пептид длиной из 20-30 аминокислот или из 50-100 аминокислот, линейный или циклический. Одним предпочтительным пептидом является циклический нонапептид CDCRGDCFC или

Избирательная сосудистая ответная реакция, индуцированная в опухолях фотодинамической терапией (ФДТ)

В последние годы заявителями сообщалось о применении новых производных бактериохлорофилла (Bchl) в качестве сенсибилизаторов при ФДТ в научной литературе (Zilberstein et al., 2001; Schreiber et al., 2002; Gross et al., 1997; Zilberstein et al., 1997; Rosenbach-Belkin et al., 1996; Gross et al., 2003a; Koudinova et al., 2003; Preise et al., 2003; Gross et al., 2003b) и в патентных публикациях: патент США №5726169, патент США №5650292, патент США №5955585, патент США №6147195, патент США №6740637, патент США №6333319, патент США №6569846, патент США №7045117, патент Германии 4 121 876, Европейский патент 1 246 826, WO 2004/045492, WO 2005/120573. Спектры, фотофизические и фотохимические свойства производных Bchl сделали их оптимальными молекулами для восприятия света с наличием явных преимуществ по сравнению с другими сенсибилизаторами, которые используются в настоящее время для ФДТ. Данные производные Bchl в большинстве своем являются полярными и остаются в кровотоке в течение очень короткого периода времени, практически без проникновения в другие ткани (Brandis et al., 2003). Следовательно, данные соединения представляют хорошие кандидаты для направленной на сосуды ФДТ, основанной на кратковременном (5-10 мин) внутрисосудистом взаимодействии со светом и более высокой чувствительности опухолевых сосудов к продуцированному ФДТ цитотоксическому эффекту ROS.

Результаты недавно проведенных заявителями исследований показали, что основная фотосенсибилизация имеет место внутри сосудов с быстрым развитием ишемических окклюзий и стаза во время облучения светом. Также данный процесс вызывает фотохимически индуцированное перокисление липидов (LPO) и раннюю гибель ЕС, которые преимущественно имеют место в сосудистой сети опухолей (Gross et al., 2003a; Koudinova et al., 2003). За счет независимого от света протекания свободнорадикальных цепных реакций наряду с развивающейся гипоксией LPO и гибель клеток распространяются ниже сосудистой зоны с вовлечением целого интерстиция опухолей до достижения полного некроза опухолей примерно в течение 24 ч после ФДТ. Следовательно, основное действие ФДТ заключается в блокировании поставки крови и индукция гипоксии, которая инициирует, как вторичное явление, серию молекулярных и патофизиологических событий, которые в итоге приводят к элиминации опухоли.

Митохондрии, лизосомы, плазматические мембраны и ядра клеток расцениваются в качестве потенциальных мишеней при ФДТ. Поскольку большинство сенсибилизаторов для ФДТ не накапливается в ядре клетки, то при ФДТ в целом имеется очень низкая вероятность повреждения ДНК, мутаций и карциногенеза. Гидрофильные сенсибилизаторы, вероятно, поглощаются пиноцитозом и/или эндоцитозом и, следовательно, попадают в лизосомы или эндосомы. Затем воздействие света будет делать лизосомы проницаемыми таким образом, что сенсибилизаторы и гидролитические ферменты высвобождаются в цитозоль (Dougherty et al., 1998).

При ФДТ в течение нескольких минут после воздействия света можно наблюдать

повреждение плазматической мембраны. Данный тип повреждения проявляется в набухании, вытекании содержимого из везикул, содержащих ферменты-маркеры плазматической мембраны, цитозольные ферменты и лизосомальные ферменты, снижении активного транспорта, деполяризации плазматической мембраны, ингибировании активности ферментов плазматической мембраны, изменении уровня внутриклеточного Ca^{2+} , положительной и отрицательной регуляции поверхностных антигенов, LPO, которые могут привести к перекрестному сшиванию и повреждению транспортеров многих препаратов (Dougherty et al., 1998).

Сообщения о том, что ФДТ может быстро индуцировать апоптоз, в условиях *in vitro* и *in vivo*, обеспечили понимание природы механизма гибели клеток под действием света. Понимание механизма апоптоза после ФДТ является результатом сообщений, указывающих на наличие связи между фотоповреждением митохондрий и апоптозом. Результаты недавно проведенных заявителями исследований показали, что фотосенсибилизаторы на основе Bchl индуцируют активацию апоптотического пути. Однако, вероятно, апоптоз не является причиной гибели клеток, поскольку ингибирование апоптотического пути не спасает клетки (Mazor et al., 2003, неопубликованные данные).

Цитируются следующие патенты и заявки на патент заявителей настоящего изобретения, содержание которых включено в полном объеме в данный документ для сведения: патент США №5726169, патент США №5650292, патент США №5955585, патент США №6147195, патент США №6740637, патент США №6333319, патент США №6569846, патент США №7045117, патент Германии 41 21 876, Европейский патент 1 246 826, WO 2004/045492, WO 2005/120573.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к конъюгату RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика и фотосенсибилизатора, выбранного из группы, состоящей из порфирина, хлорофилла и бактериохлорофилла, исключая конъюгаты, в которых фотосенсибилизатор является неметаллированным порфирином, замещенных, по меньшей мере, в каждом из положений 10, 15, 20 4-метилфенилом или ацетилованным глюкозилоксифенилом и в положении 5 остатком линейного RGD-содержащего пептида, связанного с порфириновым макроциклом через спейсер.

В одном варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет порфирин, предпочтительно тетраарилпорфирин. В другом варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет хлорофилл или бактериохлорофилл предпочтительно формул I, II и III.

Изобретение дополнительно относится к диагностической, терапевтической или радиотерапевтической композиции для визуализации, ФДТ или лучевой терапии тканей или органов, содержащей эффективное количество конъюгата фотосенсибилизатор-RGD-пептид по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Конъюгаты по изобретению можно использовать в способах диагностики опухолей с использованием различных диагностических методов и в способах фотодинамической терапии опухолей и сосудистых заболеваний и в лучевой терапии опухолей.

Краткое описание фигур

На фиг.1А-1С приведены характеристические спектры конъюгата 11. Фиг.1А: определение масс-спектрометрией. Фиг.1В: анализ спектрофотометрией. Фиг.1С:

результаты ВЭЖХ после синтеза (конъюгат 11 представляет пик под номером 3).

На фиг.2А-2С приведены характеристические спектры конъюгата 9. Фиг.2А: электронный спектр в ацетоне. Фиг.2В: масс-спектр: ESI-MS(+) 679(M), 702 (M+Na) m/z.

На фиг.3А-3В показана очистка и характеристика Eu-RGD-4С. Фиг.3А: хроматография Eu-RGD-4С (один пик). Фиг.3В: масс-спектрометрия (молекулярная масса изотиоцианатофенил-DTPA-Eu-RGD-4С=1498, стрелки).

На фиг.4 приведены результаты теста оценки связывания с рецептором.

Активность специфического связывания свободного Eu-RGD-4С с рецептором интегрин оценивали с использованием клеток H5V при отсутствии (общее связывание) или в присутствии 1 мкМ RGD-4С (неспецифическое связывание).

На фиг.5 показан анализ Scatchard связанного (В) или свободного (F) Eu-RGD-4С результатов теста оценки связывания с рецептором, которые приведены на фиг.4.

На фиг.6 приведены результаты твердофазного рецепторного теста, с помощью которого оценивали связывание Eu-RGD-4С с выделенным рецептором интегрин $\alpha_v\beta_3$. Использовали разрешенную во времени флуорометрию для определения флуоресценции.

На фиг.7А-7В показано действие RGD-4С на отделение эндотелиальных клеток H5V.

Морфологические изменения клеток регистрировали с использованием световой микроскопии. 5% округленных клеток (n=200) после инкубации при отсутствии (фиг.7А) и 99% таких клеток в присутствии RGD-4С (фиг.7В). После замещения среды на свежую порцию и инкубации в течение 3 ч при 37°C % округленных клеток (n=200) при отсутствии и в присутствии RGD-4С составил соответственно 6 и 8% (не показано).

На фиг.8 показано действие RGD-4С на отделение клеток HUVEC.

Морфологические изменения клеток регистрировали с использованием световой микроскопии. Верхние панели а-е представляют результаты фазово-контрастной микроскопии отделения клеток в присутствии RGD-4С в возрастающих концентрациях (а: контроль; b: 25 мкМ; c: 50 мкМ; d: 100 мкМ; e: 200 мкМ). На нижних панелях показано восстановление клеток через 24 ч после замены среды на свежую порцию.

На фиг.9 представлено поглощение клетками и локализация в клетках конъюгата 24 в эндотелиальных клетках H5V, что показано на транс-фотографиях (а), флуоресцентном снимке (b) (длина волны экстинкции: 520 нм; длина волны эмиссии: 780 нм) и при совмещении фотографии и снимка (с).

На фиг.10 приведена серия флуоресцентных снимков, показывающих поглощение клетками и локализацию в клетках конъюгата 24 и соединения 8 в эндотелиальных клетках H5V через 20 мин (верхние панели) или 2,5 ч (нижние панели) после инкубации с соединениями в среде, содержащей 10 или 75% FCS (длина волны экстинкции: 520 нм; длина волны эмиссии: 780 нм). а) соединение 8, 10% FCS; b) соединение 24, 10% FCS; c) соединение 8, 75% FCS; b) соединение 24, 75% FCS.

На фиг.11А-11D приведена серия графиков, показывающих биологическое распределение конъюгата 24, введенного в/в самцам голых мышей CD-1 с опухолевыми ксенотрансплантатами крысиной глиомы С6 (11А; на каждую временную точку приходилось 6 мышей), с мышшиной карциномой ободочной кишки СТ26luc (11В; на каждую временную точку приходилось 2 мыши) и с мышшиной карциномой молочной железы 4T1luc (11С; на каждую временную точку

приходилось 3 мыши), мышей убивали в указанные периоды времени. Концентрацию Pd в различных органах определяли ICP-MS. Прямоугольники представляют временные окна, наиболее подходящие для ФДТ и визуализации.

На фиг.12 показано биологическое распределение соединения 8, введенного в/в (в хвостовую вену) самцам голых мышей с опухолевыми ксенотрансплантатами крысиной глиомы C6, мышей убивали в указанные периоды времени. Концентрацию Pd определяли ICP-MS.

На фиг.13 показано биологическое распределение Си-конъюгата 15 у мышей с опухолью молочной железы MDA-MB-231. Животных убивали в указанные периоды времени. Концентрация Си показана на выбранные периоды времени, после вычитания значения на 0 время, в виде среднего значения по трем животным.

На фиг.14A-14B представлены графики, показывающие биологическое распределение конъюгата 42 (который содержит RAD-мотив), введенного в/в самцам голых мышей с опухолевыми трансплантатами мышшиной карциномы ободочной кишки CT26luc, мышей убивали в указанные периоды времени. Концентрацию Pd в различных органах определяли ICP-MS. На фиг.14A приведены результаты ICP-MS для конъюгата 42. На каждую временную точку приходилось 2 мыши. На фиг.14B приведены те же результаты с выделением определенных интересующих органов (кровь, опухоль, печень, почки и мышечная ткань) по сравнению с результатами, полученными для RGD-конъюгата 24 (см. фиг.11A-11D).

На фиг.15 приведено сравнение NIR флуоресцентного изображения целого тела после введения соединения 8 (верхние панели) или конъюгата 24. Данные снимки показывают флуоресценцию мыши с ксенотрансплантатом крысиной глиомы C6 на внутренней поверхности правой задней конечности (а) через 4 ч, (b) через 24 ч, (c) через 48 ч и (d) через 72 ч после введения конъюгата 24 или соединения 8 в дозе 200 нмоль. Опухоли указаны стрелками, и все снимки нормализованы к одному масштабу.

На фиг.16A-16C приведена фотография (16A), флуоресцентный снимок (16B) и люминесцентный снимок (люцифераза+люциферин; 16C) мыши с подкожным ксенотрансплантатом карциномы ободочной кишки CT26luc (трансфектированной люциферазой) на правой передней конечности через 24 ч после введения конъюгата 24 в дозе 200 нмоль. Флуоресцентные и люминесцентные снимки получали с использованием системы IVIS.

На фиг.17A-17C приведены фотографии (17A) и флуоресцентные снимки (17B) и биолюминесцентные снимки (17C) двух мышей с подкожными трансплантатами мышшиной карциномы молочной железы 4T1luc (трансфектированной люциферазой) на правой передней конечности через 24 ч после введения конъюгата 24 в дозе 200 нмоль.

На фиг.18 представлен флуоресцентный снимок мыши с ксенотрансплантатом карциномы яичников MLS через 8 (левая панель) и 14 ч (правая панель) после в/в введения конъюгата 31. Флуоресцентные и люминесцентные снимки получали с использованием системы IVIS.

На фиг.19 представлены флуоресцентные снимки двух мышей с ксенотрансплантатом крысиной глиомы C6 через 24 ч после введения одного конъюгата 24 (левая мышь) или через 1 ч после введения циклоRGDfK пептида в дозе 8,5 мкмоль (правая мышь). Каждую мышь снимали сверху (верхняя панель, слева) и сбоку (верхняя панель, справа). На фотографиях также показано электронное увеличение изображения (нижняя панель). Кружки на флуоресцентных

снимках указывают локализацию опухолевого ксенотрансплантата крысиной глиомы C6.

На фиг.20 приведены черно-белые фотографии (верхние панели) и флуоресцентные снимки (нижние панели) самцов голых мышей CD-1 с ксенотрансплантатами CT26luc на внутренней поверхности задней конечности через 24 ч после введения RGD-конъюгата 24 (панели а, с) или RAD-конъюгата 42 (панели b, d). Опухоли указаны стрелками, и все снимки нормализованы к одному масштабу. Флуоресцентные снимки делали с использованием системы IVIS.

На фиг.21 приведены черно-белые фотографии (верхние панели) и флуоресцентные снимки (нижние панели) мышей с ксенотрансплантатами (а) OVCAR 8, (b) CT26luc, (с) MLS и (d) 4T1luc на внутренней поверхности задней конечности через 24 ч после введения конъюгата 24. Опухоли указаны стрелками, и все снимки нормализованы к одному масштабу.

На фиг.22 приведена фотография (верхний снимок, снятый цифровой камерой) и флуоресцентный снимок (нижний снимок) местонахождения конъюгата 24 в метастазах легких опухоли молочной железы 4T1luc у мыши-самки BALB/c через 24 ч после в/в введения конъюгата 24 (в дозе 15 мг/кг). Сигнал NIR флуоресценции от местонахождения конъюгата 24, зарегистрированный с использованием системы Imaging System Xenogen IVIS® 100.

На фиг.23А-23I приведена серия фотографий (а), биолуминесцентных (b) и флуоресцентных (с) снимков метастазов CT26luc в легких у самцов голых мышей CD-1 через 24 ч (А,В), 9 ч (С,Д), 4 ч (Е,Ф) после в/в введения конъюгата 24 (в дозе 15 мг/кг). Снимки G, H представляют изображение метастазов CT26luc в легких у самцов голых мышей CD-1, которым не вводили конъюгат. На снимке I самцы голых мышей CD-1 без метастазов легких через 24 ч после в/в введения конъюгата 24. Средний снимок представляет сигнал биолуминесценции, воспроизведенный в результате взаимодействия люциферина с трансфектированными люциферазой опухолевыми клетками. На правом снимке сигнал NIR флуоресценции, происходящий от конъюгата 24, полученный с использованием системы Imaging System Xenogen IVIS® 100. Стрелки указывают на метастазы легких.

На фиг.24 приведены черно-белые фотографии (а), биолуминесцентные (b) и флуоресцентные (с) снимки самцов голых мышей с первичной опухолью на внутренней поверхности левой конечности и метастазами в области около лимфатического узла через 24 ч после в/в введения конъюгата 24 (в дозе 15 мг/кг). Средний снимок представляет сигнал биолуминесценции, воспроизведенный в результате взаимодействия люциферина с трансфектированными люциферазой опухолевыми клетками. На правом снимке сигнал NIR флуоресценции, происходящий от конъюгата 24, с использованием системы Imaging System Xenogen IVIS® 100. Стрелки указывают на метастазы в лимфатических узлах.

На фиг.25А-25С показана кривая зависимости доза-эффект на клетках H5V, инкубированных в течение 90 мин при 37°C с конъюгатом 23 и соединением 10 в концентрации 0-25 мкМ в различных средах: 10% FCS в среде (фиг.25А), культуральной среде DMEM/F12 (фиг.25В) или 10 мкМ BSA в среде (фиг.25С). Выживаемость клеток определяли с использованием теста оценки жизнеспособности с окрашиванием нейтральным красным. Точки представляют средние результаты по трем значениям.

На фиг.26А-26D показаны кривые зависимости доза-эффект на клетках H5V, инкубированных в течение 90 мин при 37°C с соединением 10 (фиг.26А, 26В) или

конъюгатом 23 (фиг.26С, 26D) в концентрации 0-25 мкМ при отсутствии или в присутствии избытка свободного циклоRGDfK (от 100-кратного до 1 мМ) в различных средах (10% FCS в среде (фиг.26А, 27С) или 10 мкМ BSA в среде (фиг.26В, 26D)). Выживаемость клеток определяли с использованием теста оценки жизнеспособности с окрашиванием нейтральным красным. Точки представляют средние результаты по трем значениям.

На фиг.27А-27В показаны кривые зависимости доза-эффект на клетках H5V, инкубированных в течение 15 мин при 37°C (фиг.27А) или 4°C (фиг.27В) с конъюгатом 23 в концентрации 0-20 мкМ в 10% FCS в среде при отсутствии или в присутствии избытка свободного циклоRGDfK (от 100-кратного до 1 мМ).

Выживаемость клеток определяли с использованием теста оценки жизнеспособности с окрашиванием нейтральным красным. Точки представляют средние результаты по трем значениям.

На фиг.28 показана кривая зависимости доза-эффект на клетках H5V, инкубированных в течение 2 ч при 37°C с конъюгатом 24 в концентрации 0-25 мкМ в культуральной среде DMEM/F12 с 10% FCS. Выживаемость клеток определяли с использованием теста с нейтральным красным. Точки представляют средние результаты по трем значениям.

На фиг.29 показана кривая зависимости доза-эффект на клетках H5V, инкубированных в течение 90 мин при 37°C с конъюгатом 11 или соединением 8 (Pd-MLT) в концентрации 0-20 мкМ в 10 мкМ BSA в среде. Выживаемость клеток определяли с использованием теста оценки жизнеспособности с окрашиванием нейтральным красным. Точки представляют средние результаты по трем значениям.

На фиг.30А-30В показаны кривые зависимости доза-эффект на клетках H5V, инкубированных в течение 90 мин при 37°C с конъюгатом 11 (фиг.30А) или соединением 8 (фиг.30В) в концентрации 0-10 мкМ в 10 мкМ BSA в среде при отсутствии или в присутствии избытка RGD-4С (1 мМ). Выживаемость клеток определяли с использованием теста оценки жизнеспособности с окрашиванием нейтральным красным. Точки представляют средние результаты по трем значениям.

На фиг.31А-31Е приведены изображения опухолевых ксенотрансплантатов глиомы С6, обработанных конъюгатом 24 или соединением 8. Самцов голых мышей CD-1 с ксенотрансплантатами глиомы С6 обрабатывали следующим образом: 31А - конъюгат 24 в/в вводили в дозе 15 мг/кг, 15 мин облучение светом (90 Дж/см²) через 8 ч после введения препарата; верхние панели: (а) перед ФДТ; (b) через 2 суток после ФДТ; (с) через 3 суток после ФДТ; (d) через 4 суток после ФДТ; нижние панели: (а) через 7 суток после ФДТ; (b) через 9 суток после ФДТ; (с) через 14 суток после ФДТ; (d) через 18 суток после ФДТ. 31В - конъюгат 24 в/в вводили в дозе 24 мг/кг, 10 мин облучение светом (60 Дж/см²) через 8 ч после введения препарата; а, b, с и d в верхних и нижних панелях, как для фиг.31А. 31С - темновой контроль - конъюгат 24 в/в вводили без облучения светом; (а) перед ФДТ; (b) через 5 суток после ФДТ. 31D - световой контроль - облучение светом без введения фотосенсибилизатора; (а) перед ФДТ; (b) через 5 суток после ФДТ. 31Е - контроль неконъюгированный фотосенсибилизатор - соединение 8 в/в вводили в дозе 9 мг/кг, 10 мин облучение светом (60 Дж/см²) через 8 ч после введения препарата; (а) перед ФДТ; (b) через 11 суток после ФДТ. Снимки делали в указанные периоды времени после ФДТ.

На фиг.32А-Е представлены результаты терапии при применении конъюгата 24 в дозе 15 мг/кг, 10 мин облучение светом (60 Дж/см²) через 8 ч после введения

препарата мышам с опухолями СТ26luc. 32A - конъюгат 24 в/в вводили мышам в дозе 15 мг/кг, 10 мин облучение светом (60 Дж/см^2) через 8 ч после введения препарата; (a) перед ФДТ; (b) через 1 сутки после ФДТ; (c) через 4 суток после ФДТ; (d) через 8 суток после ФДТ; (e) через 12 суток после ФДТ; (f) через 19 суток после ФДТ. 32B - совмещенные снимки, сделанные после в/в введения люциферина мыши, описанной для фиг.32A, с использованием системы IVIS. Первый снимок черно-белый, который представляет фотографию животного. Второй снимок цветное совмещение испущенных фотонов. Все снимки нормализованы к одному масштабу; (a) перед ФДТ; (b) через 1 сутки после ФДТ; (c) через 4 суток после ФДТ; (d) через 8 суток после ФДТ. 32C - количественное определение сигнала биолуминесценции (фотон/сек/см²) по данным, приведенным на фиг.32B. 32D - контроль с одним соединением 8: мышам в/в вводили соединение 8 и через 8 ч облучали светом; (a) перед ФДТ; (b) через 2 суток после ФДТ. 32E - контроль со смесью соединения 8 и циклоRGDfK: мышам в/в вводили смесь соединения 8 с циклоRGDfK и через 8 ч облучали светом; (a) перед ФДТ; (b) через 2 суток после ФДТ. 32F- контроль с одним циклоRGDfK: мышам в/в вводили циклоRGDfK и через 8 ч облучали светом; (a) перед ФДТ; (b) через 2 суток после ФДТ. Снимки делали в указанные периоды времени после ФДТ.

На фиг.33 представлена кривая Kaplan-Mayer для протоколов, приведенных в таблице 5, отмеченных звездочкой.

На фиг.34A-34B показан флуоресцентный клон карциномы молочной железы MDA-MB-231-RFP (резистентный к гигромицину) соответственно после экспозиции в течение 1 и 3 сек.

На фиг.35A-35B показаны два показательных примера локальной реакции человеческой карциномы молочной железы MDA-MB-231-RFP к ФДТ. Мышам с ксенотрансплантатами MDA-MB-231-RFP ($\sim 0,5 \text{ см}^3$) в области спины в/в вводили конъюгат 13 в дозе 7,5 мг/кг и облучали светом через 8 ч через кожу. 35A - фотографии, сделанные на (a) 0 сутки (перед обработкой) и после обработки на (b) 1, (c) 4, (d) 7, (e) 12 и (f) 90 сутки. На 4 сутки имел место частичный некроз, на 7 суток опухоли становились плоскими, через 90 суток рана заживала и животное выздоравливало. Справа фотографии мыши на 0 сутки и через 90 суток. 35B - красное флуоресцентное изображение всего тела самцов голых мышей CD-1 с ортотопической опухолью MDA-MB-231-RFP. Фотографии сделаны в те же периоды времени, что и приведенные на фиг.35A. Через 90 суток после обработки сигнал отсутствовал.

На фиг.36 показано накопление конъюгата 13 в ортотопической человеческой первичной опухоли молочной железы MDA-MB-231-RFP (размер опухолей $\sim 1 \text{ см}^3$). Снимки делали в период от 15 мин до 24 ч после введения препарата. Верхние панели - красное флуоресцентное изображение целого тела самок голых мышей с ортотопической опухолью MDA-MB-231-RFP. Нижние панели - NIR флуоресцентное изображение целого тела самок голых мышей по накоплению конъюгата 13. Отсутствовало специфическое накопление препарата в опухоли в течение первых 24 ч. a-i - 15 мин; 1 ч; 2 ч; 3 ч; 4,5 ч; 6 ч; 7,5 ч; 9 ч; 24 ч.

На фиг.37 показано накопление конъюгата 13 в ортотопической человеческой первичной опухоли молочной железы MDA-MB-231-RFP (размер опухолей $\sim 1 \text{ см}^3$). Снимки делали в период от 1 до 6 суток после введения препарата. Верхние панели - красное флуоресцентное изображение целого тела самок голых мышей с ортотопической опухолью MDA-MB-231-RFP. Нижние панели - NIR флуоресцентное

изображение целого тела самок голых мышей по накоплению конъюгата 13. Имело место накопление препарата в опухоли с максимальной концентрацией в опухоли, начиная со 2 суток после введения препарата. а-і - 1 ч; 9 ч; 1 сутки; 2 суток; 3 суток; 4 суток; 5 суток; 6 суток; 7 суток.

5 Подробное описание изобретения

В широком аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату фотосенсибилизатора, выбранного из порфирина, хлорофилла (Chl) и бактериохлорофилла (BChl), и RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика.

Одной целью настоящего изобретения является обеспечение конъюгатов фотосенсибилизаторов, которые специфически направляют сенсибилизатор к сосудистой сети опухоли. Имеются некоторые преимущества для направленной доставки фотосенсибилизаторов к сосудам по сравнению с направленной доставкой к сосудам обычных химиотерапевтических препаратов. Первое, во время накопления доставленного обычного лекарственного препарата он большей частью бывает активным, если только это не пролекарство, в то время как доставленный фотосенсибилизатор не является активным, пока это место не будет облучено светом. Второе, направленно доставленный обычный лекарственный препарат будет связываться и функционировать на нежелательных мишенях, представляющих собой адресат хоминга, в то время как направленный фотосенсибилизатор будет активироваться только в облученном светом месте. Кроме того, ФДТ с направленными фотосенсибилизаторами к неоваскулярным эндотелиальным клеткам в опухоли может быть высокоизбирательной в индукции фотодинамического повреждения ЕС.

Сообщалось, что интегрин $\alpha_v\beta_3$ играет важную роль в метастазировании и ангиогенезе опухоли, что включает рост новых сосудов из ранее существующей сосудистой сети во время роста опухоли. Данный интегрин может быть хорошим маркером роста и распространения опухоли. Следовательно, неинвазивные методы визуализации для визуального контроля экспрессии $\alpha_v\beta_3$ в режиме реального времени обеспечивают возможность оценки терапевтического вмешательства, а также детектирования метастазирования.

Интегрины связывают внутриклеточный цитоскелет клеток с внеклеточным матриксом посредством распознавания RGD. RGD-пептиды взаимодействуют с рецепторными сайтами интегрин, что может инициировать сигнальные процессы в клетке и оказывать влияние на многие различные заболевания. Таким образом, сайт связывания интегрин с RGD представляет собой привлекательную фармацевтическую мишень. Интегрин $\alpha_v\beta_3$ имеет сайт связывания с RGD и пептидами, содержащими последовательность RGD, и взаимодействует в качестве антагонистов интегрин $\alpha_v\beta_3$. Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения RGD-содержащий пептид является антагонистом рецептора интегрин.

В бифункциональных конъюгатах по изобретению свойство хоминга обеспечивается RGD-содержащим пептидом, в то время как ФДТ эффект обеспечивается фотосенсибилизатором. Данные конъюгаты должны быть способными направленно доставлять сенсибилизатор к новым сосудам первичных солидных опухолей и, возможно, соответствующим метастазам для диагностики и фотодинамического разрушения. Дополнительно они могут функционировать в качестве антиангиогенных средств и инициировать разрушение апоптозом новых

эндотелиальных и опухолевых клеток, подвергающихся воздействию крови.

Термины «RGD-содержащий пептид» или «RGD-пептид» используются в данном документе взаимозаменяемо и означают пептид, содержащий последовательность RGD, также относящуюся к RGD-мотиву. В том смысле, в котором термин «RGD-пептидомиметик» используется в данном документе, то он относится к соединениям, в частности к соединениям, не относящимся к пептидам, которые являются миметиками пептидов с RGD-мотивом.

RGD-содержащий пептид может представлять собой линейный или циклический пептид, состоящий из 4-100, предпочтительно из 5-50, 5-30, 5-20 или более предпочтительно из 5-10 аминокислотных остатков. В предпочтительных вариантах осуществления RGD-пептид состоит из 4, 5, 6, 7, 9 или 25, наиболее предпочтительно 5 аминокислотных остатков.

В том смысле, в котором термин «аминокислота» используется в данном документе, то он включает 20 природных аминокислот, а также аминокислоты, не относящиеся к природным.

Примеры природных аминокислот, подходящих для изобретения, включают, но не ограничиваются этим, Ala, Arg, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr и Val.

Примеры аминокислот, не относящихся к природным, включают, но не ограничиваются этим, 4-аминомасляную кислоту (Abu), 2-аминоадипиновую кислоту, диаминопропионовую кислоту (Dap), оксипролин, гомосерин, гомовалин, гомолейцин, норлейцин (Nle), норвалин (Nva), орнитин (Orn), Tlc, нафтилаланин (Nal), производные Phe с метилированным циклом, галогенированные производные Phe или о-метил-Тур.

В том смысле, в котором термин «аминокислота» используется в данном документе, то он также включает модифицированные аминокислоты, такие как модификации, которые имеют место после трансляции в условиях *in vivo*, например, оксипролин, фосфосерин и фосфотреонин; D-модификации; N-алкилирование, предпочтительно N-метилирование, пептидной связи; ацилирование или алкилирование концевой аминогруппы или свободной аминогруппы Lys; эстерификация или амидирование концевой карбоксильной группы или свободной аминогруппы Asp или Glu; и эстерификация или этерификация гидроксильной группы Ser или Тур.

Термин «аминокислота» включает D- и L-аминокислоты. Таким образом, пептиды, используемые в конъюгатах по изобретению, могут представлять собой полностью-D (за исключением глицина), полностью-L или L,D-аминокислоты. D-модификации, а также N-алкилирование пептидной связи являются наиболее предпочтительными в том отношении, что они предупреждают расщепление пептидов под действием ферментов в организме. В настоящем изобретении D-аминокислота обозначается маленькой буквой, как остаток D-фенилаланина буквой «f» в пептиде циклоRGDfK в последовательности SEQ ID NO:1, использованной в данном документе.

Настоящее изобретение также включает циклические пептиды. Пептиды можно подвергнуть циклизации с использованием различных методов, таких как образование дисульфидов, сульфидов и особенно образование лактамов между карбоксильной группой и аминогруппой N- и C-концов или боковых цепей аминокислот. Циклизацию можно проводить любым методом, известным в данной области, например, посредством образования амидной связи, например,

введением Glu, Asp, Lys, Orn, диаминомасляной (Dab) кислоты, диаминопропионовой (Dap) кислоты в различные положения в цепи (-CO-NH или -NH-CO связи). Также циклизацию скелет к скелету можно провести посредством включения модифицированных аминокислот формул $H-N(CH_2)_n-(COOH)-C(R)H-COOH$ или $H-N((CH_2)_n-NH_2)-C(R)H-COOH$, в которых $n=1-4$, и дополнительно в которых R представляет природную или не природную боковую цепь аминокислоты.

Циклизацию также можно провести посредством образования S-S-связей через включение двух остатков цистеина. Циклизацию дополнительной боковой цепи к боковой цепи можно получить посредством образования связи взаимодействия формулы $-(CH_2)_n-S-CH_2-CO-$, в которой $n=1$ или 2, которое возможно, например, при включении Cys или гомоCys и взаимодействии его свободной SH-группы, например с бромацетилированным Lys, Orn, Dab или Dap.

В некоторых вариантах осуществления RGD-пептиды могут представлять собой таковые, описанные в патенте US №6576239 и Европейском патенте 0927045, которые включены в данный документ в полном объеме для сведения.

В одном предпочтительном варианте осуществления пептид, использованный по изобретению, представляет циклический пентапептид RGDfK с последовательностью SEQ ID NO:1, в которой «f» обозначает остаток D-Phe.

В другом предпочтительном варианте осуществления пептид представляет циклический нонапептид CDCRGDCGC с последовательностью SEQ ID NO:2, обозначенный в данном документе как «RGD-4C», который содержит четыре остатка цистеина, образующих две дисульфидные связи в молекуле, и он является одним из перспективных пептидов со специфичностью по отношению к интегринам. Было показано, что данный пептид является избирательным и сильным лигандом (константа аффинности равняется ~ 100 nM) интегринов $\alpha_v\beta_5$ и $\alpha_v\beta_3$ (Ruoslahti, 2002; Elceiri and Cheresch, 1999).

Остаток аспарагиновой кислоты RGD-мотива является очень чувствительным к химической деградации, приводящей к потере биологической активности, и данную деградацию можно предупредить циклизацией посредством образования дисульфидной связи (Bogdanowich-Knipp et al., 1999). Наряду с повышенной стабильностью двойные циклические пептиды проявляют более высокую эффективность по сравнению с пептидами, содержащими одну дисульфидную связь, и линейными пептидами в отношении ингибирования присоединения витронектина к клеткам. Высокая активность двойного циклического RGD-пептида, вероятно, обеспечивается за счет соответствующим образом ограниченной конформации не только RGD-мотива, но также и фланкирующих аминокислот. Количество и природа остатков, фланкирующих последовательность RGD в синтетических пептидах, имеет большое влияние на то, как последовательность распознается отдельными рецепторами интегрин (Koivunen et al., 1995; Pierschbacher and Ruoslahti, 1987). Ароматический остаток может иметь особое значение для воспроизведения благоприятного контактирования со связывающим сайтом интегрин (Koivunen et al., 1995). Циклические RGD-пептиды с направленным действием к интегринам $\alpha_v\beta_3$ подвергаются интернализации интегрином независимым эндоцитозом в жидкой фазе, который не приводит к изменению числа функциональных рецепторов интегрин на клеточной поверхности. Кроме того, циклические пептиды остаются или разрушаются в лизосомах в результате процесса, который достигает насыщения через 15 мин, и только небольшая их часть может выйти из лизосом и достичь цитоплазмы клетки. Это объясняет, почему циклические RGD-пептиды

обнаруживаются в клеточной цитоплазме только через определенный период времени (48-72 ч) (Hart et al., 1994; Castel et al., 2001).

В других предпочтительных вариантах осуществления RGD-пептид выбран из циклических пептидов: i) тетрапептида циклоRGDK (SEQ ID NO:4),
 5 пентапептида RGDf-n(Me)K (SEQ ID NO:7), в которых f обозначает D-Phe и пептидная связь между f и K метилирована; пентапептида циклоRGDyk (SEQ ID NO:8), в котором y обозначает D-Tyr.

В другом варианте осуществления RGD-содержащий пептид является линейным и
 10 может быть выбран из гексапептида GRGDSP (SEQ ID NO:3), гептапептида GRGDSPK (SEQ ID NO:5) и 25-мерного пептида (GRGDSP)₄K (SEQ ID NO:7).

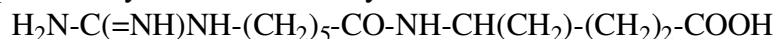
В одном варианте осуществления RGD-пептид непосредственно связан с макроциклом фотосенсибилизатора порфирина, хлорофилла или
 15 бактериохлорофилла посредством функциональной группы в его периферийной части, например COOH, образующей амид CO-NH₂ группы, с концевой аминогруппой или свободной аминогруппой RGD-пептида.

В другом варианте осуществления RGD-пептид связан с макроциклом фотосенсибилизатора посредством спейсера/мостиковой группы, такой как, но не
 20 ограничиваясь этим, C₁-C₂₅гидрокарбилен, предпочтительно C₁-C₁₀алкилен или фенилен, замещенной концевой функциональной группой, такой как OH, COOH, SO₃H, COSH или NH₂, с образованием простого эфира, сложного эфира, амида, тиамида или сульфонида.

В некоторых вариантах осуществления фотосенсибилизатор конъюгирован с RGD-
 25 пептидомиметиком.

В одном предпочтительном варианте осуществления RGD-пептидомиметик представляет соединение, не относящееся к пептидам, содержащее гуанидин и концевые карбоксильные группы, пространственно разделенные цепью из 11
 30 атомов, по меньшей мере, 5 из указанных атомов являются атомами углерода, и указанная цепь содержит один или более атомов O, S или N и может быть необязательно замещена оксо, тиоксо, атомом галогена, амино, C₁-C₆алкилом, гидроксилем или карбокси, или один или более атомов указанной цепи может образовать 3-6-членное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо.
 35 Соединения данного типа описаны в заявке WO 93/09795 того же заявителя, которая включена в данный документ в полном объеме для сведения.

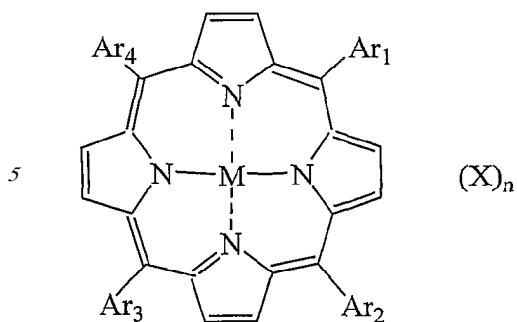
В предпочтительных вариантах осуществления RGD-пептидомиметик, приведенный выше, содержит в цепи атомы N и он замещен оксогруппой. В более
 40 предпочтительном варианте осуществления RGD-пептидомиметик имеет формулу, приведенную в данном документе для конъюгата 40:



В другом варианте осуществления RGD-пептидомиметик имеет формулу, приведенную в данном документе для конъюгата 41.

В одном варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет порфирин, который может быть металлизированным или неметаллизированным и необязательно замещен в периферийной области различными заместителями, такими как алкил,
 45 арил, гетероарил и/или функциональные группы. В предпочтительных вариантах осуществления порфириновый макроцикл замещен 4 арильными группами в положениях 5, 10, 15, 20.

В одном предпочтительном варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет тетраарилпорфирин формулы:



в которой

Ar₁, Ar₂, Ar₃ и Ar₄, одинаковые или различные, каждый представляет арил, выбранный из карбоциклического арила, гетероарила и смешанной группы карбоарил-гетероарил, каждая из арильных групп является незамещенной или
 15 замещена одним или более заместителями, выбранными из атомов галогена, C₂-C₈алкила, когда арил является фенилом, C₁-C₈алкила, когда арил является гетероарилом или смешанной группой карбоарил-гетероарил, C₁-C₈алкокси, карбокси, C₁-C₈алкиламино, амино(C₁-C₈)алкиламино, три(C₁-C₈)алкиламмония, гидроксид и CONH₂ и, по меньшей мере, один из Ar₁, Ar₂, Ar₃ и Ar₄ замещен RGD-содержащим пептидом или RGD-пептидомиметиком, связанным, по меньшей мере, с
 20 одной указанной арильной группой через один из его заместителей или через мостиковую группу;

n равно 0, когда заместители являются нейтральными, или n равно целому числу в
 25 пределах от 1 до 4;

X представляет фармацевтически приемлемый анион, когда арильные группы заряжены положительно, или фармацевтически приемлемый катион, когда арильные группы заряжены отрицательно; и

M представляет 2H или является атомом, выбранным из группы, состоящей из Mg, Pd, Pt, Co, Ni, Sn, Cu, Zn, Mn, In, Eu, Fe, Au, Al, Gd, Er, Yb, Lu, Ga, Y, Rh, Ru, Si, Ge, Cr, Mo, P, Re, Tl и Tc и их изотопов.

Карбоциклический арил, самостоятельно или как часть смешанной группы карбоарил-гетероарил, может представлять замещенную или незамещенную
 35 моноциклическую или бициклическую ароматическую группу, и указанный гетероарил, самостоятельно или как часть смешанной группы карбоарил-гетероарил, может представлять замещенное или незамещенное 5-6-членное ароматическое кольцо, содержащее 1-3 гетероатомов, выбранных из O, S и/или N.

Примеры карбоциклического арила включают фенил, бифенил, нафтил, и
 40 примеры гетероарила включают фурил, тиенил, пирролил, имидазолил, тиазолил, пиридил, пиримидил и триазинил. Карбоциклический арил и/или гетероарил могут быть незамещены или замещены одним или более атомов галогена, C₁-C₈алкилом, C₁-C₈алкокси, карбокси, C₁-C₈алкиламино, амино(C₁-C₈)алкиламино, три(C₁-C₈)алкиламмонием, гидроксид, CONH₂, при условии, что M не является 2H, когда карбоциклический арил представляет фенил, замещенный метилом, или тетраацетилглюкозилокси, и RGD-пептид является линейным.

В тетраарилпорфиринах, представленных выше, M предпочтительно
 50 представляет 2H, Pd, Cu, Mn или Gd.

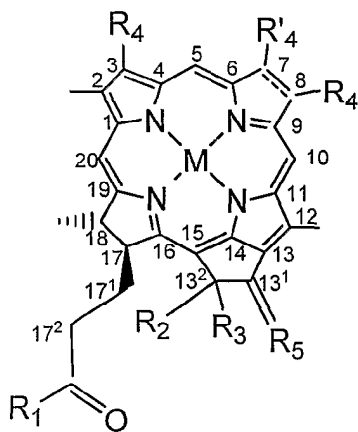
В одном предпочтительно варианте осуществления RGD-пептид в конъюгате, содержащем порфириновый фотосенсибилизатор, представляет пептид с последовательностью SEQ ID NO:1, предпочтительно связанный, по меньшей мере, с

одним арилом порфиринового фрагмента группы через -CO-NH-группу.

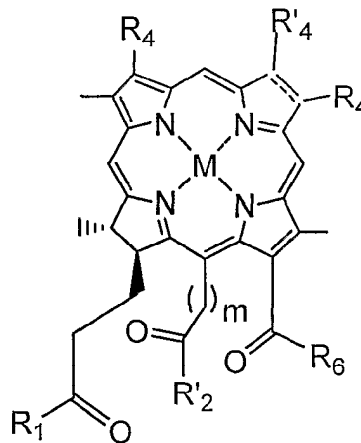
В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты RGD-пептид-порфирин содержат неметаллированный или металлированный тетраарилпорфирин, конъюгированный с пептидом с последовательностью SEQ ID NO:1: мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфин (конъюгат 20); медь (II) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфин (конъюгат 21) и гадолиний (III) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфин (конъюгат 22).

В другом варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет производное хлорофилла или бактериохлорофилла, которое может быть природным или синтетическим неприродным производным хлорофилла или бактериохлорофилла, включая соединения, в которых произведены модификации в макроцикле и/или в периферийной области, и/или центральный атом Mg может отсутствовать или может быть замещен на атом другого металла, подходящий для диагностики и/или ФДТ.

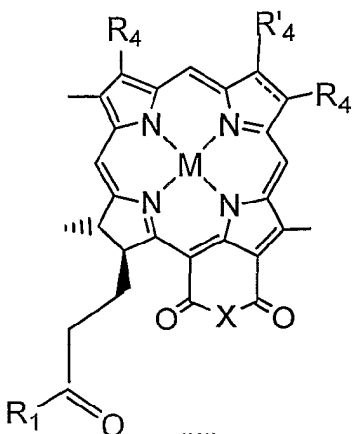
В предпочтительных вариантах осуществления изобретение относится к конъюгату, в котором фотосенсибилизатор является хлорофиллом или бактериохлорофиллом формул I, II или III:



(I)



(II)



(III)

в которых

M представляет 2H или атом, выбранный из группы, состоящей из Mg, Pd, Pt, Co, Ni, Sn, Cu, Zn, Mn, In, Eu, Fe, Au, Al, Gd, Er, Yb, Lu, Ga, Y, Rh, Ru, Si, Ge, Cr, Mo, P, Re, Tc и их изотопов;

X представляет O или N-R₇;

R₁, R'₂ и R₆ каждый независимо представляет Y-R₈, -NR₉R'₉ или -N⁺R₉R'₉R''₉A⁻;

или R_1 и R_6 в формуле II вместе с атомами углерода, с которыми они связаны, образуют цикл, содержащий RGD-пептид или RGD-пептидомиметик;

Y представляет O или S;

R_2 является H, OH или $COOR_9$;

R_3 представляет H, OH, C_1 - C_{12} алкил или C_1 - C_{12} алкокси;

R_4 представляет $-CH=CR_9R'_9$, $-CH=CR_9Hal$, $-CH=CH-CH_2-NR_9R'_9$, $-CH=CH-CH_2-N^+R_9R'_9R''_9A^-$, $-CHO$, $-CH=NR_9$, $-CH=N^+R_9R'_9A^-$, $-CH_2-OR_9$, $-CH_2-SR_9$, $-CH_2-Hal$, $-CH_2-R_9$, $-CH_2-NR_9R'_9$, $-CH_2-N^+R_9R'_9R''_9A^-$, $-CH_2-CH_2R_9$, $-CH_2-CH_2Hal$, $-CH_2-CH_2OR_9$, $-CH_2-CH_2SR_9$, $-CH_2-CH_2-NR_9R'_9$, $-CH_2-CH_2-N^+R_9R'_9R''_9A^-$, $-COCH_3$, $C(CH_3)=CR_9R'_9$, $-C(CH_3)=CR_9Hal$, $-C(CH_3)=NR_9$, $-CH(CH_3)=N^+R_9R'_9A^-$, $-CH(CH_3)-Hal$, $-CH(CH_3)-OR_9$, $-CH(CH_3)-SR_9$, $-CH(CH_3)-NR_9R'_9$, $-CH(CH_3)-N^+R_9R'_9R''_9A^-$ или $-C\equiv CR_9$;

R'_4 представляет метил или формил;

R_5 представляет $=O$, $=S$, $=N-R_9$, $=N^+R_9R'_9A^-$, $=CR_9R'_9$ или $=CR_9Hal$;

R_7 , R_8 , R_9 , R'_9 и R''_9 каждый независимо представляет:

a) H;

b) C_1 - C_{25} гидрокарбил;

c) C_1 - C_{25} гидрокарбил, предпочтительно C_1 - C_{25} алкил, алкенил или алкинил, более предпочтительно C_1 - C_{10} или C_1 - C_6 алкил, замещенный одной или более функциональными группами, выбранными из группы, состоящей из атома галогена, нитро, оксо, OR, SR, эпокси, эпитио, $--NRR'$, $-CONRR'$, $-CONR-NRR'$, $-NHCONRR'$, $-NHCONRNR'$, $-COR$, $COOR''$, $-OSO_3R$, $-SO_3R''$, $-SO_2R$, $-NHSO_2R$, $-SO_2NRR'$, $=N-OR$, $-(CH_2)_n-CO-NRR'$, $-O-(CH_2)_n-OR$, $-O-(CH_2)_n-O-(CH_2)_n-R$, $-OPO_3RR'$, $-PO_2HR$ и $-PO_3R''R''$, где R и R' каждый независимо представляет H, гидрокарбил или гетероцикл, и R'' является гидрокарбилом или гетероциклилом;

d) C_1 - C_{25} гидрокарбил, предпочтительно C_1 - C_{25} алкил, более предпочтительно C_1 - C_{10} или C_1 - C_6 алкил, замещенный одной или более функциональными группами, выбранными из группы, состоящей из положительно заряженных групп, отрицательно заряженных групп, основных групп, которые превращаются в положительно заряженные группы в физиологических условиях, и кислотных групп, которые превращаются в отрицательно заряженные группы в физиологических условиях;

e) C_1 - C_{25} гидрокарбил, предпочтительно C_1 - C_{25} алкил, более предпочтительно C_1 - C_{10} или C_1 - C_6 алкил, содержащий один или более гетероатомов и/или одну или более карбоциклических или гетероциклических групп;

f) C_1 - C_{25} гидрокарбил, предпочтительно C_1 - C_{25} алкил, более предпочтительно C_1 - C_{10} или C_1 - C_6 алкил, содержащий один или более гетероатомов и/или одну или более карбоциклических или гетероциклических групп и замещенный одной или более функциональными группами, имеющими значения, определенные в п.п. c) и d) выше;

g) C_1 - C_{25} гидрокарбил, предпочтительно C_1 - C_{25} алкил, более предпочтительно C_1 - C_{10} или C_1 - C_6 алкил, замещенный остатком аминокислоты, пептида, белка, моносахарида, олигосахарида, полисахарида, или полидентатом-лигандом и его хелатным комплексом с металлами; или

h) остаток аминокислоты, пептида, белка, моносахарида, олигосахарида, полисахарида, или полидентат-лиганд и его хелатный комплекс с металлами;

R_7 может дополнительно представлять $-NRR'$, где R и R' каждый является H или C_1 - C_{25} гидрокарбилом, предпочтительно C_1 - C_{25} алкилом, более предпочтительно C_1 - C_{10}

или C₁-C₆алкилом, необязательно замещенным отрицательно заряженной группой, предпочтительно SO₃⁻;

R₈ может дополнительно представлять H⁺ или катион R⁺₁₀, когда R₁, R'₂ и R₆ каждый независимо является Y-R₈;

R⁺₁₀ представляет металл, аммоний или органический катион;

A⁻ является физиологически приемлемым анионом;

m равно 0 или 1;

пунктирная линия в положениях 7-8 представляет необязательную двойную связь;

и его фармацевтически приемлемые соли и оптические изомеры; и указанное производное хлорофилла или бактериохлорофилла формул I, II или III содержит, по меньшей мере, один остаток RGD-содержащего пептида.

В одном варианте осуществления пунктирная линия в положениях 7-8 представляет двойную связь, и фотосенсибилизатор является хлорофиллом формулы I, II или III. Соединения формулы I, в которой M представляет Mg, R₁ в положении 17³ представляет фитилокси, R₂ в положении 13² представляет COOCH₃, R₃ в положении 13² является атомом H, R₅ представляет O, R₄ в положении 3 является винилом, пунктирная линия в положениях 7-8 представляет двойную связь, и один из R'₄ является метилом в положении 7, и R₄ является этилом в положении 8, или R'₄ представляет формил в положении 7, и R₄ представляет этил в положении 8, представляют хлорофилл соответственно а или b, и их производные будут содержать различные атомы металла и/или различные заместители R₁, R₂, R₃, R₄, R'₄ и/или R₅.

В другом варианте осуществления положения 7-8 гидрированы, и фотосенсибилизатор является бактериохлорофиллом формул I, II или III. Соединения формулы I, в которой M представляет Mg, R₁ в положении 17³ представляет фитилокси или геранилгеранилокси, R₂ в положении 13² представляет COOCH₃, R₃ в положении 13² является атомом H, R₅ представляет O, R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом, и пунктирная линия в положениях 7-8 отсутствует, представляют бактериохлорофилла, и их производные будут содержать различные атомы металла и/или различные заместители R₁, R₂, R₃, R₄ и/или R₅.

В том смысле, в котором термин «гидрокарбил» используется в данном документе, то он означает любые прямые или разветвленные, насыщенные или ненасыщенные, ациклические или циклические, включая ароматические, гидрокарбильные группы из 1-25 атомов углерода, предпочтительно 1-20, более предпочтительно 1-6, наиболее предпочтительно 2-3 атомов углерода. Гидрокарбил может быть алкилом, предпочтительно из 1-4 атомов углерода, например, метилом, этилом, пропилом, бутилом, или алкенилом, алкинилом, циклоалкилом, арилом, таким как фенил, или аралкилом, таким как бензил, или в положении 17 представляет группу, полученную из природного Chl и Bchl, например, геранилгеранил(2,6-диметил-2,6-октадиенил) или фитил(2,6,10,14-тетраметилгексадек-14-ен-16-ил).

В том смысле, в котором термин «карбоциклическая группа» используется в данном документе, то он относится к моноциклическому или полициклическому соединению, содержащему только одни атомы углерода в цикле(ах).

Карбоциклическая группа может быть насыщенной, т.е. циклоалкилом, или ненасыщенной, т.е. циклоалкенилом, или ароматической, т.е. арилом.

В том смысле, в котором термин «алкокси» используется в данном документе, то

он относится к группе (C₁-C₂₅)алкил-О-, где C₁-C₂₅алкил имеет значения, определенные выше. Примерами алкокси являются метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, бутокси, изобутокси, трет-бутокси, пентокси, гексокси, -OC₁₅H₃₁, -OC₁₆H₃₃, -OC₁₇H₃₅, -OC₁₈H₃₇ и тому подобное. В том смысле, в котором термин «арилокси» используется в данном документе, то он относится к группе (C₆-C₁₈)арил-О-, в которой C₆-C₁₈ арил имеет значения, определенные выше, например, это фенокси и нафтокси.

В том смысле, в котором термины «гетероарил» или «гетероциклическая группа», или «гетероароматическая группа» или «гетероциклил» используются в данном документе, то они означают группу, полученную из моно- или полициклического гетероароматического кольца, содержащего от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из О, S и N. Конкретными примерами являются пирролил, фурил, тиенил, пиразолил, имидазолил, оксазолил, тиазолил, пиридил, хинолинил, пиримидинил, 1,3,4-триазилил, 1,2,3-триазилил, 1,3,5-триазилил, бензофурил, изобензофурил, индолил, имидазо[1,2-а]пиридил, бензимидазолил, бензотиазолил и бензоксазолил.

Любой «карбоцикл», «арил» или «гетероарил» может быть замещен одной или более группами, такими как атомы галогена, C₆-C₁₄арил, C₁-C₂₅алкил, нитро, OR, SR, -COR, -COOR, -SO₃R, -SO₂R, -NHSO₂R, -NRR', -(CH₂)_n-NR-COR' и -(CH₂)_n-CO-NRR'. Очевидно, понятно, что когда полициклическое гетероароматическое кольцо замещено, то замещения могут иметь место в любом карбоциклическом и/или гетероциклическом кольце.

В том смысле, в котором термин «атом галогена» используется в данном документе, то он относится к атомам фтора, хлора, брома или йода.

В одном варианте осуществления изобретения фотосенсибилизатор конъюгата представляет хлорофилл или бактериохлорофилл формул I, II или III, содержащий, по меньшей мере, одну отрицательно заряженную группу и/или, по меньшей мере, одну кислотную группу, которая превращается в отрицательно заряженную группу при физиологическом значении pH.

В том смысле, в котором термин «отрицательно заряженная группа» используется в данном документе, то она означает анион, полученный из кислоты, и он включает карбоксилат (COO⁻), тиокарбоксилат (COS⁻), сульфонат (SO₃⁻) и фосфонат (PO₃²⁻), и «кислотная группа, которая превращается в отрицательно заряженную группу в физиологических условиях», включает карбоксильную (-COOH), тиокарбоксильную (-COSH), сульфовую (-SO₃H) и фосфовую (PO₃H₂) кислотные группы. Производные BChl с отрицательно заряженными группами или группами, которые превращаются в них в физиологических условиях, описаны в заявке WO 2004/045492 того же заявителя, она включена в данный документ в полном объеме для сведения.

В еще одном варианте осуществления изобретения фотосенсибилизатор конъюгата представляет хлорофилл или бактериохлорофилл формул I, II или III, содержащий, по меньшей мере, одну положительно заряженную группу и/или, по меньшей мере, одну основную группу, которая превращается в положительно заряженную группу при физиологическом значении pH.

В том смысле, в котором термин «положительно заряженная группа» используется в данном документе, то она означает катион, полученный из N-содержащей группы или из ониевой группы, не содержащей N. Поскольку эндотелий опухоли характеризуется повышенным количеством анионных сайтов,

положительно заряженных групп или основных групп, которые превращаются в положительно заряженные группы в физиологических условиях, то можно повысить эффективность направленной доставки конъюгатов по настоящему изобретению.

В том смысле, в котором термин «катион, полученный из N-содержащей группы»
используется в данном документе, то он означает, но не ограничивается этим,
например, аммоний $N^+(RR'R'')$, гидразиний $-(R)N-N(RR'R'')$, аммонимокси $O \leftarrow N^+(RR')$,
иминий $>C=N^+(RR')$, амидиний $-C(=NR)-N^+RR'R''$, или гуанидиний $-(R)N-C(=NR)-N^+$
 $RR'R''$, в которых R, R' и R'' каждый независимо представляет H, гидрокарбил,
предпочтительно C_1 - C_6 алкил, имеющий значения, определенные выше, фенил или
бензил, или гетероцикл, или в аммонийной группе один из R, R' и R'' может быть
ОН, или два из R, R' и R'' в аммонийной группе или R и R' в гидразиний,
аммонимокси, иминий, амидиний или гуанидиний вместе с атомом N, с которым они
связаны, образуют 3-7-членное насыщенное кольцо, необязательно содержащее
один или более гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, S или N, и
необязательно дополнительно замещенные по дополнительному атому N, и
указанный катион получен из соединения, содержащего один или более атомов N в
гетероароматическом кольце.

В одном более предпочтительном варианте осуществления конъюгат по
настоящему изобретению содержит аммонийную группу формулы $-N^+(RR'R'')$, в
которой каждый из R, R' и R'' независимо представляет H или необязательно
замещен гидрокарбилем или гетероциклом, имеющим значения, определенные
выше, или один из них может представлять ОН. Аммонийная группа $-N^+(RR'R'')$
может представлять вторичный аммоний, в котором любые два из R, R' и R''
являются H; третичный аммоний, в котором только один из R, R' и R'' представляет
H; или четвертичный аммоний, в котором каждый из R, R' и R'' представляет
необязательно замещенный гидрокарбил или гетероцикл, имеющие значения,
определенные выше. В том случае, когда один из R, R' и R'' является ОН, то группа
представляет гидроксил-аммоний. Предпочтительно аммоний является четвертичным
аммонием, в котором R, R' и R'' каждый представляет C_1 - C_6 алкил, такой как метил,
этил, пропил, бутил, гексил. Как уже отмечалось выше, аммоний может быть
концевой группой в молекуле или его можно найти в алкильной цепи молекулы.

В гидразинии $-(R)N-N^+(RR'R'')$, амидинии $-C(=NR)-N^+RR'R''$ и гуанидинии $-(R)N-C(=NR)-N^+RR'R''$ каждый из R, R' и R'' может независимо представлять H или гидрокарбил, или гетероцикл, или R' и R'' вместе с атомом N, с которым они связаны, образуют 3-7-членное насыщенное кольцо, имеющее значение, определенное выше. Примеры таких групп включают таковые, в которых R представляет H, и R' и R'' каждый является C_1 - C_6 алкилом, таким как метил, этил, пропил, бутил, гексил.

В аммонимокси $O \leftarrow N^+(RR')$ и иминии $>C=N^+(RR')$ каждый из R и R' может независимо представлять H или гидрокарбил, предпочтительно C_1 - C_6 алкил или гетероцикл, или R' и R'' вместе с атомом N, с которым они связаны, образуют 3-7-членное насыщенное кольцо, имеющее значение, определенное выше.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления производное
бактериохлорофилла содержит циклическую аммонийную группу формулы $-N^+(RR'R'')$, в которой два из R, R' и R'' вместе с атомом N образуют 3-7-членное насыщенное кольцо, имеющее значение, определенное выше.

В том смысле, в котором «3-7-членное насыщенное кольцо, образованное двумя

из R, R' и R'' вместе с атомом N, с которым они связаны», используется в данном документе, может означать кольцо, содержащее только N, такое как азиридин, пирролидин, пиперидин, пиперазин или азепин, или оно может содержать дополнительный гетероатом, выбранный из O и S, такое как морфолин или тиоморфолин. Дополнительный атом N в пиперазиновом кольце может быть необязательно замещен алкилом, например, C₁-C₆алкилом, который, в свою очередь, может быть замещен атомом галогена, OH или амина. Ониевые группы, полученные из указанных насыщенных колец, включают азиридины, пирролидины, пиперидины, пиперазины, морфолины, тиоморфолины и азепины.

В том смысле, в котором «катион, полученный из N-содержащей гетероароматической группы», используется в данном документе, то он означает катион, полученный из N-гетероароматического соединения, которое может представлять моно- или полициклическое соединение, необязательно содержащее O, S или дополнительные атомы N. Кольцо, из которого получен катион, должно содержать, по меньшей мере, один атом N и должно быть ароматическим, но другое кольцо(а), если оно имеется, может быть частично насыщенным. Примеры N-гетероароматических катионов включают пиразолий, имидазолий, оксазолий, тиазолий, пиридины, пиримидины, хинолины, изохинолины, 1,2,4-триазины, 1,3,5-триазины и пурины.

По меньшей мере, одна положительно заряженная группа может также представлять ониевую группу, не содержащую атом азота, такую как, но не ограничиваясь этим, фосфоний [$-P^+(RR'R'')$], арсоний [$-As^+(RR'R'')$], оксоний [$-O^+(RR')$], сульфоний [$-S^+(RR')$], селеноний [$-Se^+(RR')$], теллуроний [$-Te^+(RR')$], стибоний [$-Sb^+(RR'R'')$] или висмутоний [$-Bi^+(RR'R'')$], в которых каждый из R, R' и R'' независимо представляет H, гидрокарбил или гетероцикл, предпочтительно C₁-C₆алкил, такой как метил, этил, пропил, бутил, пентил или гексил, или арил, предпочтительно фенил.

Примеры фосфониевых групп формулы $-P^+(RR'R'')$ включают группы, в которых каждый из R, R' и R'' представляет метил, этил, пропил, бутил или фенил, или R является метилом, этилом, пропилом, бутилом или гексилом, и R' и R'' оба представляют фенил. Примеры арсония формулы $-As^+(RR'R'')$ включают группы, в которых каждый из R, R' и R'' представляет метил, этил, пропил, бутил или фенил. Примеры сульфония формулы $-S^+(RR')$ включают группы, в которых каждый из R и R' представляет метил, этил, пропил, бутил, фенил, бензил, фенэтил или замещенную гидрокарбильную группу.

В том смысле, в котором «основная группа, которая превращается в положительно заряженную группу в физиологических условиях», используется в данном документе, то она представляет, по меньшей мере, любую основную группу, которая будет образовывать в физиологических условиях положительно заряженную группу, имеющую значения, определенные выше. Необходимо отметить, что «физиологические условия», в том смысле, в котором это выражение используется в данном документе, относятся не только к сыворотке крови, но также к другим тканям и клеточным отделам в организме.

Примеры таких N-содержащих основных групп включают, без ограничения этим, любую аминогруппу, которая будет образовывать аммоний, любую иминогруппу, которая будет образовывать имины, любую гидразиновую группу, которая будет образовывать гидразины, любую аминоксигруппу, которая будет образовывать аммонимоксиды, любую амидиновую группу, которая будет образовывать амидины,

любую гуанидиновую группу, которая будет образовывать гуанидиний, которые имеют значения, определенные выше. Другие примеры включают фосфино- и меркаптогруппы.

Таким образом, конъюгаты по настоящему изобретению могут содержать, по меньшей мере, одну основную группу, которая превращается в положительно заряженную группу в физиологических условиях, такую как $-NRR'$, $-C(=NR)-NR'R''$, $-NR-NR'R''$, $-(R)N-C(=NR)-NR'R''$, $O\leftarrow NR-$ или $>C=NR$, в которых каждый из R, R' и R'' независимо представляет H, гидрокарбил, предпочтительно C_1-C_{25} алкил, более предпочтительно C_1-C_{10} или C_1-C_6 алкил, или гетероцикл, или два из R, R' и R'' вместе с атомом N образуют 3-7-членное насыщенное кольцо, необязательно содержащее атом O, S или N и необязательно дополнительно замещенное по дополнительному атому N, или основная группа является N-содержащей гетероароматической группой.

3-7-членное насыщенное кольцо может представлять азиридин, пирролидин, пиперидин, морфолин, тиоморфолин, азепин или пиперазин, необязательно замещенные по дополнительному атому N C_1-C_6 алкилом, в свою очередь, необязательно замещенным атомом галогена, гидроксильной группой или амино-, и N-содержащая гетероароматическая группа может представлять пиразолил, имидазолил, оксазолил, тиазолил, пиридил, хинолинил, изохинолинил, пиримидил, 1,2,4-триазилил, 1,3,5-триазилил или пуринил.

Производные BChl с положительно заряженными группами или группами, которые превращаются в них в физиологических условиях, описаны в заявке WO 2005/120573 того же заявителя, которая включена в данный документ в полном объеме для сведения.

В одном варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет хлорофилл или бактериохлорофилл формулы II, и R_6 является основной группой $-NR_9R'_9$, в которой R_9 представляет H, и R'_9 является C_1-C_6 алкилом, замещенным основной группой $-NH-(CH_2)_{2-6}-NRR'$, в которой каждый из R и R' независимо представляет H, C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный NH_2 , или R и R' вместе с атомом N образуют 5-6-членное насыщенное кольцо, необязательно содержащее атом O или N и необязательно дополнительно замещенное по дополнительному атому N - $(CH_2)_{2-6}-NH_2$.

В другом варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, и R_6 представляет $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH_2$, $-NH-(CH_2)_{2-6}$ -морфолино или $-NH(CH_2)_3$ -пиперазино- $(CH_2)_3-NH_2$, или R_1 и R_6 вместе образуют циклическое кольцо, содержащее RGD-пептид или RGD-пептидомиметик.

В еще одном варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет хлорофилл или бактериохлорофилл формулы III, X представляет NR_7 , R_7 является $-NRR'$, R представляет H, и R' является C_2-C_6 алкилом, замещенным SO_3^- или его основной солью, предпочтительно фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл, и X представляет $-NR_7$, и R_7 является $-NH-(CH_2)_3-SO_3K$.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления R_7 , R_8 , R_9 или R'_9 каждый представляет C_1-C_6 алкил, замещенный одной или более OH-групп. Например, фотосенсибилизатор является хлорофиллом или бактериохлорофиллом формулы II, и R_6 представляет $-NR_9R'_9$, R_9 является H, и R'_9 представляет $HOCH_2-CH(OH)-CH_2-$.

В еще одном варианте осуществления фотосенсибилизатор представляет хлорофилл или бактериохлорофилл формулы II, и R_6 представляет $-NR_9R'_9$, R_9

является Н, и R'₉ представляет C₁-C₆алкилом, замещенным полидентатом-лигандом, или его хелатными комплексами с металлами. Примеры полидентата-лиганда включают, не ограничиваясь этим, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту), ДТРА (диэтилентриаминпентауксусную кислоту) или макроциклический
 5 лиганд DOTA. В одном предпочтительном варианте осуществления полидентат-лиганд является ДТРА, R₆ представляет -NH-(CH₂)₃-NH-ДТРА, и металл является Gd.

Катион R₈⁺ может представлять одновалентный или двухвалентный катион, полученный из щелочного или щелочно-земельного металла, такого как K⁺, Na⁺, Li⁺
 10 , NH₄⁺, Ca²⁺, более предпочтительно K⁺; или R₈⁺ является органическим катионом, полученным из амина или из N-содержащей группы.

Как уже определено в данном документе, C₁-C₂₅гидрокарбил, значения которого определены для R₇, R₈, R₉ и R'₉, может быть необязательно замещен одной или более
 15 функциональными группами, выбранными из атома галогена, нитро, оксо, OR, SR, эпокси, эпитио, азиридин, -CONRR', -COR, COOR, -OSO₃R, -SO₃R, -SO₂R, -NHSO₂R, -SO₂NRR', -NRR', =N-OR, =N-NRR', -C(=NR)-NRR', NR-NRR', -(R)N-C(=NR)-NRR', O←NR, >C=NR, -(CH₂)_n-NR-COR', -(CH₂)_n-CO-NRR', -O-(CH₂)_n-OR, -O-(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-R, -PRR', -OPO₃RR', -PO₂HR, -PO₃RR'; одной или более отрицательно
 20 заряженными группами, такими как COO⁻, COS⁻, -OSO₃⁻, -SO₃⁻, -OPO₃R⁻, -PO₂H⁻, -PO₃²⁻ и -PO₃R⁻; и/или одной или более положительно заряженными группами, такими как -P⁺(RR'R''), -As⁺(RR'R''), -O⁺(RR'), -S⁺(RR'), -Se⁺(RR'), -Te⁺(RR'), -Sb⁺(RR'R''), -Bi⁺(RR'R''), O←N(RR'), >C=N⁺(RR'), -N⁺(RR'R''), -(R)-N-N⁺(RR'R''), -(R)N-C(=HN)-N⁺(RR'R''), -C(=NH)-N⁺(RR'R'') или N-гетероароматический катион, такой как пиразолий, имидазолий, оксазолий, тиазолий, пиридилий, хинолилий, пиримидиний, 1,2,4-триазиний, 1,3,5-триазиний и пурилий; где n равно целому числу в пределах от 1
 25 до 6, R, R' и R'' каждый независимо представляет Н, гидрокарбил или гетероцикл, или два из R, R' и R'' вместе с атомом N, с которым они связаны, образуют 3-7-членное насыщенное кольцо, необязательно содержащее один или более гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, S или N, и необязательно замещенное по дополнительному атому N. C₁-C₂₅гидрокарбил, значения которого
 35 определены для R₇, R₈, R₉ и R'₉, могут быть также замещены остатком моно-, олиго- или полисахарида, такого как гликозил, или аминокислотой, пептидом или белком. Кроме того, R₈, R₉ и R'₉ каждый может независимо представлять остаток моно-, олиго- или полисахарида, такого как гликозил, или аминокислоту, пептид или белок, полидентат-лиганд, такой как ДТРА, DOTA, ЭДТА и тому подобное, и их хелатные
 40 комплексы с металлами.

В группах OR и SR, когда R представляет Н, то имеются соответственно гидроксид и меркапто, и когда R является иным, чем Н, то имеются простые эфиры и сульфиды. В группе -PRR' имеется группа фосфино, когда R и R' являются Н. В группе -COR,
 45 когда R представляет Н, то имеется формильная группа -CHO альдегида, в то время, когда R является иным, чем Н, то имеется остаток кетона, такой как алкилкарбонил и арилкарбонил. В группе COOR, когда R не является Н, то имеется эфир карбоновой кислоты, такой как алкоксикарбонил и арилоксикарбонил. Аналогично имеются сложные эфиры в группах -OSO₃R, -SO₃R, -SO₂R, -OPO₃RR', -PO₂HR и -PO₃RR',
 50 когда R и R' являются иными, чем Н.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения фотосенсибилизатор является неметаллированным, М представляет 2Н. В других

предпочтительных вариантах осуществления фотосенсибилизатор металлизирован, как это определено выше, более предпочтительно М представляет Pd, Cu или Mn, наиболее предпочтительно Pd.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формул I, II или III, более предпочтительно формулы II, и М является 2Н, Cu, Mn, более предпочтительно Pd. В других вариантах осуществления фотосенсибилизатор представляет хлорофилл формул I, II или III, более предпочтительно формулы II, и М является 2Н, Cu или Mn.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления конъюгат содержит фотосенсибилизатор бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd, Mn, Cu или 2Н; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил; и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃⁻Me⁺, где Me⁺ является Na⁺ или K⁺.

В других предпочтительных вариантах осуществления конъюгат содержит фотосенсибилизатор бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd или 2Н; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил; и R₆ представляет -NH-CH₂-CH(OH)-CH₂-OH.

В еще одних вариантах осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил; X является N-R₇, и R₇ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃⁻Me⁺, где Me⁺ является Na⁺ или K⁺.

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы I, в которой М является Mn; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R₂ представляет OH; R₃ представляет COOCH₃; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил; R₅ является O.

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит хлорофилл формулы II, в которой М выбран из Mn, Cu или 2Н; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R₄ в положении 3 является винилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил; и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃⁻Me⁺, где Me⁺ является Na⁺ или K⁺.

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является 2Н; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₃-NH₂.

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл

формулы II, в которой М является 2Н; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-морфолино.

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является 2Н; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₃-пиперазино-(CH₂)₃-NH₂.

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-пептидомиметика; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 40).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-пептидомиметика; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 41).

В еще одном варианте осуществления R₁ и R₆ вместе образуют циклическое кольцо, содержащее -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-NH- или -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-пиперазино-(CH₂)₂-NH-. В одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой m равно 0; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил; и R₁ и R₆ вместе образуют циклическое кольцо, содержащее -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-NH-, и М представляет Pd (конъюгат 37) или М представляет 2Н (конъюгат 38), или R₁ и R₆ вместе образуют циклическое кольцо, содержащее -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-пиперазино-(CH₂)₂-NH-, и М представляет Pd (конъюгат 39).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит хлорофилл формулы II, в которой М является 2Н; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R₄ в положении 3 является винилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 16).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит хлорофилл формулы II, в которой М является Mn; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R₄ в положении 3 является винилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 17).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит хлорофилл формулы II, в которой М является Cu; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R₄ в положении 3 является винилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 18).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы I, в которой М является Mn; R₁ представляет NH-P, где Р является

остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R₂ представляет OH; R₃ является COOCH₃; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₅ представляет O (конъюгат 12).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы I, в которой M является 2H; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R₂ представляет OH; R₃ является COOCH₃; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₅ представляет O (конъюгат 27).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы I, в которой M является 2H; R₁ представляет NH-(CH₂)₂-NH-CO-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:4; R₂ представляет OH; R₃ является COOCH₃; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₅ представляет O (конъюгат 32).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой M является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:2; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 11).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой M является 2H; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 13).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой M является Mn; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 14).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой M является Cu; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 15).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой M является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 24).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл

формулы II, в которой М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₃-SO₃K (конъюгат 19).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является 2H; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:3; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 26).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:5; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 33).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:6; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 34).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:7; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 35).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-CH[(CH₂)₂-CO-NH-P]₂, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:8; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 36).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил; и R₆ представляет -NH-CH₂-CH(OH)-CH₂OH (конъюгат 23).

В еще одном варианте осуществления конъюгат содержит бактериохлорофилл формулы II, в которой М является 2H; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-(CH₂)₃-NH-CO-DTPA (конъюгат 43) или его хелатный комплекс с Gd (конъюгат 44).

Изобретение дополнительно относится к новому бактериохлорофиллу формулы II, в которой М является Pd; R₁ представляет COOH; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил и R₆ представляет -NH-CH₂-CH(OH)-CH₂-OH (соединение 10).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика и фотосенсибилизатора, выбранного из порфирина, хлорофилла или бактериохлорофилла, имеющих значения, определенные выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, включающий фотосенсибилизатор порфирина, имеющий значения, определенные выше, или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления она содержит конъюгат, включающий фотосенсибилизатор хлорофилл или бактериохлорофилл формул I, II или III, имеющий значения, определенные выше, или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, в котором хлорофилл имеет формулу II, более предпочтительно выбранный из конъюгатов 16, 17 и 18.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, в котором бактериохлорофилл имеет формулу I, более предпочтительно выбранный из конъюгатов 12, 27 и 32.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, в котором бактериохлорофилл имеет формулу III, более предпочтительно конъюгат 19.

В еще одном более предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, в котором бактериохлорофилл имеет формулу II, конъюгированный с RGD-пептидом, более предпочтительно с RGD-пептидом с последовательностью SEQ ID NO:1, более предпочтительно выбранный из конъюгатов 13, 15, 23, 28, 29, 30, 31, 43 и 44, и более предпочтительно конъюгат 24.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, в котором бактериохлорофилл имеет формулу II, конъюгированный с RGD-пептидом, более предпочтительно с RGD-пептидом с последовательностями SEQ ID NO:2-8, более предпочтительно конъюгаты 11, 26, 33, 34, 35 и 36.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, в котором бактериохлорофилл имеет формулу II, конъюгированный с RGD-пептидомиметиком, более предпочтительно конъюгаты 40 и 41.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для применения в фотодинамической терапии (ФДТ), конкретнее для направленной на сосуды ФДТ (VTP).

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для применения в онкологии, в частности, для VTP опухолей. Любая подходящая солидная опухоль включается в изобретение, первичные опухоли и метастазы, из опухолей, выбранных из, но не ограничиваясь этим, меланомы, злокачественной опухоли ободочной кишки, рака молочной железы, злокачественной опухоли легких, рака предстательной железы, злокачественной опухоли мозга или злокачественной опухоли головы и шеи.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция

предназначена для применения при лечении заболеваний, не относящихся к онкологическим, для ВТР незлокачественной ткани или органа. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для лечения
 5 сосудистых заболеваний, таких как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) или нарушений, таких как ожирение, посредством ограничения снабжения сосудами к жировой ткани и таким образом ингибирования ее роста.

Фармацевтическая композиция по изобретению также используется в диагностических целях для визуализации органов и тканей. Ее можно использовать в
 10 способах направленной на сосуды визуализации (VTI).

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию применяют для диагностики опухолей с использованием нескольких методов. Несколько диагностических методов можно применять по изобретению адаптацией
 15 центрального атома металла для конкретной методики.

Для диагностики опухолей динамической флуоресцентной визуализацией М в фотосенсибилизаторе представляет 2Н или металл, выбранный из Cu, Pd, Gd, Pt, Zn, Al, Eu, Er, Yb или их изотопы.

Для диагностики опухолей с помощью радиодиагностического метода М в фотосенсибилизаторе представляет радиоизотоп, выбранный из ^{64}Cu , ^{67}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{201}Tl , ^{195}Pt , ^{60}Co , ^{111}In и ^{51}Cr . В одном варианте осуществления радиодиагностический метод представляет позитронно-эмиссионную томографию (PET), и М является ^{64}Cu или ^{67}Cu . В другом варианте осуществления
 20 радиодиагностический метод представляет фотонно-эмиссионную томографию (SPET), и М выбран из $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{195}Pt , ^{111}In , ^{51}Cr и ^{60}Co .

Для диагностики опухолей молекулярной магнитно-резонансной томографией (MPT) М представляет парамагнитный металл, выбранный из Mn^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} и Dy^{3+} , или фотосенсибилизатор замещен хелатным комплексом полидентата-лиганда с металлом, и металл имеет значения, определенные выше.
 30

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для лучевой терапии опухолей, в которой М представляет радиоизотоп, выбранный из
 35 ^{103}Pd , ^{195}Pt , ^{105}Rh , ^{106}Rh , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{164}Er , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{153}Sm , ^{90}Y , ^{67}Cu и ^{32}P .

Настоящее изобретение дополнительно относится к новому бактериохлорофиллу формулы II, в которой М представляет Pd; R_1 представляет COOH ; R'_2 представляет метокси; R_4 в положении 3 является ацетилем и в положении 8 этилом; R'_4
 40 представляет метил; и R_6 является $-\text{NH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$, обозначенному в данном документе, как соединение 10.

По одному варианту осуществления изобретение относится к способу диагностики опухолей динамической флуоресцентной визуализацией, который включает: а) введение субъекту с подозрением на наличие опухоли конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению, в котором М представляет 2Н или металл, выбранный из Cu, Pd, Gd, Pt, Zn, Al, Eu, Er, Yb или их изотопов; и б)
 45 облучение светом субъекта стандартными методами и определение флуоресценции подозреваемой области, где наличие более высокой флуоресценции указывает на наличие опухоли.
 50

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу диагностики опухолей радиодиагностическим методом, который включает: а) введение субъекту с подозрением на наличие опухоли конъюгата RGD-пептида-

фотосенсибилизатора по изобретению, в котором М представляет радиоизотоп, выбранный из ^{64}Cu , ^{67}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{195}Pt , ^{201}Tl , ^{60}Co , ^{111}In и ^{51}Cr ; и b) сканирование субъекта в визуализирующем сканере и определение уровня радиоактивности подозреваемой области, где наличие повышенной радиоактивности указывает на наличие опухоли. В предпочтительном варианте осуществления радиодиагностический метод представляет позитронно-эмиссионную томографию (PET), и М является ^{64}Cu или ^{67}Cu . В другом варианте осуществления радиодиагностический метод представляет фотонно-эмиссионную томографию (SPET), и М выбран из $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{195}Pt , ^{111}In , ^{51}Cr и ^{60}Co .

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к молекулярной магнитно-резонансной томографии (МРТ) для диагностики опухолей, включающей стадии: а) введения субъекту с подозрением на наличие опухоли конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению, в котором М представляет парамагнитный металл и b) проведения субъекту магнитно-резонансной томографии воспроизведением, по меньшей мере, одного МР снимка интересующей области опухоли в теле пациента до указанного введения и одного или более МР снимков после. Парамагнитный металл может представлять любой подходящий металл для МРТ, включая, но не ограничиваясь этим, из Mn^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Eu^{3+} или Dy^{3+} и предпочтительно Gd^{3+} .

В одном предпочтительном варианте осуществления МРТ способ включает стадии: а) введения субъекту с подозрением на наличие опухоли конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению, в котором М представляет парамагнитный металл, предпочтительно Mn^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Eu^{3+} или Dy^{3+} и более предпочтительно Gd^{3+} ; b) воспроизведения МР снимка на нулевое время и затем на вторую или более временных точек; и c) обработки и анализа данных для диагностики наличия или отсутствия опухоли.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу диагностики опухолей флуоресцентной визуализацией с использованием фотосенсибилизатора, когда усовершенствование представляет применение конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению.

Изобретение дополнительно относится к способу диагностики опухолей PET или SPET сканированием с использованием фотосенсибилизатора, когда усовершенствование представляет применение конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению.

Дополнительно обеспечивается способ диагностики опухолей МРТ с использованием фотосенсибилизатора, когда усовершенствование представляет применение конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению.

Конъюгаты RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению являются особенно пригодными для направленной на сосуды ФДТ (VTP) и пригодными для лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом/неоваскуляризацией и ростом новых сосудов, таких как злокачественное заболевание, диабетическая ретинопатия, дегенерация желтого пятна и артрит. В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мишенью для лечения с использованием сенсibilizаторов по изобретению являются аномальные кровеносные сосуды, в частности, кровеносные сосуды солидных опухолей, возрастная дегенерация желтого пятна, рестеноз, острое воспаление или атеросклероз (Dougherty and Levy, 2003) за счет присущего различия в чувствительности у нормальных и аномальных

кровеносных сосудов по предлагаемым в данном документе протоколам ФДТ.

Таким образом, в одном варианте осуществления конъюгаты по изобретению являются пригодными в области онкологии для лечения с помощью ФДТ предраковых состояний и нескольких типов злокачественных заболеваний, таких как, не ограничиваясь этим, меланомы, злокачественные опухоли предстательной железы, мозга, ободочной кишки, яичников, молочной железы, головы и шеи, опухолей грудной стенки, возникающих в результате рака молочной железы, рак кожи, злокачественная опухоль легких, пищевода и мочевого пузыря. Соединения являются пригодными для лечения первичных опухолей, а также метастатических опухолей.

В данном аспекте изобретение относится к способу фотодинамической терапии опухолей, который включает: а) введение индивидууму, нуждающемуся в этом, конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению и б) облучение светом области опухоли.

Изобретение дополнительно относится к терапии опухолей без ФДТ, т.е. способу лучевой терапии опухолей, который включает введение индивидууму, который нуждается в этом, конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по изобретению, в котором М представляет ^{103}Pd , ^{195}Pt , ^{105}Rh , ^{106}Rh , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{164}Er , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{153}Sm , ^{90}Y , ^{67}Cu и ^{32}P .

В другом варианте осуществления соединения по изобретению являются пригодными в областях, не относящихся к онкологии. Помимо эффективной деструкции нежелательных клеток, таких как злокачественные образования и опухоли, с помощью ФДТ, соединения по изобретению также можно использовать против пролиферирующих клеток и кровеносных сосудов, которые являются основной причиной атеросклероза, артрита, псориаза, ожирения и дегенерации желтого пятна. Кроме того, соединения можно использовать для лечения опухолей, не относящихся к злокачественным, например, доброкачественной гипертрофии предстательной железы.

В одном предпочтительном варианте осуществления конъюгаты по изобретению можно использовать при ФДТ для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, главным образом, окклюзии сосудов и тромбоза при заболеваниях коронарной артерии, гиперплазии внутренней оболочки сосудов, рестеноза и атеросклеротических бляшек. В более предпочтительном варианте осуществления соединения по изобретению применяют для профилактики или ослабления рестеноза в стенте у индивидуума, страдающего сердечно-сосудистым заболеванием, который подвергается коронарной ангиографии. В другом предпочтительном варианте осуществления соединения по изобретению можно использовать в способе лечения атеросклероза разрушением атероматозной бляшки в пораженном кровеносном сосуде.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления соединения по изобретению можно использовать при ФДТ для лечения дерматологических заболеваний, нарушений и состояний, таких как акне, рубцы при акне, псориаз, стопа атлета, бородавки, актинический кератоз и портвейновые пятна (нарушения маленьких кровеносных сосудов, которые соединяют вены с артериями (капилляров), расположенных в верхних слоях кожи).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления конъюгаты по изобретению можно использовать при ФДТ для лечения глазных заболеваний, нарушений и состояний, таких как неоваскуляризация роговицы и сосудистой

оболочки глаза и более предпочтительно возрастной дегенерации желтого пятна.

Количество конъюгата, которое следует вводить для ФДТ, будет определять лечащий врач с учетом накопленного опыта по применению производных порфирина, Chl и BChl при ФДТ, и оно будет варьировать в зависимости выбранного производного, используемого в качестве активного ингредиента, заболевания, которое подвергается лечению, способа введения, возраста и состояния пациента, и мнения врача.

Длину волны облучающего света предпочтительно выбирают таким образом, чтобы она совпадала с максимальным поглощением фотосенсибилизатора. Подходящую длину волны для любого соединения можно легко определить по его спектру поглощения. В предпочтительном варианте осуществления используют сильный источник света, более предпочтительно лазеры при 720-790 нм, когда фотосенсибилизатор представляет производное BChl.

Конъюгаты по изобретению можно дополнительно использовать при фотодинамической терапии в качестве адъюванта для другой общепринятой терапии, используемой для лечения заболевания, нарушения или состояния, чтобы сделать его более эффективным. Например, их можно использовать интраоперативно в комбинации с хирургической операцией, для способствования предотвращению рецидива злокачественного заболевания на больших поверхностях, таких как плевра (серозная оболочка, окружающая легкие) и брюшина (серозная оболочка, выстилающая брюшную полость), обычных местах распространения некоторых типов злокачественных опухолей, при интраоперативном лечении рецидивирующих карцином головы и шеи или после ангиопластики бедренной артерии для профилактики рестеноза. Также конъюгаты можно использовать при интраоперативной диагностике опухолей ФДТ, например опухолей мозга.

Другой возможностью по изобретению является применение конъюгатов по изобретению при ФДТ больших солидных опухолей интерстициальной терапией, методом, который включает введение оптических волокон непосредственно в опухоли с использованием игл под контролем компьютерной томографии (СТ). Это может быть особенно пригодным для областей, для которых требуется обширная хирургическая операция, например опухоли на голове и шее.

Количество конъюгата для введения и путь введения будут определяться с учетом вида заболевания, стадии заболевания, возраста и состояния здоровья пациента, но количество будет значительно ниже, чем применяемая в настоящее время доза Photofrin II® (примерно 5-40 мг HpD/кг массы тела) или Tookad® (примерно 2-10 мг/кг массы тела).

Фармацевтические композиции по изобретению вводят пациенту обычными методами, используемыми при ФДТ, например, системно, в частности, инъекцией, более предпочтительно внутривенной инъекцией, местно непосредственной инъекцией в солидную опухоль или местно для лечения кожных заболеваний и состояний.

Далее изобретение будет иллюстрировано с использованием последующих не ограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Химический раздел

В примерах, представленных в данном документе, промежуточные продукты и соединения 1-10, и конъюгаты по изобретению (11-24) будут представлены под

арабскими номерами, выделенными жирным шрифтом и подчеркнутые согласно следующему перечню соединений и приложения. Формулы всех соединений и конъюгатов приведены в приложении в конце описания, перед списком источников литературы.

Перечень соединений

1. Бактериохлорофилл (Bchl a)
2. 13²-ОН-бактериохлорофилл (13²-ОН-Bchl a)
3. Бактериофеофорбид (Bpheid a)
4. 13²-ОН-бактериофеофорбид (13²-ОН-Bpheid a)
- 4а. Бактериопурпурин 18 (BPP 18)
5. Хлорофилл (Chl a)
6. Феофорбид (Pheid a)
7. Палладий бактериофеофорбид (Pd-Bpheid)
8. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид калиевая соль
9. Марганец (III) 13²-ОН-бактериофеофорбид (Mn(III) 13²-ОН-Bpheid a)
10. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2,3-дигидроксипропил)амид калиевая соль
11. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2,3-сульфоэтил)амид-17³-(RGD-4C)амид калиевая соль
12. Марганец(III) 13²-ОН-бактериофеофорбид-17³-(циклоRGDfK)амид
13. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль
14. Марганец(III) 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль
15. Медь(II) 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль
16. 3¹,3²-Дидегидрородохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль
17. Марганец(III) 3¹,3²-дидегидрородохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль
18. Медь(II) 3¹,3²-дидегидрородохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль
19. Палладий бактериопурпурин N-(3-сульфопропиламино)имид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль
20. Мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфин
21. Медь(II) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфин
22. Гадолиний(III) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфин
23. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин- 13¹-(2,3-дигидроксипропил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид
24. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль
25. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-

сульфоэтил)амид калиевая соль

26. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(GRGDSP)амид калиевая соль

27. Бактериофеофорбид-17³-(циклоRGDfK)амид

28. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(3-[(3-аминопропил)амино]пропил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид

29. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2,3-дигидроксипропил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид

30. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-морфолино-N-этил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид

31. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-{3-[4-(3-аминопропил)пиперазин-1-ил]пропил}амид-17³-(циклоRGDfK)амид

32. Бактериофеофорбид-17³-(2-циклоRGDK-амидо-N-этил)амид

33. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(GRGDSPK)амид калиевая соль

34. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-[(GRGDSP)₄K]амид калиевая соль

35. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDf-N(Me)K)амид калиевая соль

36. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)-17³-N-[4-гептандикислота бис(циклоRGDyK-амидо)]амид калиевая соль

37. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹,17³-цикло(2-RGD-амидо-N-этил)диамид

38. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹,17³-цикло(2-RGD-амидо-N-этил)диамид

39. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹,17³-цикло{3-[4-(3-аминопропил-DGR-амидо)пиперазин-1-ил]пропил}диамид

40. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-[4-(метил-5-(6-гуанидиногексаноиламино)пентановая кислота)]амид калиевая соль

41. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-[7-амидо-3-[[1-(4-гуанидинобутирил)пиперидин-3-карбонил]амино]гептановая кислота] калиевая соль

42. Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRADfK)амид калиевая соль

43. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(3-DTPA-амидо-N-пропил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид

44. 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(3-Gd-DTPA-амидо-N-пропил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид

Материалы и методы

i) Бактериохлорофилл (Bchl), соединение 1, получали, как описано Scherz and Parson, 1984. Метод начинали с экстракции пигментов из высушенных (лиофилизированных) клеток фотосинтетических бактерий *Rhodovulum sulfidophilum*. Очистку сырого экстракта пигмента проводили колоночной хроматографией

на DEAE-сефарозе по Omata and Murata, 1983. Кратко, DEAE-сефарозу промывали дистиллированной водой и затем превращали в ацетатную форму суспендированием в 1М ацетатном буфере (pH 7). Суспензию промывали 3 раза ацетоном и, наконец, суспендировали в смеси метанол-ацетон (1:3, об./об.) для хранения при 5°C. Чистоту проверяли тонкослойной хроматографией (ТСХ). Подробное описание условий ТСХ можно найти у Fiedor et al., 1992.

ii) **13²-ОН-бактериохлорофилл (13²-ОН-Bchl), соединение 2**, получали алломеризацией Bchl перемешиванием метилового раствора Bchl (1 г/мл) в темноте на воздухе, как описано Struck et al., 1992.

iii) **Бактериофеофорбид (Bpheid), соединение 3, и 13²-ОН-бактериофеофорбид (13²-ОН-Bpheid), соединение 4**, синтезировали, следуя методу Wasielewski and Svec, 1980 с использованием деметаллирования-деэстерификации соответствующего Bchl или 13²-ОН-Bchl с помощью 80% водного раствора трифторуксусной кислоты. Очистку синтезированного Bpheid или 13²-ОН-Bpheid проводили на колонке с силикагелем («Kieselgel 60», Германия) с градиентом метанола в хлороформе (0 до 15/25% об.) в качестве элюента.

iv) **Хлорофилл (Chl), соединение 5, и v) феофорбид (Pheid), соединение 6**. Chl получали из цианобактерий *Spirulina plantensis* с использованием способа, аналогичного получению Bchl (см. выше). Затем Chl превращали в Pheid с использованием способа, аналогичного описанному для Bpheid, описанного выше.

vi) **Палладий бактериофеофорбид (Pd-Bpheid), соединение 7**, синтезировали, как описано в заявке WO 2000/033833 (пример 2 в этом документе).

vii) **Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид калиевая соль, соединение 8**, синтезировали, как описано в заявке WO 2004/045492 (пример 1, синтез соединения 4).

viii) **3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид дикалиевая соль, соединение 25**, синтезировали взаимодействием Bpheid с таурином, как описано в заявке WO 2004/045492 (пример 2, синтез соединения 5).

ix) **Бактериопурпурин 18 (BPP18), соединение 4а**, синтезировали, как описано Mironov et al., 1992.

х) Смола, аминокислотные производные, N-гидроксibenзотриазол (HOBt) и бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидино-фосфоний гексафторфосфат (PyBOP) получали от Novabiochem; N,N-диизопропилэтиламин (DIEA), N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC) этилендиамин, 1,4-бис(3-аминопропил)пиперазин, 1,3-диметилбарбитуровую кислоту (DMBA), диэтилдитиокарбаминовую кислоту, натриевую соль (DEDTC), 2,2,2-трифторэтанол (TFE), триизопропилсилан (TIS), 1,2-этандитиол (EDT), трифторуксусную кислоту (ТФК), мезо-тетра(4-карбоксифенил)порфин, L-аскорбат натрия и 4-оксогептандикислоту получали от Aldrich (США); N-гидроксисукцинимид (NHS) получали от Sigma (США); N-гидроксисукцинимид (сульфо-NHS), 1,3-дициклогексилкарбодиимид (DCC), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид (EDC), N-Fmoc-6-аминогексановую кислоту, N^β-Fmoc-N^ω-Вос-β-L-гомолизин и N-Fmoc-пиперидин-3-карбоновую кислоту получали от Fluka (Швейцария); ацетат кадмия, ацетат меди и хлорид марганца (II) получали от Merck (Германия); и тетраakis(трифенилфосфин)палладий получали от Acros.

В основном использовали химические реактивы и растворители аналитической

чистоты, за исключением проведения ВЭЖХ, когда применяли растворители для ВЭЖХ.

х) **Синтез пептидов** - пептиды синтезировали твердо-фазным методом посредством получения Fmoc-производных с использованием защищенных аминокислот и с проведением циклизации согласно методам, известным в данной области. Удаление Fmoc-группы и завершение взаимодействия прослеживали с использованием нингидриновой реакции (Kaiser). ТФК и раствор смеси ТФК/тиоанизол/ H_2O /триизопропилсилан (TIS) использовали для удаления пептидов со смолы одновременно со снятием защиты (Arg-пентаметилхроман-6-илсульфонил (Pmc) или 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf); Asp-OtBu; Ser-трет-бутил (tBu); Lys-трет-бутилоксикарбонил (Boc), аллилоксикарбонил (Alloc) или Dde).

и) Линейные пептиды GRGDSPK, (GRGDSP) $_4$ K или GRGDSP получали с использованием соответственно Fmoc-Lys(Boc)-Wang-смолы или 2-хлортритилхлоридной смолы.

ii) Циклические пептиды (циклоRGDfK), (циклоRGDyK), (циклоRADfK) и (циклоRGDf-N(Me)K) получали синтезом пентапептидов на 2-хлортритилхлоридной смоле и их последующую циклизацию проводили в растворе, как описано Haubner et al., 1999. N $^{\alpha}$ -метилзащищенный лизин получали из 2-аминогептандикислоты, как описано ранее (Freidinger et al., 1983). Другой способ синтеза циклоRGDfK циклизацией на смоле описан в примере 13 в данном документе.

iii) Циклический пептид RGD-4C получали синтезом CDCRGDCFCG с использованием обычного протокола твердофазного синтеза и его циклизацию проводили спонтанным окислительным образованием дисульфидных связей (Koivunen et al., 1995).

iv) Циклический пептидил-амин циклоRGDK-NH $_2$ синтезировали на хлортритиловой смоле (защиты: Arg-Pbf; Asp-OtBu; N $^{\epsilon}$ -Lys-Alloc). Затем отщепляли N-концевую Fmoc-группу и Alloc-защитную группу на ϵ -аминогруппе остатка лизина и проводили циклизацию по двум аминогруппам через уретановую связь с использованием N,N'-карбонилдиимидазола (CDI) в течение 12-16 ч. Циклический пептид отщепляли с подложки и лизин карбоксилат подвергали взаимодействию с 1,2-диаминоэтаном (активация DCC) с получением желаемого пептидиламина.

v) Циклопептид димер (циклоRGDyK) $_2$. 4-Оксогептандикислоту превращали в 4-аминогептандикислоту с использованием метода Wanunu et al., 2005. Затем аминогруппу подвергали Boc-защите и карбоксильные группы активировали смесью NHS/DCC в ДМФА. Диэфир очищали на колонке с силикагелем с использованием смеси хлороформ-метанол и затем подвергали взаимодействию с циклоRGDyK в ДМФА, содержащем DIEA, в течение ночи. Защитную Boc-группу отщепляли смесью ТФК-вода-дихлорметан (DCM) (90:5:5). Желаемое соединение очищали ВЭЖХ.

vi) RGD-пептидомиметики (RGD-PM1, RGD-PM2) получали, как описано в заявке WO 93/09795. То есть одну аминогруппу этил (5-амино-4-аминометил)пентановой кислоты (Vaillancourt et al., 2001 и цитированные в данном документе источники) защищали эквимольным количеством Boc-ангидрида и карбоксильную группу защищали трет-бутиловым спиртом. Продукт очищали на колонке с силикагелем и сочетали с N-Fmoc-6-аминогексановой кислотой с последующим снятием Fmoc-защиты и превращением амина в гуанидиний с использованием 3,5-диметилпиразол 1-карбоксамидина нитрата (pH 9,5; 50°C).

Наконец, N-Вос и O-tBu удаляли обработкой ТФК и продукт RGD-PM1 очищали ВЭЖХ. Синтез RGD-PM1 представлен на схеме 3. Для синтеза RGD-PM2 (см. схему 3) N^β-Fmoc-N^ω-Вос-β-L-гомолизин присоединяли к смоле Wang. Затем проводили сочетание с N-Fmoc-пиперидин-3-карбоновой кислотой и N-Fmoc-4-аминомасляной кислотой с использованием твердофазных методов. После образования гуанидиния (как описано выше) с полученного вещества снимали защиту и удаляли со смолы обработкой ТФК и продукт RGD-PM2 очищали ВЭЖХ.

ix) ТСХ: пластинки с силикагелем (Kieselgel-60, Merck, Германия); смесь хлороформ-метанол (4:1, об./об.).

х) Коэффициенты экстинкции металлокомплексов определяли на основе корреляции концентрации центрального атома металла (с использованием пламенной фотометрии с солью металла в качестве стандарта) с оптической плотностью анализируемого раствора при определенной длине волны.

xi) Масс-спектры. Масс-спектры электрораспылительной ионизацией (ESI-MS) получали на спектрометре LCZ (Micromass, Англия). Определение масс-спектров матрикс-вспомогательной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF-MS) получали на аппарате Bruker REFLEX по времени полета (Bruker Daltonics, США).

xii) Спектры оптического поглощения (УФ-VIS) различных комплексов снимали на спектрофотометрах Genesis-2 (Milton Roy, Англия), V-570 (JASCO, Япония) или Shimadzu UV-1650PC (Япония).

xiii) ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа LC-900 (JASCO, Япония), снабженного УФ-915 диодным детектором, или системы Waters Delta Prep 4000, снабженной детектором поглощения Waters 486 и коллектором фракций Waters, контролируемые программой Millennium v3.05. Скорость потока устанавливали на 75 мл/мин с использованием препаративной колонки (Vydac C18, 218TP101550, 50×250 мм, 10-15 мкм), детектор устанавливали на длине волны 380 нм и коллектор фракций устанавливали на временном режиме 6 сек/фракция. Растворители, использованные при очистке соединений с помощью ВЭЖХ, были следующими: растворитель А: 50 мМ раствор ацетата аммония в H₂O; растворитель В: ацетонитрил.

ivx) LC-MS API 150EX (Applied Biosystems/MDS SCIEX) проводили с использованием колонки YMS-Pack Pro C18. Подвижная фаза: растворитель А: 0,2% AcOH/0,12% NH₄OH/H₂O; растворитель В: 4,75% А/0,2% AcOH/ацетонитрил. Скорость потока: 200 мкл/мин. Градиент: 20% В (0-20 мин) до 95% В (25-30 мин).

Пример 1. Синтез конъюгата 11

Соединение 8, полученное, как описано в разделе «Материалы и методы», непосредственно конъюгировали с циклическим пептидом RGD-4С, как показано на схеме 1, следующим образом: соединение 8 (10 мг) подвергали взаимодействию в течение ночи с NHS (20 мг) в присутствии EDC (20 мг) в ДМСО (3 мл). Полученный активированный сукцинимидный эфир (Bauminger and Wilchek, 1980) очищали на колонке с силикагелем с использованием смеси CHCl₃:MeOH (6:1, объемные соотношения), высушивали и хранили в атмосфере аргона в темноте до последующего использования. RGD-4С (2 мг, 1,97 мкмоль) растворяли в 800 мкл ДМСО и добавляли к активированному эфиру (4,8 мг, 5,13 мкмоль в 800 мкл ДМСО и 400 мкл 0,1М буфера NaHCO₃, pH 8,5). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч и перемешивали в атмосфере аргона. Полученный конъюгат очищали с использованием ВЭЖХ и идентифицировали масс-спектрометрией (1837 m/z) (фиг.1А-1С). Выход: 18%.

Пример 2. Синтез конъюгата 12

Конъюгат 12 получали, начиная с синтеза соединения 9.

i) Синтез соединения 9

Соединение 4 (20 мг), полученное, как описано в разделе «Материалы и методы»,
 5 растворяли в ДМФА (8 мл), который предварительно пропускали через колонку с оксидом алюминия В (1×5 см) и затем барботировали аргоном в течение 5-10 мин. Добавляли ацетат кадмия (85 мг, 10 экв. к соединению 4) и реакционную смесь нагревали до 110°C. Ход реакции контролировали спектральным анализом (в
 10 ацетоне). Металлирование проходило в течение 5 мин $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (55 мг, 10 экв.) добавляли при перемешивании до окончания реакции (еще в течение 5-10 мин). Для удаления неорганических солей реакционный раствор упаривали; твердое вещество вновь растворяли в ацетонитриле, раствор фильтровали через ватмановскую бумагу на воронке Бюхнера и упаривали. Наконец, проводили ВЭЖХ сырого продукта,
 15 вновь растворенного в воде (хроматограф LC-900, JASCO, Япония; колонка S10P-мкм ODS-A 250×20 мм, YMC, Япония) с использованием 50% водного раствора ацетонитрила в качестве подвижной фазы со скоростью потока 8 мл/мин и чистый продукт 9 элюировали на 10,5-13,5 мин с полным отделением продукта от примесей
 20 хлоринов и побочных продуктов. Выход: 88%.

Строение соединения 9 подтверждали спектрально (см. электронный спектр на фиг.2А) и масс-спектром (фиг.2В, ESI-MS, в режиме регистрации положительных ионов и также режиме регистрации отрицательных ионов для проверки
 25 отсутствия MnCl_2 ; 679 m/z).

ii) Синтез конъюгата 12

Соединение 9 (15 мг) растворяли в ДМСО с сульфо-NHS (30 мг) и DCC (24 мг), реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение ночи, упаривали, вновь растворяли в 5 мМ фосфатном буфере, pH 8,0 (1,5
 30 мл) и фильтровали. К фильтрату добавляли циклоRGDfK (30 мг) в ДМСО (2,5 мл), смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 ч, упаривали, вновь растворяли в воде (2 мл) и очищали ВЭЖХ на препаративной C_{18} колонке с использованием градиентного элюирования ацетонитрилом в воде, 10-40%, в течение 15 мин, со скоростью потока 7 мл/мин. Очищенный конъюгат 12 высушивали при пониженном
 35 давлении и хранили до использования при -20°C в атмосфере аргона.

Пример 3. Синтез конъюгата 14

Указанное в заголовке соединение получали, начиная с синтеза неметаллированного конъюгата 13, следующим образом.

i) Синтез конъюгата 13

Vrheid (соединение 3) (40 мг) полученное, как описано в разделе «Материалы и методы» выше, активировали с использованием NHS (80 мг) и DCC (60 мг) в хлороформе (5 мл) при перемешивании при комнатной температуре в течение ночи. Полученный активированный эфир очищали на колонке с силикагелем с
 45 использованием хлороформа в качестве элюента и затем подвергали взаимодействию с циклоRGDfK (40 мг) в ДМСО (5 мл) при перемешивании в атмосфере аргона в течение ночи. Затем к реакционной смеси добавляли таурин (50 мг), растворенный в 1М вторичном кислом фосфате калия (1,5 мл, при pH,
 50 доведенном до 8,2), и смесь упаривали с получением предполагаемого соединения 13. Продукт очищали ВЭЖХ на обращенной фазе с использованием градиентного элюирования с 5 мМ фосфатным буфером, pH 8,0 и метанолом, как описано ранее (Brandis et al., 2005). Выход: 52%.

ii) Синтез конъюгата 14

Марганец вводили в соединение 13 с использованием методики, описанной в примере 2. Продукт, конъюгат 14, очищали с использованием градиентного элюирования с ацетонитрилом и водой, как описано ранее (Brandis et al., 2005).

Пример 4. Синтез конъюгата 15

Водный раствор ацетата меди (2 мг) добавляли к смеси конъюгата 13 (3 мг) (полученного в примере 3 (i)) и аскорбата натрия (2 мг) в воде. Ход реакции немедленно прослеживали спектрофотометрией. После введения меди в макроцикл продукт очищали на картридже RP-18 (Lichrolut, Merck), вначале с использованием воды для вымывания непрореагировавшего ацетата меди и аскорбатов, и затем метанолом для элюирования основного соединения, конъюгата 15, который собирали и выпаривали. Выход: 86%.

Для получения радиоактивных конъюгатов использовали аналогичный способ с другими водорастворимыми солями, чем ацетат свежеприготовленного радиоактивного изотопа ^{64}Cu или ^{67}Cu ($t_{1/2}$ равняется соответственно 12,70 ч и 2,58 суток).

Пример 5. Синтез конъюгата 17

Указанное в заголовке соединение получали, начиная с синтеза неметаллированного конъюгата 16.

i) Синтез конъюгата 16

Конъюгат 16 получали, как описано в примере 3(i), но с использованием Pheid (соединения 6) в качестве исходного соединения вместо Bpheid.

ii) Синтез конъюгата 17

Конъюгат 17 синтезировали, как описано в примере 3(ii), с использованием конъюгата 16, полученного как описано выше, в качестве исходного соединения.

Пример 6. Синтез конъюгата 18

Указанное в заголовке соединение синтезировали согласно способу, описанному в примере 5 выше, с использованием соединения 16 в качестве исходного соединения.

Пример 7. Синтез конъюгата 19

Получение конъюгата 19 схематично представлено на схеме реакций 2, приведенной ниже.

Бактериопурпурин 18 (BPP 18), соединение 4a (20 мг), полученное, как описано в разделе «Материалы и методы», и ацетат палладия (10 мг) в хлороформе (8 мл) смешивали с пальмитоиласкорбатом (25 мг) в метаноле (12 мл). Через 20 мин реакция перемешивания завершалась (ход реакции контролировали спектрофотометрически), и смесь встряхивали со смесью хлороформ/вода. Органический слой собирали, высушивали над сульфатом натрия, упаривали и очищали на колонке с силикагелем с элюированием смесью хлороформ-ацетон с получением Pd-BPP 18. UV-VIS спектр: 342, 414, 534 и 810 нм в хлороформе.

Pd-BPP 18 (18 мг) перемешивали с гидразином гидратом (12 мкл) в пиридине (8 мл) в течение 35 мин, реакционную смесь выливали в смесь хлороформа (30 мл) и 1н HCl (30 мл) и перемешивали еще в течение 2 ч. Затем органический слой высушивали над сульфатом натрия, добавляли пропансультон (50 мг) и смесь перемешивали в течение 10 мин и упаривали. Остаток обрабатывали водным раствором аммиака (28%, 3 мл) в течение 30 мин для удаления непрореагировавшего сульфтона его превращением в сульфонипропиламин и смесь вновь упаривали. Добавляли воду (3 мл) для растворения остатка и продукт очищали на картридже RP-18 (Lichrolut, Merck), вначале с использованием воды для вымывания

сульфопропиламина, и затем метанола для элюирования основного соединения с получением тем самым Pd-бактериопурпурин-N-(3-сульфопропиламино)имида (UV-VIS спектр: 344, 417, 528 и 822 нм в воде).

Pd-бактериопурпурин-N-(3-сульфопропиламино)имид (10 мг) подвергали взаимодействию в течение ночи с NHS (20 мг) в присутствии EDC (20 мг) в ДМСО (3 мл). Полученный активированный эфир очищали на колонке с силикагелем с использованием смеси CHCl_3 :MeOH (5:1), высушивали и хранили в атмосфере аргона в темноте до последующего использования.

ЦиклоRGDfK (5 мг) растворяли в 1 мл ДМСО, добавляли к активированному комплексу (5 мг) в 1 мл ДМСО и реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч и перемешивали в атмосфере аргона. Полученный конъюгат 19 очищали с использованием ВЭЖХ и идентифицировали масс-спектроскопией (ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1415 m/z).

Пример 8. Синтез конъюгата 21

Указанное в заголовке соединение получали, начиная с синтеза конъюгата 20, следующим образом.

i) Синтез конъюгата 20

Мезо-тетра(4-карбоксифенил)порфин (20 мг, 25 мкл) смешивали с сульфо-NHS (4 мг, 36 мкмоль) и EDC (6 мг, 30 мкл) в ДМСО (6 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем добавляли циклоRGDfK (20 мг, 33 мкмоль), реакционную смесь перешивали еще в течение 24 ч и затем упаривали досуха, вновь растворяли в воде и очищали ВЭЖХ на препаративной C_{18} колонке с использованием градиентного элюирования с ацетонитрилом в 20% уксусной кислоте 30-50% в течение 15 мин со скоростью потока 6 мл/мин. Очищенный конъюгат 20 высушивали при пониженном давлении и хранили при -20°C .

ii) Синтез конъюгата 21

Конъюгат 20 (4 мг) растворяли в 50% водном метаноле и добавляли водные растворы ацетата меди (2 мг) и аскорбата натрия (2 мг). Реакция завершалась в течение 2 мин (ход прослеживали спектрофотометрией). Продукт очищали на картридже RP-18 (Lichrolut, Merck), вначале с использованием воды для вымывания непрореагировавшего ацетата меди и аскорбата и затем метанолом для элюирования основного соединения, конъюгата 21, который собирали и выпаривали (UV-VIS спектр: 418 и 538 нм в воде).

Пример 9. Синтез конъюгата 22

Конъюгат 20 (4 мг), полученный в примере 8(i) выше, и ацетилацетонат гадолиния (10 мг) нагревали в имидазоле (0,3 г) при 210°C , как описано ранее (Norrocks et al., 1978). Реакция завершалась в течение 50 мин (ход прослеживали спектрофотометрией). После сублимации имидазола продукт вновь растворяли в воде и очищали ВЭЖХ, как описано в примере 8(i).

Пример 10. Синтез конъюгата 23

Конъюгат 23 получали, начиная с синтеза соединения 10.

i) Синтез соединения 10

Pd-Bpheid (соединение 7) (100 мг) растворяли в N-метилпирролидоне (1 мл) и 3-амино-2-пропандиоле (405 мг) и раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона. Продукт 10 очищали ВЭЖХ с использованием препаративной колонки YMC-C18 со смесью 0,2% уксусная кислота/ацетонитрил в качестве подвижной фазы. Выход: 86%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH

4,5/ацетонитрил. ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 805 m/z.

ii) Синтез конъюгата 23

Соединение 10 (50 мг), NHS (80 мг) и DCC (216 мг) растворяли в сухом N,N-диметилформамиде (8 мл). Раствор перемешивали в течение 90 мин при комнатной температуре в атмосфере аргона. Образовавшийся активный эфир очищали ВЭЖХ с использованием препаративной колонки YMC-C18 со смесью 0,2% уксусная кислота/ацетонитрил в качестве подвижной фазы, анализировали на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил и идентифицировали масс-спектроскопией: ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 902 m/z.

Активный эфир (10 мг) растворяли в сухом N-метилпирролидоне (1 мл). Добавляли циклоRGDfK (8 мг) и триэтиламин (10 мкл) и раствор перемешивали в течение 75 мин. Продукт очищали ВЭЖХ с использованием препаративной колонки YMC-C18 со смесью 0,2% уксусная кислота/ацетонитрил в качестве подвижной фазы. Выход: 50%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил: ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1393 m/z.

Пример 11. Синтез конъюгата 24

Соединение 8 (100 мг) активировали NHS (70 мг) и N-циклогексилкарбодиимид-N'-метилполистиролом (120 мг) в ДМФА (5 мл). Раствор перемешивали при 50°C в течение 15 ч и фильтровали через металлокерамический фильтр. ЦиклоRGDfK (100 мг) растворяли в ДМФА (5 мл), содержащем N-метилморфолин (100 мкл), и добавляли к фильтрату. Смесью перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение 24 ч, растворитель выпаривали в вакууме и продукт 24 очищали ВЭЖХ с использованием препаративной колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил в качестве подвижной фазы. Выход: 23%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 в тех же условиях. UV-VIS спектр (ВЭЖХ): 332, 386, 516 и 750 нм. ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1425 m/z.

Пример 12. Синтез конъюгата 26

К GRGDSP-смоле со снятой Fmoc-защитой (0,35 ммоль) добавляли смесь соединения 25 (530 мг, 0,7 ммоль), HOBT, PyBOP (оба 0,7 ммоль) и DIEA (2,1 ммоль) в 6 мл ДМФА и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч в атмосфере аргона. После промывания ДМФА (10×5 мл) и DCM (5×5 мл) смолу высушивали в вакууме в течение, по меньшей мере, 3 ч. Затем комплекс пептид-конъюгат отщепляли от смолы и снимали защиту (Arg, Pbf; Asp, OtBu) с использованием раствора смеси ТФК/тиоанизол/H₂O/триизопропилсилан (TIS) 85:5:5:5 (10 мл) в течение 10 мин при 0°C и затем в течение 1 ч при комнатной температуре в атмосфере Ar. Смола отфильтровывали и промывали раствором смеси (4 мл) и объединенный фильтрат упаривали в атмосфере N₂ примерно до половины объема. При добавлении холодного Et₂O (30 мл) выпадал темный осадок. Центрифугирование и декантация слоя Et₂O и дополнительная обработка холодным Et₂O (2×30 мл) давали сырое твердое темное вещество, которое затем очищали ОФ-ВЭЖХ (264 мг; 58%). Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил. ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1306 m/z.

Пример 13. Синтез конъюгатов 28-31

Указанные в заголовке соединения получали, начиная с синтеза

неметаллированного конъюгата 27 Bpheid-циклоRGDfK, следующим образом.

i) Твердофазный синтез циклоRGDfK

Fmoc-C^α-аллилзащищенную аспарагиновую кислоту присоединяли к 2-хлортритилхлоридной смоле. Затем глицин, N^G-Pbf аргинин, N^ε-Dde лизин и фенилаланин присоединяли к смоле с использованием обычной Fmoc-химии с получением комплекса fKRGD-пептидил-смола. Затем N-концевую Fmoc-группу удаляли обработкой смесью 2% пиперидин/ДМФА и удаляли C^α-аллил-группу на остатке аспарагиновой кислоты с использованием тетраakis(трифенилфосфин)палладия и 1,3-диметилбарбитуровой кислоты (DMBA) в DCM. Пептид подвергали циклизации в присутствии HOBt/PyBOP и DIEA. ε-амин остатка лизина отщепляли смесью 4% гидразин/ДМФА.

ii) Синтез конъюгата 27

Bpheid (соединение 3, 0,6 ммоль) связывали с ε-NH₂-Lys комплекса fKRGD-пептидил-смола (0,3 ммоль) в ДМФА с использованием PyBOP/HOBt (0,6 ммоль) в качестве сочетающих агентов и DIEA (1,8 ммоль) в качестве основания, с получением таким образом конъюгата 27.

(iii) Синтез конъюгатов 28-31

Конъюгат 27 (0,1 ммоль) обрабатывали на смоле соответствующим амином, приведенным в таблице 1 (5-6 ммоль), в ДМФА при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем избыток амина отмывали, продукт отделяли от смолы, снимали защиту с ТФК-содержащей смеси и, наконец, очищали ОФ-ВЭЖХ. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил. Результаты приведены в таблице 1.

		Таблица 1 Выход и данные ESI-MS конъюгатов 28-31	
Конъюгат	Амин	Выход, мг(%)	ESI-MS (+), m/z
28	бис(3-аминопропил)амин	71 (53)	1327
29	3-амино-1,2-пропандиол	63 (49)	1287
30	N-(2-аминоэтил)морфолин	75 (56)	1326
31	1,4-бис(3-аминопропил)пиперазин	75 (54)	1396

Пример 14. Синтез конъюгата 32

Конъюгат 32 получали сочетанием пептидиламина циклоRGDK-NH₂ (полученного, как описано в разделе «Материалы и методы») и Bpheid (соединения 3) в ДМФА в присутствии DCC с последующим снятием защиты с Pbf и O-tBu с использованием ТФК. Продукт очищали ОФ-ВЭЖХ. Выход: 53%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил: ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1135 m/z.

Пример 15. Синтез конъюгата 33

Конъюгат 33 получали конъюгированием соединения 8 с линейным пептидом GRGDSPK (полученным, как описано в разделе «Материалы и методы») аналогично способу, описанному для получения конъюгата 24 в примере 11. Выход: 55%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил: ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1537 m/z.

Пример 16. Синтез конъюгата 34

Конъюгат 34 получали конъюгированием соединения 8 с линейным

пептидом (GRGDSP)₄K (полученным, как описано в разделе «Материалы и методы») аналогично способу, описанному для получения конъюгата 24 в примере 11. Выход: 41%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил. MALDI-MS в режиме

Пример 17. Синтез конъюгата 35

Конъюгат 35 получали конъюгированием соединения 8 с циклоRGDf-N(Me)K (полученным, как описано в разделе «Материалы и методы») аналогично способу, описанному для получения конъюгата 24 в примере 11. Выход: 58%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил: ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1439 m/z.

Пример 18. Синтез конъюгата 36

Конъюгат 36 получали конъюгированием соединения 8 с циклическим пептидом-димером (циклоRGDyK)₂ (полученным, как описано в разделе «Материалы и методы») аналогично способу, описанному для получения конъюгата 24 в примере 11. Выход: 27%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил. MALDI-MS в режиме регистрации положительных ионов 2245 (M+2Na) m/z.

Пример 19. Синтез конъюгата 37

Конъюгат 37 синтезировали из Pd-Bpheid (соединения 7) и RGD-пептида. Пептид получали твердофазным методом сочетанием Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH со смолой со связанным остатком H-Asp-O-аллил.

i) Получение защищенного дипептида Arg-Gly

Раствор Fmoc-Gly-OH (4,162 г; 14 ммоль) и DIEA (9,755 г; 56 ммоль) в 100 мл сухого DCM перемешивали с 10 г 2-хлортритилхлоридной смолы (1,4 ммоль/г) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем Fmoc-группу удаляли обработкой смесью 5% пиперидина в ДМФА/DCM (1:1), затем 20% пиперидином в ДМФА. Затем Fmoc-Arg(Pbf)-OH (18,17 г; 28 ммоль) в ДМФА (130 мл) активировали HOBT (4,29 г; 28 ммоль) и DIC (4,34 г; 28 ммоль) в течение 15 мин при комнатной температуре и вносили в реакционный сосуд. Смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Пептидил-смолу промывали и высушивали в вакууме в течение 3 ч. Защищенный дипептид отщепляли от смолы перемешиванием с раствором смеси AcOH/2,2,2-трифторэтанол (TFE)/DCM (1:1:3) в течение 1 ч при комнатной температуре. При обработке холодным Et₂O (1:1) маслянистый остаток затвердевал. Фильтрацию и промывание холодным Et₂O давало белый осадок (8,64 г; 87,5%) с гомогенностью, равной примерно 99% (ВЭЖХ).

ii) Синтез RGD-трипептида

Присоединение третьей аминокислоты к дипептиду, полученному на стадии (i) выше, начинали с перемешивания 2-хлортритилхлоридной смолы (0,5 г; 1,4 ммоль/г) с раствором Fmoc-Asp-O-аллила (138,4 мг; 0,35 ммоль) и DIEA (244 мкл; 1,4 ммоль) в DCM в течение 1 ч при комнатной температуре с получением нагрузки, равной 0,7 ммоль/г. Затем смолу отмывали и Fmoc удаляли, как описано выше. Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH (371 мг; 0,525 ммоль), HOBT (80,4 мг; 0,525 ммоль) и DIC (81 мкл; 0,525 ммоль) растворяли в 2,5 мл ДМФА и перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Полученный раствор добавляли к промытой H-Asp-O-аллил-смоле и смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Пептидил-смолу отмывали и Fmoc удаляли.

iii) Синтез конъюгата 37

Смесь соединения 7 (268 мг, 0,375 ммоль), НОВТ (57,4 мг; 0,375 ммоль) и DIC (58 мкл; 0,375 ммоль) в 3 мл ДМФА перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре и добавляли к аликвотной порции трипептидил-смолы со снятой Fmoc-защитой, полученной как описано в п. ii) выше (примерно 0,125 ммоль). Смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре и получали конъюгат 7 с линейным RGD-трипептидом. Данную реакцию и все последующие операции с модифицированной пептидил-смолой проводили в атмосфере аргона в темноте. После промывания смолу обрабатывали этилендиамином (251 мкл; 375 ммоль) в ДМФА в течение 1 ч при комнатной температуре, затем промывали. Для удаления аллилзащитной группы смолу подвергали взаимодействию с раствором $[(C_6H_5)_3]Pd^0$ (87 мг; 0,075 ммоль) и DMBA (137 мг; 0,875 ммоль) в DCM в течение 2 ч при комнатной температуре.

Циклизацию на смоле проводили связыванием остатка Asp со снятой защитой с этилендиаминогруппой с использованием раствора RuBOP (195 мг; 0,375 ммоль) и DIEA (131 мкл; 0,75 ммоль) в ДМФА в течение 2 ч при комнатной температуре. Смолу промывали и высушивали в вакууме в течение 3 ч. Пептидный конъюгат отщепляли от смолы с использованием раствора смеси ТФК/тиоанизол/ H_2O /TIS/ЭДТ (82,5:5:5:5:2,5) в течение 10 мин при 0°C и затем в течение 1 ч при комнатной температуре. При добавлении холодного Et_2O (25 мл) получали темное твердое вещество. Сырой продукт (95 мг) очищали ОФ-ВЭЖХ с получением 2 мг чистого (98%) циклического RGD-конъюгата 37. ESI-MS 1087 (M+H) m/z.

Пример 20. Синтез конъюгата 38

Синтез проводили в объеме 0,175 ммоль с использованием способа, описанного в примере 19, но начиная с соединения Bpheid 3 вместо Pd-Bpheid 7. Сырой продукт (160 мг) очищали ОФ-ВЭЖХ с получением 17 мг чистого (98%) циклического RGD-конъюгата 38. ESI-MS 982 (M+H) m/z.

Пример 21. Синтез конъюгата 39

Способ был аналогичным описанному в примере 19, но использовали 1,4-бис(3-аминопропил)пиперазин для образования «мостика» между остатком Bpheid и остатком Asp вместо этилендиамина. Сырой продукт (158 мг) очищали ОФ-ВЭЖХ с получением 12,5 мг чистого (99%) циклического RGD-конъюгата 39. ESI-MS 1122 (M+H) m/z.

Пример 22. Синтез конъюгата 40

Конъюгат 40 получали способом, аналогичным описанному для конъюгата 24, но с использованием RGD-пептидомиметика 5-(6-гуанидиногексаноиламино)пентановой кислоты (RGD-PM1). Выход: 42%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил: ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1123 m/z.

Пример 23. Синтез конъюгата 41

Конъюгат 41 получали способом, аналогичным описанному для конъюгата 24, но с использованием линейного RGD-пептидомиметика 1-(4-гуанидинобутирил)пиперидин-3-карбонил)амино)гептановой кислоты (RGD-PM2). Выход: 66%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил: ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1120 m/z.

Пример 24. Синтез конъюгата 42

Конъюгат 42 получали способом, аналогичным описанному для конъюгата 24 в примере 11, но с пептида циклоRADfK. Выход: 30%. Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью ацетат аммония, pH 4,5/ацетонитрил: ESI-MS в режиме регистрации положительных ионов 1439 m/z.

5 Пример 25. Синтез конъюгата 43

Указанное в заголовке соединение получали, начиная с синтеза бактериофеофорбид-173-(циклоRGDfK)амида, конъюгата 27, как описано в примере 13.

10 Конъюгат 27 (0,1 ммоль) обрабатывали на смоле 1,3-пропилендиамином (6 ммоль) в ДМФА при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем отмывали избыток амина и добавляли ДТРА диангидрид (0,2 ммоль) и триэтиламин (100 мл) в безводном ДМФА (30 мл). Через 1 ч перемешивания в атмосфере аргона добавляли дистиллированную воду (50 мл) с последующим перемешиванием еще в течение 30 мин. Продукт 43 отделяли от смолы, снимали защиту с использованием содержащей ТФК смеси и, наконец, очищали ОФ-ВЭЖХ (61 мг, 37%). Анализ проводили на LC-MS с использованием аналитической колонки YMC-C18 со смесью вода/ацетонитрил: ESI-MS в режиме регистрации отрицательных ионов 1643 m/z.

20 Пример 26. Синтез конъюгата 44

Хлорид гадолиния (0,1 ммоль) в буферном водном растворе ацетата натрия (0,1M, pH 5,5) добавляли к раствору конъюгата 43 (6 мкмоль) в 2 мл ДМФА. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи при перемешивании. Образование хелатов металла подтверждали LC-MS (1799 m/z). Реакционную смесь выпаривали, и продукт очищали на картридже ОФ-18 (Lichrolut, Merck) вначале с использованием воды для отмывки непрореагировавшей соли гадолиния и затем метанолом для элюирования основного соединения, конъюгата 44, который собирали и упаривали (8 мг, 73%).

30 II. Биологический раздел

Материалы и методы

i) **Eu-меченный RGD-4C.** RGD-4C (20 нмоль в 10 мкл DDW) добавляли к 100 мкл К-фосфатного буфера (0,1M, pH 8,5), содержащего изотиоцианатофенил-ДТРА-Eu (150 нмоль, 50 мкл). Смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Для остановки реакции добавляли 1 мкл Трис-Cl буфера (1M, pH 7,5) и смесь перемешивали в течение 5 мин, затем наносили на картридж Sep-Pak C-18 и промывали DDW для элюирования свободного Eu. Затем колонку промывали 50% водным этанолом, собирали фракции (250-500 мкл) и определяли их флуоресценцию.

Опыты в условиях *in vitro*

ii) **Культивирование клеток.** Монослой эндотелиальных клеток сердца мышинных эмбрионов (H5V) культивировали в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM/F12), содержащей 25 mM HEPES, pH 7,4, 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), 2 mM глутамина, 0,06 мг/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина при 37°C в атмосфере 8% CO₂. Эндотелиальные клетки человеческой пупочной вены (HUVEC) поддерживали в среде M199 (без глутамина и солей Игла), содержащей 10 mM HEPES, pH 7,4, 20% инактивированной нагреванием FCS (56°C, 30 мин), 2 mM глутамина, 50 мг/мл гентамицина, 25 мкг/мл фактора роста эндотелиальных клеток (ECGF), 5 МЕ/мл гепарина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки H5V были любезно предоставлены Dr. Annunciata Vecchi, Istituto Mario Negri, Милан, Италия. Клетки HUVEC получали из Rambam Medical Center, Haifa, Израиль.

iii) **Солюбилизация сенсibilизаторов, пептидов и их конъюгатов для проведения опытов с клеточными культурами в условиях in vitro.**

Водорастворимые соединения 8 и конъюгат 11 растворяли в культуральной среде (DMEM/F12) или 10% FCS в среде, или в 10 мкМ BSA в среде, или в PBS перед использованием, как описано для каждого опыта. Не растворимые в воде соединения (RGD-4C, циклоRGDfK, соединение 10 и конъюгат 23) растворяли в 100% ДМСО перед использованием и разводили культуральной средой или PBS до конечной концентрации ДМСО, равной 2% об./об. Соединение 24 растворяли в 100% ДМСО перед использованием и разбавляли физиологическим раствором до конечной концентрации ДМСО, равной 5% об./об.

iv) **Источник света.** Источником света для опытов in vitro была отечественная галогеновая лампа 100W, снабженная высокочастотным фильтром пропускания ($\lambda > 650$ нм, Safelight filter 1A Eastman Kodak Co., Rochester, NY, США) и 4-см водным фильтром. Лампу использовали для облучения светом (20 мВт/см²/10 мин (12 Дж/см²)) культуральных планшетов со дна при комнатной температуре в темной комнате.

v) **Тест на фототоксичность конъюгатов RGD-пептида-фотосенсибилизатора.**

Для определения пигментной фотодинамической эффективности в условиях in vitro в стандартных условиях клетки культивировали в 96-луночных планшетах и предварительно инкубировали в течение 15 или 90 мин при 37°C или 4°C согласно указанному протоколу эксперимента с конъюгированным или неконъюгированным фотосенсибилизатором в концентрациях 0-25 мкМ в различных средах (культуральная среда DMEM/F12; 10% FCS в среде или 10 мкМ BSA в среде) при отсутствии или в присутствии избытка свободного пептида (от 100-кратного до 1 мМ). Клетки отмывали и облучали светом (20 мВт/см² в течение 10 мин). Планшеты помещали обратно в термостат для культивирования на 24 ч. Выживаемость клеток оценивали с использованием теста определения жизнеспособности клеток с окрашиванием нейтральным красным. Выживаемость клеток рассчитывали в виде процента краски, аккумулированной в необработанном контроле. Определение проводили в трех параллелях и представлены результаты показательных опытов. Использовали три контроля: i) световой контроль: клетки, облученные светом при отсутствии пигментов; ii) темновой контроль: клетки, обработанные пигментами, но которые держали в темноте, и iii) необработанные клетки, которые держали в темноте.

vi) **Тест оценки жизнеспособности с окрашиванием нейтральным красным.**

После фотосенсибилизации и 24 ч периода инкубации (37°C) определяли выживаемость клеток с использованием накопления нейтрального красного (Fluka Chemie, Buchs, Швейцария). После вычитания контрольных значений «чистую» оптическую плотность (при 570 нм) рассчитывали в виде среднего значения по трем параллелям. Выживаемость клеток рассчитывали в виде процента краски, аккумулированной в необработанных контролях.

vii) **Тест оценки отделения (округления) клеток.** Клетки H5V культивировали в виде монослоев на чашках диаметром 3 см в течение 24-48 ч и затем инкубировали в течение 1 ч со 100 мкМ RGD-4C при 4°C или 37°C. Клетки один раз отмывали и вновь инкубировали в течение 3 ч со свежей культуральной средой при 37°C. Аналогично культивировали клетки HUVEC в виде монослоев в 6-луночных планшетах, предварительно покрытых желатином, в течение 48 ч и инкубировали в течение 1 ч со 100 мкМ RGD-4C при 37°C. Клетки один раз отмывали и вновь инкубировали в

течение 24 ч со свежей культуральной средой при 37°C. С использованием световой микроскопии определяли морфологические изменения клеток.

Опыты в условиях in vivo

viii) **Животные.** Самцов голых мышей размещали и содержали со свободным доступом к корму и воде в виварии согласно правилам по уходу и обращению с лабораторными животными Institutional Animal Care and Use Committee of the Weizmann Institute of Science, Rehovot, Израиль.

ix) Модели опухолевых ксенотрансплантатов, трансплантатов и метастазов.

Культированные клеточные монослои крысиной глиомы C6 удаляли резиновым шпателем с использованием физиологического раствора. Суспензию одиночных клеток крысиной глиомы C6 ($2-4 \times 10^6$ клеток/мышь, 50 мкл) имплантировали мышам подкожно (п/к) в область спины. Штамм глиальных клеток C6 клонировали из крысиной глиомы, индуцированной N-нитрозометилмочевинной, после серии чередующегося культивирования и пассажей на животных. В течение 2-3 недель опухоли достигали размера, пригодного для лечения, т.е. диаметра 7-9 мм. Клетки глиомы крыс C6 были любезно предоставлены Prof. Michal Neeman, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Израиль.

Культированные клеточные монослои мышинной карциномы ободочной кишки BALB/c CT26luc, трансфектированные люциферазой, удаляли резиновым шпателем с использованием физиологического раствора. Суспензию одиночных CT26luc ($2-4 \times 10^6$ клеток/мышь, 50 мкл) имплантировали мышам подкожно (п/к) в область спины. CT26 представляет индуцированную N-нитрозо-N-метилуретаном-(NNMU), клеточную линию недифференцированной карциномы ободочной кишки. Ее клонировали для получения клеточной линии, обозначенной CT26WT, которую подвергали стабильной трансдукции люциферазой с получением летального субклона CT26luc. В течение 1,5-2 недель опухоли достигали размера, пригодного для лечения, т.е. диаметра 7-9 мм. Клетки CT26luc были любезно предоставлены Dina Preise, Weizmann Institute, Rehovot, Израиль.

Культированные клеточные монослои мышинной опухоли молочной железы BALB/cfC3H 4T1luc, трансфектированные люциферазой, удаляли резиновым шпателем с использованием физиологического раствора. Суспензию одиночных клеток 4T1luc ($2-4 \times 10^6$ клеток/мышь, 50 мкл) имплантировали мышам подкожно (п/к) в область спины. 4T1luc представляет резистентную к 6-тиогуанину клеточную линию, полученную из опухоли 410.4, без обработки мутагеном, которую подвергали стабильной трансдукции люциферазой с получением летального субклона 4T1luc (любезно предоставлен Shimrit Ben-Zaken, Weizmann Institute, Rehovot, Израиль). В течение 1 недели опухоли достигали размера, пригодного для лечения, т.е. диаметра 7-9 мм.

Культированные клеточные монослои метастатической человеческой опухоли молочной железы MDA-MB-231 (ATCC, США) удаляли резиновым шпателем с использованием физиологического раствора. Суспензию одиночных клеток человеческой карциномы молочной железы ($2-4 \times 10^6$ клеток/мышь, 50 мкл) имплантировали мышам подкожно (п/к) в область спины. В течение 1 недели опухоли достигали размера, пригодного для лечения, т.е. диаметра 7-9 мм.

Культированные клеточные монослои человеческой аденокарциномы яичника OVCAR-8 (любезно предоставлены Prof. Mordechai Liscovitz, Weizmann Institute, Rehovot, Израиль) удаляли резиновым шпателем с использованием физиологического раствора. Суспензию одиночных клеток аденокарциномы

яичников OVCAR-8 ($2-4 \times 10^6$ клеток/мышь, 50 мкл) имплантировали мышам подкожно (п/к) в область спины. OVCAR-8 получены от подвергшейся химиотерапии пациентки с метастазами. В течение 3-4 недель опухоли достигали размера, пригодного для лечения, т.е. диаметра 7-9 мм.

Культивируемые клеточные монослои человеческой карциномы MLS (любезно представленные Prof. Michal Neeman, Weizmann Institute, Rehovot, Израиль) удаляли резиновым шпателем с использованием физиологического раствора. Суспензию одиночных клеток человеческой MLS ($2-4 \times 10^6$ клеток/мышь, 50 мкл) имплантировали мышам подкожно (п/к) в область спины. В течение 1 недели опухоли достигали размера, пригодного для лечения, т.е. диаметра 7-9 мм.

Паховые метастазы. Культивируемые клетки CT26luc (1×10^6 клеток/мышь, 20 мкл), собранные в физиологический раствор, вводили п/к в подушечку задней конечности мышей, находящихся под анестезией. Когда иглу вводили под кожу, то поршень шприца оттягивали для проверки того, что содержимое не попадает в кровеносный сосуд. Таким образом избегали системного распространения опухолевых клеток. В течение 3 недель первичные опухоли росли до размера 6-8 мм. Метастазы в паху исследовали с использованием системы Xenogen IVIS®Imaging System, описанной в данном документе, и пальпацией.

Модель метастазов легких. Культивируемые клетки CT26luc или 4T1luc ($0,8-1 \times 10^6$ клеток/мышь, 300 мкл), собранные в физиологический раствор, вводили в/в в хвостовую вену мышей, находящихся под анестезией. Метастазы в легких исследовали с использованием системы Xenogen IVIS®Imaging System, описанной в данном документе, через 2-3 недели после введения клеток.

Мышей убивали (согласно правилам по обращению с лабораторными животными Weizmann Institute of Science), когда опухоли достигали диаметра ≥ 15 мм.

х) Анестезия. Мышей анестезировали внутрибрюшинным введением (в/б) смеси 50 мкл кетамина (100 мг/мл; Rhone Merieux, Лион, Франция) и ксилазина (2%; Vitamed, Вепуамин, Израиль) (85:15, об./об.).

xi) Источник света. Источником света для опытов в условиях *in vivo* при 763 нм или 755 нм был диодный лазер (1 Вт; Ceramoptec, Бонн, Германия) соответственно используемому фотосенсибилизатору.

xii) Солюбилизация сенсibilизаторов и их конъюгатов для проведения опытов на животных. Водорастворимый конъюгат 11 растворяли в PBS перед использованием. Не растворимый в воде конъюгат 24 растворяли в 100% ДМСО перед использованием и разводили в физиологическом растворе или PBS до конечной концентрации ДМСО, равной 5% об./об.

xiii) Биологическое распределение Pd-содержащих соединений. Подвергшимся анестезии мышам вводили в/в (в хвостовую вену) различные конъюгаты фотосенсибилизаторов (пигментов) (мышь контрольной группы: без обработки). Мышей убивали в указанные временные точки, и пробы указанных органов и тканей (крови, опухоли, кишечника, печени, селезенки, почек, семенников, сердца, легких, мозга, кожи, мышечной и жировой ткани) помещали в предварительно взвешенные флаконы и немедленно замораживали и хранили при -20°C в темноте до проведения анализа. Для подготовки проб использовали два метода: 1) каждую пробу оттаивали и гомогенизировали в DDW (1:10 мас./об.). Аликвотные порции гомогената (500 мкл) лиофилизировали в пробирках Эппендорфа. Затем к каждой сухой пробе добавляли 60 мкл HNO_3 (70%, TraceSelect, Fluka), инкубировали в течение 1 ч при 90°C и разводили DDW до 3 мл; 2) каждую пробу разбавляли (1:2

мас./об.) HNO_3 (70%, TraceSelect, Fluka). Пробы обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин в кипящей воде и оставляли, по меньшей мере, на 48 ч при комнатной температуре. Затем 140 мкл из каждой пробы добавляли к 3,36 мл DDW с получением общего объема, равного 3,5 мл, и инкубировали в течение 1 ч при 90°C.

Концентрацию Pd определяли ICP-MS.

xiv) Масс-спектрометрию, индуктивно сопряженную с плазмой (ICP-MS), проводили для определения концентрации Pd с использованием ELAN-6000 (Perkin Elmer, CT).

xv) Флуоресцентная оптическая система визуализации в условиях in vivo.

Используемой планарной флуоресцентной оптической системой визуализации была система Xenogen IVIS® Imaging System 100 Series, снабженная 1-дюймовой CCD-камерой, охлажденной до -105°C. Поле зрения составляло 15 см. Система Xenogen IVIS® Imaging System является высокочувствительной, низкосветовой системой, оптимизированной для визуализации в условиях in vivo (живых животных целиком). Система IVIS Imaging System имеет программное обеспечение и аппаратное обеспечение. Делали два снимка; первый снимок был черно-белым, который обеспечивал снимок животного. Второй снимок был цветным наложением фотонных данных, в данном случае NIR флуоресценции соединения (длина волны возбуждения 680-720 нм и длина волны эмиссии 780-810 нм) или биолюминесценции (560 нм), как описано ниже. CCD-интеграция времени составляла 10-20 сек для поддержания высокого значения соотношения сигнал-к-шуму. Динамические флуоресцентные снимки делали сразу же после введения конъюгата по изобретению и продолжали в течение примерно 2 ч. Флуоресцентные снимки также получали под анестезией изофлураном до 72 ч после первоначальной инъекции конъюгата. Введенная доза варьировала от 140 до 250 нмоль на животное. CCD интеграция времени составляла 20 сек для поддержания высокого значения соотношения сигнал-к-шуму. После завершения получения снимков проводили анализ и обработку данных с использованием программного обеспечения Living Image®, которое используется для системы IVIS Imaging System 100 Series.

Программное обеспечение Living Image® представляет промышленно доступное программное обеспечение, разработанное Xenogen, которое функционирует с системой IVIS System и обеспечивает инструмент для дисплея и анализа снимков.

xvi) Тест с люциферин. Локализацию и жизнеспособность опухолевых клеток CT26luc и 4T1luc, трансплантированных мышам, точно оценивали биолюминесцентной визуализацией в условиях in vivo (BLI). По настоящему изобретению BLI основано на свойстве репортерной молекулы фермента люциферазы светлячков испускать свет, которая катализирует превращение его субстрата D-люциферина в оксилуциферин, что приводит к эмиссии фотонов. Люциферин представляет химическое соединение, обнаруженное в клетках различных биолюминесцентных организмов. В том случае, когда люциферин окисляется под каталитическим действием люциферазы и АТФ, то продуцируется синевато-зеленый свет. Люциферин светлячков является особенно хорошей репортерной молекулой для биофотонной визуализации в условиях in vivo за счет свойств его спектра эмиссии. Пик эмиссии люциферазы светлячков (560 нм) находится в спектре видимого света и его можно детектировать и оценить количественно при использовании низкосветовых визуализирующих систем, таких как система IVIS. Перед визуализацией мышам вводили внутривенно D-люциферин (для визуализации всего тела: в дозе 55 мг/кг массы тела; для

визуализации метастазов в легких и лимфатических узлах: 77 мг/кг массы тела). Снимки в условиях *in vivo* получали с использованием системы Xenogen IVIS®Imaging System 100 Series и анализировали с помощью программного обеспечения Living Image® 2.5. Люциферин можно использовать несколькими путями. Его можно
 5 применять для мониторинга продукции света в условиях *in vivo* и его можно наблюдать с помощью системы Xenogen IVIS®Imaging System.

xvii) Протокол ФДТ. Самцов голых мышей CD-1 с различными опухолевыми ксенотрансплантами подвергали анестезии и внутривенно в хвостовую вену вводили
 10 соединение 24 (5-24 мг/кг массы тела) или соединение 8 (9 мг/кг массы тела). Опухоли облучали светом через кожу через 3,5; 6; 8; 12 и 24 ч в течение 5-30 мин световыми дозами 30-360 Дж/см². Интенсивность облучения светом: 100-200 мВт/см². После обработки мышей возвращали в клетки. Мышей считали вылеченными, если у них
 15 опухоли не обнаруживали в течение 90 суток после лечения. Мышей подвергали эвтаназии, когда диаметр опухолей достигал 15 мм. Используемыми контролями были: 1) темновой контроль, мышам внутривенно вводили пигмент и не облучали светом; 2) световой контроль: мышей облучали светом без введения пигмента; 3) необработанный контроль; 4) одно соединение 8: мышам внутривенно вводили
 20 соединение 8 и облучали светом после указанного периода времени; 5) смесь соединения 8 и циклоRGDfK: мышам внутривенно вводили соединение 8 с циклоRGDfK и облучали светом после указанного периода времени; 6) один циклоRGDfK: мышам внутривенно вводили циклоRGDfK и облучали светом после
 25 указанного периода времени. Снимки делали в указанное время после ФДТ.

xviii) Определение MPT. Обычные спин-эхо-снимки получали введением контрастного вещества для определения локализации опухоли. IR снап-снимки получали до и через 2; 5; 10; 20 и 30 мин после введения соединения 9. Для
 30 получения IR снап-снимков использовали следующие параметры: TR/TE=9,2/2,7 мсек, поле зрения (FOV)=5 см, количество опытов (NEX)=1, матрикс снимка = 128×128, толщина 2 мм и угол наклона 10°. Делали 7 снимков с использованием времени инверсии 0,05 сек, 0,25 сек, 0,4 сек, 1,8 сек, 2,5 сек, 3,6 сек и 5 сек для оценки T1.

Пример 26. Определение параметров связывания и биологической активности циклического пептида RGD-4C

Определяли параметры связывания и биологическую активность циклического нонапептида RGD-4C в целях оценки его пригодности для использования в качестве
 35 направленного на сосуды фотосенсибилизатора.

Характеристика активности связывания RGD-4C

i) Получение Eu-меченого RGD-4C. Параметры связывания для рецептора интегрин $\alpha_v\beta_3$, экспрессированного на эндотелиальных клетках (аффинность, специфичность и количество рецепторов/клетку) с использованием разрешенной во
 40 времени эмиссионной спектроскопии с Eu-меченым RGD-4C. Для этого RGD-4C метили Eu прямым конъюгированием изотиоцианатофенил-DTPA-Eu, как описано в разделе «Материалы и методы». Отделение Eu-RGD-4C от свободного изотиоцианатофенил-DTPA-Eu проводили с использованием колонки Sep-Pak C-18. Колонку промывали 50% водным раствором этанола, собирали фракции и
 45 определяли их флуоресценцию, как описано в разделе «Материалы и методы». Дополнительное промывание 100% этанолом не выявило удерживания сколь-нибудь значительного количества содержащего Eu материала на колонке. Конечный продукт Eu-RGD-4C количественно элюировали в виде одного пика (фиг.3А), что

подтверждали анализом масс-спектрометрией (1499 m/z) (фиг.3B).

ii) **Тест связывания с рецептором интегрин $\alpha_v\beta_3$.** Активность связывания Eu-RGD-4C с рецептором интегрин определяли с использованием мышиных эндотелиальных клеток H5V в культуре. Для проведения теста связывания клетки H5V высевали в 48-луночный планшет (10^5 /лунку) на 48 ч. Планшеты инкубировали при 4°C (для ингибирования эндоцитоза рецепторов), один раз промывали охлажденным на льду буфером для связывания (0,1% BSA в DMEM:F-12) и инкубировали в течение 2 ч с Eu-RGD-4C в возрастающих концентрациях (общее связывание) при отсутствии или в присутствии 1 мкМ RGD-4C (неспецифическое связывание). Инкубацию останавливали трехкратным промыванием охлажденным на льду буфером для связывания и добавляли раствор для стимуляции (300 мкл/лунку) для лизирования клеток и высвобождения хелатированного Eu. Из каждой лунки отбирали пробы (200 мкл) и определяли их флуоресценцию с использованием разрешенной во времени флуорометрии. «Чистое» специфическое связывание рассчитывали вычитанием неспецифического связывания из общих значений для каждой концентрации. Процент неспецифического связывания из общего добавленного лиганда равнялся $4,9 \pm 2,4\%$ (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Соотношение общего связывания к неспецифическому связыванию возрастало от ~ 1 при низкой концентрации лиганда до ~ 4 при наиболее высокой концентрации. Результаты по связыванию и анализ Scatchard приведены соответственно на фиг.4 и 5 для типичного опыта.

Значения параметров связывания лиганда рассчитывали по результатам анализа Scatchard: ($1/K_d = K_d$, аффинность тестируемого соединения) и B_{max} (максимальное число сайтов связывания) равнялись соответственно 37,2-41,3 нМ и 4,3-7,7 нМ (1-1,8 млн рецепторов на клетку). Таким образом, Eu-RGD-4C специфически связывается с эндотелиальными клетками H5V. Данные результаты подтверждают сообщения других авторов о том, что RGD-4C является сильным лигандом для рецептора интегрин $\alpha_v\beta_3$ (константа аффинности ~ 100 нМ). Наличие специфического связывания с рецептором интегрин $\alpha_v\beta_3$ было дополнительно показано с использованием теста связывания с выделенным $\alpha_v\beta_3$ следующим образом.

iii) **Твердофазный тест с рецептором.** Связывание Eu-RGD-4C с выделенным рецептором интегрин $\alpha_v\beta_3$ оценивали с использованием разрешенной во времени флуорометрии. Каждую лунку титрационного микропланшета (Nunc MaxiSorb) покрывали 50 мкл выделенного рецептора (1 мкг/мл в PBS) при встряхивании при 4°C в течение ночи. Затем раствор рецептора удаляли и каждую лунку блокировали 200 мкл молока (1% мас./об. сухое молоко в PBS, 1 ч, комнатная температура). Затем планшет отмывали один раз 200 мкл PBS и инкубировали в течение 1 ч при 37°C с RGD-4C в возрастающих концентрациях в присутствии постоянного количества Eu-RGD-4C (10 млн F.U./лунку). Раствор лиганд/конкурент удаляли и каждую лунку три раза промывали 200 мкл PBS. Вносили раствор для стимуляции (200 мкл/лунку) для высвобождения хелатированного Eu. Из каждой лунки отбирали пробы (100 мкл) и определяли флуоресценцию с использованием разрешенной во времени флуорометрии (фиг.6). В данных экспериментальных условиях 100 мкМ RGD-4C приводило к уменьшению связывания Eu-RGD-4C с выделенным рецептором на 50%. Данное значение представляет наиболее сильное ослабление связывания Eu-RGD-4C, даже при наиболее высоких концентрациях RGD-4C.

Характеристика биологической активности RGD-4C

Биологический эффект связывания RGD-4C оценивали на клетках H5V и клетках пупочной вены человека (HUVEC) с использованием теста округления клеток, описанного в разделе «Материалы и методы». Морфологические изменения клеток регистрировали с использованием световой микроскопии. Как показано на фиг.7В, RGD-4C в концентрации 100 мкМ индуцировал 99% отделение эндотелиальных клеток H5V от чашки (n=200), в то время как только 5% округленных клеток наблюдали при отсутствии RGD-4C (см. фиг.7А). Данный эффект был обратимым, поскольку клетки восстанавливались после инкубации в течение 3 ч со свежей культуральной средой (8% округленных клеток на чашках в присутствии RGD-4C против 6% при отсутствии RGD-4C).

Аналогично клеткам H5V RGD-4C в концентрации 100 мкМ индуцировал отделение HUVEC от чашки обратимо, поскольку клетки восстанавливались через 24 ч повторной инкубации со свежей культуральной средой (фиг.8: на верхних панелях показано отделение клеток HUVEC в присутствии RGD-4C в возрастающих концентрациях (0-200 мкМ), в то время как на нижних панелях показано восстановление клеток через 24 ч после замены среды на свежую порцию).

Таким образом, эффект RGD-4C является обратимым, поскольку удаление RGD-4C тщательным промыванием и последующим поддержанием тестируемых эндотелиальных клеток в культуре в течение 3 ч (H5V) или 24 ч (HUVEC) приводит к полному восстановлению их адгезивных свойств.

Пример 27. Связывание, поглощение клетками и локализация конъюгата 24 in vitro

Характер связывания конъюгата RGD-BChI имеет очень большое значение в понимании механизма его действия. Конъюгат 24 воспроизводит детектируемую NIR флуоресценцию и его связывание и локализацию в клетках определяли in vitro с использованием флуоресцентного микроскопа. Культивированные эндотелиальные клетки H5V инкубировали с 25 мкМ соединения 24 в среде DMEM/F12 с 10% FCS в течение 2 ч при 37°C. Затем клеточную культуру промывали и добавляли PBS++. При использовании обычного флуоресцентного микроскопа соединение 24 возбуждали при 520 нм и эмиттированную флуоресценцию детектировали при 780 нм.

Как свидетельствуют данные, приведенные на фиг.9, конъюгат 24 проникал в эндотелиальные клетки и концентрировался вокруг ядра в гранулоподобных структурах.

Для сравнения оценивали поглощение клетками неконъюгированного соединения 8. Культивированные клетки H5V инкубировали с 25 мкМ соединения 24 или соединения 8 в среде DMEM/F12 с 10% FCS в течение 20 мин или 2 ч при 37°C. Затем клеточную культуру промывали и добавляли PBS++. Проводили возбуждение при 520 нм и эмиттированную флуоресценцию детектировали при 780 нм. На фиг.10 показано, что поглощение клетками конъюгата проходило быстрее по сравнению с соединением 8.

Примечательно, что высокие концентрации сыворотки крови (75% против 10% FCS) приводили к снижению поглощения конъюгата 24 клетками. Результаты проведенных заявителями количественных исследований по зависимости структура-функция подчеркивали роль структуры фотосенсибилизатора во взаимодействии с сывороточными белками. На основании данных исследований можно предположить, что сывороточный альбумин принимает активное участие в транспорте соединения 8 в и из обработанных клеток. Кроме того, поглощение соединения 8 клетками,

клиренс и фототоксичность для клеток опосредуются молекулами BSA, которые подвергаются постоянному опосредуемому рецептором поглощению и секреции. В отношении конъюгата 24, то аффинность фрагмента бактериохлорофилла по отношению к сывороточному альбумину модифицирует биодоступность конъюгата для рецептора интегрин $\alpha_v\beta_3$. Это обстоятельство может объяснить наблюдаемое снижение накопления конъюгата в клетках в присутствии высоких концентраций сывороточного белка (фиг.10). Более высокое накопление конъюгата 24 по сравнению с соединением 8 в условиях *in vitro* на каждую тестируемую временную точку можно объяснить тем фактом, что RGD-конъюгат поступает в клетку опосредуемым рецептором интегрин эндоцитозом и/или неспецифическим эндоцитозом, как неконъюгированное соединение 8.

Пример 28. Биологическое распределение конъюгата 24 и соединения 8 в условиях *in vivo*

Конъюгаты по изобретению являются потенциальными носителями для лекарственных препаратов. Следовательно, их биологическое распределение в условиях *in vivo* имеет очень большое значение. Для количественной оценки концентраций конъюгата в тканях-мишенях использовали ионную масс-спектроскопию, сопряженную с плазмой (ICP-MS) для анализа центрального атома М (например, Pd, Cu) в органе-мишене. Стабильное связывание центрального атома металла делает возможным мониторинг и точное определение зависимой от времени концентрации соединения в органах-мишенях. Биологическое распределение конъюгата 24 и соединения 8 определяли на самцах голых мышей CD1 с опухолевыми ксенотрансплантатами крысиной глиомы C6, как описано в разделе «Материалы и методы» с использованием метода (2) для подготовки проб. Биологическое распределение конъюгата 24 также определяли на самцах голых мышей CD1 с опухолевыми трансплантатами мышинной карциномы ободочной кишки CT26luc и самцах голых мышей CD1 с опухолевыми трансплантатами мышинной карциномы молочной железы 4T1luc.

Результаты, приведенные на фиг.11A-11D, указывают на накопление конъюгата 24 в различных опухолевых тканях до 8 ч после введения, что сопровождалось постоянным снижением концентрации конъюгата в крови. Кроме того, оказалось, что характер биологического распределения конъюгата 24 не зависит от природы опухоли (крысиная глиома (фиг.11A), мышинная карцинома ободочной кишки CT26luc (фиг.11B) и мышинная карцинома молочной железы 4T1 (фиг.11C)).

Биологическое распределение соединения 8, введенного голым мышам CD1 с опухолевыми ксенотрансплантатами крысиной глиомы C6, представляло совершенно иную картину, что показано на фиг.12: соединение 8 быстро выделялось у животных и отсутствовало его избирательное накопление или удержание в опухолевой ткани на все временные точки. Накопление конъюгата 24 в опухолевой ткани, с максимальным значением через 8 ч после введения, в противоположность соединению 8 (фиг.12), указывает, что потенциальный носитель для лекарственных препаратов конъюгат 24 можно использовать для направленной доставки препаратов и можно применять для визуализации опухолей и ангиогенеза.

Кроме того, следует отметить, что концентрации аккумулированного конъюгата в опухолевой ткани достигали значений на уровне мкМ, в то время как сообщалось, что меченые циклоRGDfK и циклоRGDfK, конъюгированные с другими хелатными комплексами металлов, достигали концентраций на уровне только нМ (Haubner et al., 2001; Janssen et al., 2002a; Janssen et al., 2002b; Temming, 2005). Данные сообщения

свидетельствуют о быстром поглощении конъюгированных пептидов опухолями с максимальной концентрацией через 30 мин, 1 ч или 2 ч после введения, в зависимости от структуры конъюгата. Таким образом, существенно повышенное поглощение опухолями конъюгатов по изобретению по сравнению с одним производным M-Bchl или GRD-содержащим пептидом, конъюгированным с другими хелатообразующими соединениями, можно отнести за счет конъюгации RGD-содержащего пептида с фрагментом Bchl.

Относительные концентрации конъюгата 24 в опухолевой ткани и крови приведены на фиг.11D, и представленные результаты свидетельствуют, что хотя максимальная концентрация конъюгата в опухоли имела место через 8 ч после введения, спустя 24 ч после введения его уровень в опухоли по сравнению с кровью и окружающими здоровыми тканями был еще в достаточной мере высоким для проведения избирательной направленности на сосуды визуализации (VTI) и, возможно, направленной на сосуды ФДТ (VTP).

Примечательно, что концентрация конъюгата в опухолевой ткани по сравнению с другими органами была достоверно ниже в опухолях, о клетках которых известно, что они не экспрессируют интегрин $\alpha_v\beta_3$ (например, CT26luc). Таким образом, наблюдаемое накопление аккумуляция в опухолях, в которых отсутствует интегрин $\alpha_v\beta_3$, возможно, является результатом его проникновения через сосуды.

Пример 29. Биологическое распределение конъюгата 15 в условиях in vivo

Биологическое распределение Cu-конъюгата 15 определяли на самках голых мышей CD-1 в возрасте 6-8 недель с массой тела 20-23 г и имеющих опухоли из клеток человеческой аденокарциномы молочной железы (клетки MDA-MB-231). Конъюгат вводили в хвостовую вену (30 мг/мл в 5% ДМСО/PBS) и животных убивали в выбранные временные точки. Концентрацию Cu определяли ICP-MS, как описано в разделе «Материалы и методы». Результаты ICP-MS после вычитания значения на 0 время приведены на фиг.13.

Полученные данные свидетельствовали о явном накоплении конъюгата 15 в опухоли с пиком на 8-12 ч после введения, при этом интенсивность примерно в 3 раза превышала таковую в окружающих нормальных тканях.

Пример 30. Биологическое распределение конъюгата 42 в условиях in vivo

Для оценки реальной роли распознавания RGD/интегрин определяли биологическое распределения конъюгата 42, в котором глицин в пептиде был заменен на аланин и сравнивали с биологическим распределением конъюгата 24. По данным других авторов замена только одной аминокислоты оказывала влияние на распознавание интегрином (Pierschbacher and Ruoslahti, 1987). Для этой цели преимущественно использовали RAD- или RGE-пептиды. Биологическое распределение определяли, как описано в примере 26 выше, с использованием самцов голых мышей CD-1 с опухолевыми трансплантатами клеток мышечной карциномы ободочной кишки CT26luc и концентрацию Pd определяли ICP-MS. Результаты ICP-MS приведены на фиг.14A.

Сравнение данных по биологическому распределению конъюгата 24 и конъюгата 42 (фиг.14B) показывало, что поглощение RGD конъюгата опухолевой тканью проходило быстрее по сравнению с RAD-конъюгатом и на более высоком уровне к 24 ч. Конъюгат 24 накапливался в опухолевой ткани с максимальной концентрацией через 8 ч после введения, что сопровождалось постоянным снижением уровня конъюгата в крови, в то время как концентрация конъюгата 42 в опухолевой ткани и крови через 8 ч после введения была практически одинаковой.

Важно, что оба конъюгата обеспечивали длительный фоновый уровень после введения за счет неспецифического связывания. Однако накопление RGD-конъюгата в месте опухоли было в два раза выше по сравнению с RAD-конъюгатом.

Пример 31. Флуоресцентная визуализация мышей с ксенотрансплантатами крысиной глиомы C6 после обработки конъюгатом 24 или соединением 8 в условиях *in vivo*

Динамические флуоресцентные снимки получали на самцах голых мышей CD-1 с ксенотрансплантатами крысиной глиомы C6. Флуоресцентные снимки получали с использованием системы IVIS, как описано в разделе «Материалы и методы». Оценивали клиренс введенных фотосенсибилизаторов (соединения 8 или конъюгата 24) у мышей флуоресцентной визуализацией и результаты приведены на фиг.15. Мышам с ксенотрансплантатами крысиной глиомы C6 на внутренней поверхности правой задней конечности вводили конъюгат 8 (мышь на верхних снимках) или соединение 24 в дозе 200 нмоль (мышь на нижних снимках) и снимки делали через 4; 24; 48 и 72 ч после введения.

За исключением остаточной флуоресценции в печени и селезенке отсутствовал специфический сигнал от животного, обработанного соединением 8 в течение 4 ч после введения согласно данным ICP-MS (фиг.12). Оказалось, что конъюгат 24 накапливается в опухоли, селезенке, печени и жировом бугорке ниже головы животного. Данные результаты визуализации, при совокупном анализе с данными ICP-MS, предполагают, что наилучшим временем для визуализации и, возможно, обработки опухоли VTP является время через 8-24 ч после введения препарата.

Пример 32. Динамическая флуоресцентная визуализация мышей с трансплантатами мышинной карциномы ободочной кишки CT26luc, трансфектированной люциферазой, после обработки конъюгатом 24

Клеточные линии, трансфектированные люциферазой, генерируют видимый свет в присутствии люцефирина, когда сохраняют жизнеспособность. Люминесценция люциферина дает возможность контролировать жизнеспособные опухолевые клетки и, таким образом, подтверждает хоминг конъюгата в опухоли, его способность к визуализации и эффективность VTP.

В целях избежания теоретической возможности возбуждения конъюгата под действием биолюминесценции люцефирина сначала делали флуоресцентные снимки и только после этого животным в/б вводили люциферин и детектировали биолюминесценцию трансфектированных опухолевых клеток.

Результаты показывают, что имело место полное наложение области сигнала NIR флуоресценции, исходящего от конъюгата 24, и области сигнала эндогенной биолюминесценции, происходящей от самих опухолевых клеток.

Динамические флуоресцентные снимки получали на самцах голых мышей CD-1 с трансплантатами мышинной карциномы ободочной кишки CT26luc, трансфектированной люциферазой, после внутривенного введения конъюгата 24 с направленным действием к рецептору интегрин. На фиг.16B-16C приведены флуоресцентные и люминесцентные снимки мыши с трансплантатом на внутренней поверхности правой задней конечности через 24 ч после введения конъюгата 24 в дозе 200 нмоль. Флуоресцентные и люминесцентные снимки получали с использованием системы Xenogen IVIS® Imaging System, как описано в разделе «Материалы и методы».

Результаты свидетельствуют, что имело место полное наложение области

сигнала NIR флуоресценции, исходящего от конъюгата 24, и области сигнала эндогенной билюминесценции, происходящей от самих опухолевых клеток.

Пример 33. Динамическая флуоресцентная визуализация мышей с трансплантатами карциномы молочной железы 4T1luc, трансфектированной люциферазой, после обработки конъюгатом 24

Динамические флуоресцентные снимки получали на мышах-самках BALB/c с трансплантатами мышинной карциномы молочной железы 4T1luc, трансфектированной люциферазой, после внутривенного введения конъюгата 24 с направленным действием к рецептору интегрина. На фиг.17А-17С приведены флуоресцентные и люминесцентные снимки двух мышей-самок с подкожными трансплантатами мышинной карциномы молочной железы 4T1, трансфектированной люциферазой, на внутренней поверхности правой задней конечности, через 24 ч после введения конъюгата 24 в дозе 200 нмоль. Флуоресцентные и люминесцентные снимки получали с использованием системы IVIS System, как описано в разделе «Материалы и методы».

Результаты свидетельствуют, что имело место полное наложение области сигнала NIR флуоресценции, исходящего от конъюгата 24, и области сигнала эндогенной билюминесценции, происходящей от самих опухолевых клеток.

Пример 34. Динамическая флуоресцентная визуализация мышей с трансплантатами карциномы яичника (MLS) после обработки конъюгатом 26

Конъюгат 26 (в дозе 8 мг/кг) вводили внутривенно животным с карциномой яичника MLS. Снимки, полученные с использованием системы IVIS, делали через 8 и 14 ч. Как показано на фиг.18, конъюгат не накапливался через 8 ч, но спустя 14 ч в опухоли и в печени наблюдали высокий уровень флуоресценции.

Пример 35. Демонстрация специфичности связывания конъюгата 24 с рецептором интегрина $\alpha_v\beta_3$ с помощью флуоресцентной визуализации

Специфическое связывание определяется, как таковое, которое ингибируется неконъюгированным сенситизатором. Таким образом, для демонстрации специфичности связывания конъюгата 24 в условиях *in vivo*, заявители предприняли попытки блокировать его накопление конкуренцией со свободным циклоRGDfK за связывание с теми же сайтами связывания. Флуоресцентную визуализацию проводили через 24 ч после введения одного конъюгата 24 в дозе 140 нмоль (фиг.19, левая мышь на обеих панелях с опухолью на внутренней поверхности правой задней конечности) или после введения конъюгата 24 в дозе 140 нмоль через 1 ч после введения избытка «свободного» (8,5 мкмоль) пептида циклоRGDfK мышам с ксенотрансплантатами глиомы С6 (фиг.19, правая мышь на обеих панелях с опухолью на внутренней поверхности левой задней конечности). Флуоресцентные снимки ксенотрансплантатов с заблокированным рецептором при том же времени экспозиции приведены на фиг.19 в одном линейном цветовом масштабе для того, чтобы можно было сделать количественное сравнение. Интенсивность флуоресценции от опухоли была выше, когда конъюгат 24 вводили один по сравнению с введением пептида циклоRGDfK за час до введения агента для получения изображения. В нормальных тканях предварительное введение пептида циклоRGDfK не оказывало влияния на поглощение.

Результаты показывают, что поглощение конъюгата 24 в областях локализации опухолей было: i) достоверно выше по сравнению с контралатеральными областями нормальной ткани и ii) оно блокировалось предварительным введением избытка пептида циклоRGDfK. В совокупности данные позволяют заключить, что

«свободный» пептид циклоRGDfK ингибировал накопление конъюгата 24 и снижение поглощения конъюгата 24, возникающее в результате предварительного введения избытка пептида циклоRGDfK, свидетельствует о молекулярной специфичности конъюгата к рецепторам $\alpha_v\beta_3$ в условиях *in vivo*.

Пример 36. Динамическая флуоресцентная визуализация после обработки конъюгатом 42

Для оценки реальной роли распознавания RGD/интегрин в условиях *in vivo* получали динамические флуоресцентные снимки на самцах голых мышей с трансплантатами CT26luc на внутренней поверхности задней конечности через 24 ч после введения конъюгата 24 (фиг.20, левая мышь в каждой панели) или конъюгата 42, в котором глицин в пептиде заменяли на аланин (циклоRADfK; правая мышь на каждой панели). Поскольку сигнал флуоресценции от RGD-конъюгата в опухолевой ткани достигает максимума через 3,5-4 ч после введения, то представлены снимки, полученные через 4 ч после введения препарата. Важно, что оба конъюгата обеспечивали длительный фоновый уровень флуоресценции после введения за счет неспецифического связывания. Однако интенсивность флуоресценции RGD-конъюгата была четко выше по сравнению с RAD-конъюгатом в месте опухоли. Данные результаты количественно подтверждались результатами ICP-MS, которые свидетельствовали о том, что накопление RGD-конъюгата в опухолевой ткани было почти в два раза выше (см. пример 30 выше и фиг.14A).

Поскольку в клетках CT26luc отсутствует интегрин $\alpha_v\beta_3$ (хотя, они вероятно, экспрессируют некоторое количество интегрин $\alpha_v\beta_5$) (Yao et al., 2005; Borza et al., 2006) более высокая интенсивность флуоресценции конъюгата 24 из опухолей, возможно, происходит за счет его связывания (через RGD-трипептид) с интегрин $\alpha_v\beta_3$ новых эндотелиальных клеток.

На фиг.21 приведены флуоресцентные снимки голых мышей CD-1 с опухолями, происходящими из человеческой аденокарциномы яичников OVCAR-8, мышинной карциномой ободочной кишки CT26luc, человеческой эпителиальной карциномой яичников MLS и мышинной карциномой молочной железы 4T1luc через 24 ч после введения конъюгата 24. Интегрин $\alpha_v\beta_3$ экспрессируется на клетках некоторых типов солидных опухолей. В отношении указанных выше клеточных линий MLS (Schiffenbauer et al., 2002) и 4T1luc (Mi et al., 2006) сверхэкспрессируют рецепторы интегрин $\alpha_v\beta_3$ на клеточной поверхности, в то время как в клетках мышинной CT26luc отсутствуют рецепторы интегрин $\alpha_v\beta_3$, но они экспрессируют некоторое количество интегрин $\alpha_v\beta_5$ (Yao et al., 2005; Borza et al., 2006), и в OVCAR-8 отсутствуют интегрин α_v (Ross et al., 2000). Действительно, сигнал флуоресценции был достоверно выше для клеток, экспрессирующих интегрин $\alpha_v\beta_3$ (MLS и 4T1luc) по сравнению с клетками, в которых отсутствует экспрессия интегрин $\alpha_v\beta_3$ (CT26luc и OVCAR-8), возможно, за счет дополнительной аккумуляции в самих опухолевых клетках. Наблюдаемое различие между накоплением соединений в двух опухолях с отрицательной реакцией на интегрин $\alpha_v\beta_3$ (CT26luc и OVCAR-8), возможно, отражает i) различие в их неоваскуляризации, поскольку в них обеих отсутствуют интегрин $\alpha_v\beta_3$, ii) оно, возможно, за счет дополнительной аккумуляции в самих опухолевых клетках CT26luc, поскольку они экспрессируют интегрин $\alpha_v\beta_5$, который может специфически связываться с конъюгатом RGD-BChl.

Пример 37. Динамическая флуоресцентная визуализация метастазов в легких Детектирование метастазов карциномы молочной железы 4T1luc в легких

проводили с конъюгатом 24 через 24 ч после его введения мышам-самкам BALB/c (в дозе 15 мг/кг) (фиг.22). Данные результаты показывают, что поглощение конъюгата 24 в областях метастазов в легких можно контролировать флуоресценцией с относительно высокой точностью.

Затем детектировали метастазы в легких на модели CT26luc, как функцию времени после введения конъюгата 24 (через 4; 9 и 24 ч, в дозе 15 мг/кг; фиг.23А-23I). Самцы голых мышей CD-1 с метастазами в легких CT26luc, которым не вводили конъюгат (фиг.23G-23H), и самцы голых мышей CD-1 без метастазов легких, которым вводили в/в конъюгат 24 (фиг.23I), служили в качестве контролей. Результаты флуоресцентной визуализации показывали, что поглощение конъюгата 24 в областях метастазов было достоверно выше по сравнению с окружающими нормальными тканями, с наиболее высоким соотношением к фону на 24 ч после введения.

Пример 38. Динамическая флуоресцентная визуализация метастазов в лимфатических узлах

Делали снимки и фотографировали самцов голых мышей CD-1 с первичной опухолью CT26luc на внутренней поверхности их левой конечности и метастазами в лимфатических узлах через 24 ч после в/в введения конъюгата 24 (в дозе 15 мг/кг). Детектирование метастазов CT26luc в лимфатических узлах было возможным по локализации конъюгата 24. На фиг.24 приведены черно-белая фотография, сигнал биолюминесценции, воспроизводимый в результате взаимодействия люциферина с трансфектированными люциферазой опухолевыми клетками и флуоресцентный снимок мыши.

Данные результаты указывают, что мониторинг опухолей в первичных и метастатических областях (легких, лимфатических узлах) можно проводить по флуоресценции с относительно высокой точностью.

Пример 39. Магнитно-резонансная томография (МРТ) мышей с ксенотрансплантатами крысиной глиомы C6 с использованием соединения 9 в качестве контрастного вещества

Исследования проводили на самцах голых мышей CD-1 (со средней массой тела ~30 г) с ксенотрансплантатами крысиной глиомы C6 (диаметром 10-15 мм; левый бок, подкожные). Для МРТ использовали 7 мышей со стимуляцией Mп-13²-ОН-Vrheid (соединение 9) (в дозе 15 мкмоль/кг).

На основании рассчитанных графиков соотношения интенсивности сигналов и соотношения релаксации было показано, что соединение 9 в дозе 15 мкмоль/кг повышало соотношение релаксации опухоль/нормальная ткань от 0,8-1,0 до ~1,4 примерно через 10 мин после введения вещества. Контрастный эффект, полученный с соединением 9, был выше по сравнению с известными Gd-содержащими контрастными веществами.

С учетом более высокого контрастного эффекта, полученного при использовании соединения 9, по сравнению с Gd-содержащими контрастными веществами и предполагаемым пролонгированным удерживанием соответствующего Mп-содержащего циклоRGDfK конъюгата 12 в опухоли, что способствует длительной интеграции МР-сигнала, заявители предполагают получение лучшей визуализации при использовании данного конъюгата по сравнению с другими контрастными веществами, такими как Gd-DTPA.

Пример 40. Направленная фототоксичность в условиях in vitro

Для оценки фотодинамического эффекта конъюгата RGD-пептида-фотосенсибилизатора по сравнению с неконъюгированным фотосенсибилизатором

оценивали фототоксичность конъюгата 23 и неконъюгированного фотосенсибилизатора 10 по показателю выживаемости культивированных эндотелиальных клеток H5V после ФДТ.

Клетки H5V инкубировали в течение 90 мин при 37°C с конъюгатом 23 или соединением 10 в концентрации 0-25 мкМ в различных средах, облучали светом и их выживаемость оценивали с использованием теста определения жизнеспособности клеток с окрашиванием нейтральным красным, как описано в разделе «Материалы и методы». Кривые зависимости доза-выживаемость клеток H5V, обработанных фотосенсибилизаторами в различных условиях, приведены на фиг.25А-25С: 10% FCS в среде (фиг.25А), культуральная среда DMEM/F12 (25В) и 10 мкМ BSA в среде (25С).

Было установлено, что фототоксическое действие конъюгата 23 и соединения 10 в различных средах зависело от дозы света и концентрации препарата. Основываясь на значениях LD₅₀ заявители могли прийти к заключению, что фотодинамическое действие конъюгата 23 выше по сравнению с таковым у неконъюгированного фотосенсибилизатора 10.

Направленная фототоксичность определяется, как таковая, которая ингибируется свободным лигандом. Таким образом, были проведены дальнейшие опыты с целью блокирования фототоксичности введением свободного циклоRGDfK, который конкурирует за связывание с клетками с конъюгатом 23. Клетки H5V инкубировали в течение 90 мин при 37°C соединением 10 или конъюгатом 23 в концентрации 0-25 мкМ в различных средах (10% FCS в среде или 10 мкМ BSA в среде) при отсутствии или в присутствии избытка свободного циклоRGDfK (от 100-кратного до 1 мМ). Клетки облучали светом и определяли выживаемость клеток с использованием теста оценки их жизнеспособности с окрашиванием нейтральным красным, как описано выше.

Как свидетельствуют данные фиг.26А-26D, на которых приведены кривые зависимости доза-выживаемость обработанных клеток, и как показано значениями LD₅₀ в таблице 2, присутствие избытка циклоRGDfK не оказывало влияния на проявление фототоксического эффекта конъюгата 23 и соединения 10.

Таблица 2 Значения LD ₅₀ конъюгата 23 и соединения 10 при отсутствии и в присутствии свободного пептида в различных условиях				
Соединение	Конъюгат 23	Конъюгат 23 с избытком свободного пептида	Соединение 10	Соединение 10 с избытком свободного пептида
Реакционные условия				
10 мкМ BSA в среде (90 мин, 37°C)	0,5-1 мкМ (Фиг.16С, 17D)	1 мкМ (Фиг.17D)	3,5-5 мкМ (Фиг.16С, 17В)	5 мкМ (Фиг.17В)
Культуральная среда (90 мин, 37°C)	1 мкМ (Фиг.16В)	Не делали	7 мкМ (Фиг.16В)	Не делали
10% FCS (90 мин, 37°C)	1-4 мкМ (Фиг.16А, 17С)	4 мкМ (Фиг.17С)	5-7 мкМ (Фиг.16А, 17А)	5 мкМ (Фиг.17А)
10% FCS (15 мин, 37°C)	3,5 мкМ (Фиг.18А)	2,4 мкМ (Фиг.18А)	Не делали	Не делали
10% FCS (15 мин, 4°C)	20 мкМ (Фиг.18В)	8 мкМ (Фиг.18В)	Не делали	Не делали

На основании данных результатов можно предположить, что конъюгат поступает в клетку посредством независимого от интегринного эндоцитоза в жидкой фазе, таким образом, свободный циклоRGDfK не может конкурировать с конъюгатом за связывание с клетками. Интегриннезависимое поступление в клетки может относиться к отдельным фрагментам конъюгата, фрагменту фотосенсибилизатора или пептиду циклоRGDfK. В литературе имеется одно сообщение, которое указывает, что циклоRGDfK интернализуется независимым от интегринного эндоцитозом в жидкой фазе, при котором не изменяется число функциональных

рецепторов интегрин на клеточной поверхности (Hart et al., 1994; Castel et al., 2001).

Для проверки теории эндоцитоза и с учетом того, что процесс эндоцитоза является зависимым от времени и температуры, клетки H5V инкубировали при 37 и 4°C в течение 15 мин с конъюгатом 23 в концентрации 0-20 мкМ в среде, содержащей 10% FCS, в присутствии или при отсутствии избытка циклоRGDfK (от 100-кратного до 1 мМ). Клетки облучали светом и определяли их выживаемость, как описано выше. Кривые зависимости доза-выживаемость обработанных клеток H5V приведены на фиг.27А-27В.

Значения LD₅₀, определенные при 15-мин инкубации при 37°C или 4°C, были выше по сравнению со значениями, полученными при инкубации клеток при 37°C в течение 90 мин (таблица 2). LD₅₀ конъюгата 23 изменялась от 3,5 и до 20 мкМ после 15 мин инкубации соответственно при 37 и 4°C по сравнению со значениями, полученными при инкубации при 37°C в течение 90 мин. Повышение значений LD₅₀ при снижении температуры свидетельствует в пользу гипотезы о возможной роли эндоцитоза в поглощении конъюгата.

Оказалось неожиданным, что в присутствии избытка циклоRGDfK не подвергалось блокированию не только фототоксическое действие конъюгата 23, более того фактически фотодинамическая активность конъюгата 23 в течение 15-мин инкубации при 37°C и 4°C была выше в присутствии свободного циклоRGDfK. Существует вероятность того, что избыток свободного пептида делает клетки более чувствительными к ФДТ эффекту конъюгата за счет повышенного отделения клеток от чаши и/или индуцированной трансдукции сигнала к апоптозу.

Фототоксичность конъюгата 24 определяли мониторингом выживаемости культивированных эндотелиальных клеток H5V после ФДТ. Клетки H5V инкубировали в течение 2 ч при 37°C с конъюгатом 24 в концентрации 0-25 мкМ в культуральной среде DMEM/F12 с 10% FCS. Клетки облучали светом, и их выживаемость определяли, как описано выше.

Как показано на кривой зависимости доза-выживаемость (фиг.28) фототоксический эффект конъюгата 24 на клетках H5V после инкубации в течение 2 ч при 37°C зависел от дозы света и концентрации препарата.

Также оценивали фототоксичность третьего конъюгата 11 и соединения 8 с использованием эндотелиальных клеток H5V. Клетки инкубировали в течение 90 мин при 37°C в присутствии конъюгата 11 или соединения 8 в концентрации 0-20 мкМ в 10 мкМ BSA в среде, облучали светом и определяли их выживаемость, как описано выше.

Как показано на кривой зависимости доза-выживаемость (фиг.29) фототоксический эффект конъюгата 11 и соединения 8 зависел от дозы света и концентрации препарата. Значения LD₅₀ приведены в таблице 3.

Таблица 3

Значения LD₅₀ конъюгата 11 и соединения 8 при отсутствии и в присутствии избытка свободного пептида

Соединение	Конъюгат 11	Конъюгат 11 с избытком свободного пептида	Соединение 8	Соединение 8 с избытком свободного пептида
Реакционные условия				
10 мкМ BSA в среде (90 мин, 37°C)	7-10 мкМ (Фиг.19, 20)	5 мкМ (Фиг.20)	1,8-2 мкМ (Фиг.19, 20)	2 мкМ (Фиг.20)

В отношении циклоRGDfK пептида, то с помощью внесения свободного циклического RGD-4C в культуральную среду не удалось заблокировать фототоксичность конъюгата 11 (фиг.30А-30В, таблица 3). Клетки H5V инкубировали

в течение 90 мин при 37°C с конъюгатом 11 или соединением 8 в концентрации 0-10 мкМ в 10 мкМ BSA в среде при отсутствии и в присутствии избытка RGD-4C (1 мМ). Клетки облучали светом, и их выживаемость определяли, как описано выше.

Вновь, на основании данного результата можно предположить, что фрагмент фотосенсибилизатора (соединение 8) определяет поглощение конъюгата 11 клетками посредством свободного эндоцитоза.

Пример 41. ФДТ опухоли крысиной глиомы С6 с использованием конъюгата 24

Основываясь на результатах, приведенных выше, заявители разработали новые протоколы лечения с помощью ФДТ солидных опухолей с использованием конъюгата 24. Параметры протокола должны включать: время лечения (интервал лекарственный препарат-свет) - облучение светом через 3-24 ч после введения препарата; дозу (мг/кг) - 5-24 мг/кг; продолжительность облучения светом (мин) - 5-30 мин; интенсивность облучения светом (мВт/см²) - 100-200 мВт/см²; доставленная энергия (Дж/см²) - 30-360 Дж/см².

Используемыми первоначальными опухолевыми моделями были ксенотрансплантаты крысиной глиомы С6, поскольку данные опухолевые клетки экспрессируют интегрин $\alpha_v\beta_3$ (Zhang et al., 2006) и интегрин $\alpha_v\beta_5$ (Milner et al., 1999) в дополнении к интегринам $\alpha_v\beta_3$, экспрессируемому в неоваскулярной сети опухолей.

Самцам голых мышей CD-1 с трансплантатами глиомы С6 в/в вводили конъюгат 24 в дозе 15 или 24 мг/кг или соединение 8 в дозе 9 мг/кг.

Для каждого протокола заявители использовали, по меньшей мере, 3 животных, но в результате высокой смертности осталось ограниченное количество животных. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты терапии по различным протоколам VTP с использованием конъюгата 24 на мышках с крысиной глиомой С6

Время до обработки (ч)	Доза (мг/кг)	Продолжительность облучения светом (мин)	Интенсивность облучения светом (мВт)	Доставленная энергия (Дж/см ²)	Комментарий	Количество животных
3,5	15	5	100	30	Сильный некроз	2
6	15	10	100	60	Сильный некроз	2
8	15	5	100	30	Ограниченный некроз	2
8	15	10	100	60	Ограниченный некроз	1
8	24	10	100	60	Ограниченный некроз	1
8	24	10	100	60	Сильный некроз	1
8	15	15	100	90	Сильный некроз	1

Протоколы, которые оказались оптимальными и обеспечивали наилучшие результаты лечения, выделены жирным шрифтом в таблице 4: 15 мг/кг, облучение светом в течение 15 мин (90 Дж/см²) 8 часов после введения препарата и 24 мг/кг, облучение светом в течение 10 мин (60 Дж/см²) 8 часов после введения препарата.

На фиг.31А и 31В показаны результаты лечения соответственно данным протоколам. При постановке темнового контроля (фиг.31С) мышам вводили в/в конъюгат 24 и не проводили облучение светом; при постановке светового контроля (фиг.31D) мышей облучали светом, но без введения конъюгата 24; и в контроле с применением неконъюгированного фотосенсибилизатора (фиг.31Е) мышам в/в вводили соединение 8 и облучали светом через 8 ч.

В различных контролях эффект ФДТ отсутствовал. В противоположность у

животных, обработанных конъюгатом 24 и светом, имел место сильный отек через несколько часов после ФДТ, который перешел в воспаление и некроз под кожей на 3 сутки после ФДТ. Опухоль стала плоской и затем наблюдали длительный период регрессии опухоли, а также заживление раны.

Пример 42. ФДТ мышинной опухоли ободочной кишки СТ26 с использованием конъюгата 24

При использовании модели крысиной глиомы С6 заявители не могли немедленно оценить результативность ВТР, что является большим недостатком при скрининге.

Для преодоления этой проблемы заявители использовали модель мышинной карциномы ободочной кишки СТ26luc, которая представляет трансфектированные люциферазой клетки, с помощью которых можно быстро оценить терапевтический эффект.

Самцов голых мышей CD-1 с опухолями СТ26luc подвергали обработке по различным протоколам ФДТ с использованием конъюгата, как показано в таблице 5.

<u>Таблица 5</u> Результаты терапии по различным протоколам ВТР с использованием конъюгата 24 на мышах с мышинной карциномой ободочной кишки СТ26luc						
Время до обработки (ч)	Доза (мг/кг)	Продолжительность облучения светом (мин)	Интенсивность облучения светом (мВт)	Доставленная энергия (Дж/см ²)	Комментарий	Количество животных
8	9	15	100	90	Уменьшение сигнала люминесценции, отсутствие некроза	3
8	9	10	100	60	Уменьшение сигнала люминесценции, отсутствие некроза*	5
8	11	10	100	60	Уменьшение сигнала люминесценции, выраженный некроз	4
8	12	10	100	60	Уменьшение сигнала люминесценции, выраженный некроз	3
8	15	10	100	60	Уменьшение сигнала люминесценции, выраженный некроз	4
12	15	15	100	90	Уменьшение сигнала люминесценции, ограниченный некроз	5
24	15	30	200	360	Уменьшение сигнала люминесценции, отсутствие некроза*	3
24	15	30	100	180	Уменьшение сигнала люминесценции, отсутствие некроза	2
24	24	30	100	180	Уменьшение сигнала люминесценции, отсутствие некроза	2
24	24	30	150	270	Уменьшение сигнала люминесценции, отсутствие некроза	2
24	24	30	200	360	Уменьшение сигнала люминесценции, ограниченный некроз	2

На фиг.32А-Е показаны результаты лечения при введении препарата в дозе 15 мг/кг, облучении светом в течение 10 мин (60 Дж/см²), с периодом 8 часов после инъекции конъюгата 24 мышам с опухолями СТ26luc (протокол выделен жирным шрифтом в таблице 5). На фиг.32А - конъюгат 24 вводили в/в в дозе 15 мг/кг,

облучение светом в течение 10 мин (60 Дж/см^2), 8 часов после инъекции препарата; на фиг.32B - накладываемые друг на друга снимки, сделанные после в/б введения люциферина мыши, которая была описана для фиг.32A, с использованием системы IVIS. Первый снимок является черно-белым, который представляет фотографию животного. Второй снимок - цветное наложение испускаемых фотонов. Все снимки были нормализованы к одному масштабу. 32C - количественное определение сигнала биолюминесценции (фотон/сек/см²) данных, приведенных на фиг.32B. 32D - контроль с одним соединением 8: мышам вводили соединение 8 и облучали светом через 8 ч. 32E - контроль с введением смеси соединения 8 и циклоRGDfK: мышам в/в вводили смесь соединения 8 и циклоRGDfK и облучали светом через 8 ч. 32F - контроль с введением одного циклоRGDfK: мышам в/в вводили циклоRGDfK и облучали светом через 8 ч. Снимки делали в указанное время после ФДТ.

Фиг.32B представляет накладываемые друг на друга снимки, выполненные с использованием системы IVIS после в/б введения люциферина мыши, которая показана на фиг.32A. На фиг.32C приведено количественное описание биолюминесценции, показанной на фиг.32B. Использованными контролями были: 1) одно соединение 8 (фиг.32D); 2) смесь неконъюгированного соединения 8 и циклоRGDfK (фиг.32E) и 3) один циклоRGDfK (фиг.32F). В различных контролях эффект ФДТ отсутствовал. В противоположность у животных, обработанных тестируемым конъюгатом, развивался некроз в течение 4 суток после ФДТ (фиг.32A). Высокий сигнал биолюминесценции от оставшихся опухолевых клеток появился через 8 суток после проведения ФДТ (фиг.32B), хотя опухоль не пальпировалась или визуально не детектировалась. Заживление раны и уплотнение опухоли наблюдали у всех животных, отвечавших на лечение.

На фиг.33 приведена кривая Kaplan-Mayer для протоколов, приведенных в таблице 5, отмеченных звездочками.

Пример 43. Диагностика опухоли и лечение ФДТ опухолей молочной железы с использованием конъюгата 13

Клетки человеческой карциномы молочной железы MDA-MB-231 (ATCC) трансфектировали красным флуоресцентным белком (RFP) следующим образом.

Плазмиды - плазмидой, которую использовали для трансфекции клеток, была плазида pDsRed-Monomer-Hyg-C1 (Clontech, Palo Alto, CA), которая несет ген RFP и ген резистентности к гиромоцину, в которой ген DsRed-Monomer замещен на pDsRed2 (из плазмиды pDsRed2-N1).

Трансфекция - для трансфекции использовали липофектаминTM 2000 (Invitrogen), следуя протоколу изготовителя: 4 мкг ДНК инкубировали в течение 5 мин с 250 мкл среды Opti-MEM (Invitrogen). В отдельной пробирке 10 мкл липофектамина инкубировали в течение 5 мин с 250 мкл среды Opti-MEM. После инкубации растворы ДНК и липофектамина смешивали и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и содержимое равномерно переносили в 6-луночный планшет, в котором клетки MDA-MB-231 имели 50-60% слияние.

Отбор стабильного клона - через 24 ч после трансфекции клеток MDA-MB-231 планшет исследовали под флуоресцентным микроскопом (Nikon). На данной стадии детектировали временную трансфекцию. Среду заменяли свежей средой, содержащей антибиотики (гиромоцин) в концентрации 250 мкг/мл. Когда в планшетах достигалось слияние клеток, их отделяли от культурального планшета после обработки трипсином в течение 30-60 сек и высевали в 96-луночный планшет из

расчета 0,5 клеток/лунку. Отбирали лунки, содержащие только один клон, и клон был флуоресцентный, и высевали в 6-луночный планшет. После достижения слияния их дополнительно высевали в чашки диаметром 10 см. На фиг.34А-34В показан флуоресцентный MDA-MB-231-RFP клон 3 (резистентный к гигромицину)
 5 соответственно через 1 и 3 сек воздействия.

Для опытов с ФДТ клетки MDA-MB-231-RFP (4×10^6) имплантировали мышам подкожно в области спины, и в течение 2-3 недель опухоли достигали размера, пригодного для лечения (6-8 мм).

10 **Протокол ФДТ:** мышам под анестезией в/в вводили конъюгат 13 (в дозе 7,5 мг препарата/кг массы тела). Опухоли облучали светом в течение 10 мин. Интервал между введением препарата и светом составлял 8 ч. Использовали облучение светом через кожу мышей с помощью 755 нм диодного лазера при 100 мВт/см^2 (CeramOptec, Германия). После обработки мышей пересаживали в клетки. В группе с темновым
 15 контролем мышам в/в вводили сенсibilизатор конъюгат 13 и помещали в темную клетку на 24 ч. В контрольной группе на свет мышей облучали светом в течение 10 мин при 100 мВт/см^2 . В течение 2 суток после ФДТ, при необходимости, мышам вводили анальгетики (2,5 мг/кг флуноксина ежедневно) и 3 суток - оксикод в
 20 питьевой воде. Конечной точкой выживания животных была таковая, когда размер опухоли достигал 10% от массы животного. Мышей убивали на это время (до 90 суток) дислокацией шейных позвонков.

На фиг.35А-35В представлены два показательных примера локального ответа
 25 человеческих клеток MDA-MB-231-RFP на ФДТ. Мышам с ксенотрансплантатами MDA-MB-231-RFP ($\sim 0,5 \text{ см}^3$) в области спины в/в вводили конъюгат 13 в дозе 7,5 мг/кг и облучали светом через 8 ч через кожу мышей с помощью 755 нм диодного лазера при 100 мВт/см^2 . Фиг.35А - фотографии, сделанные с 0 суток (перед обработкой) и после лечения на 1; 4; 7; 12 и 90 сутки. На 4
 30 сутки был виден частичный некроз, на 7 сутки наблюдали уплощение опухолей, через 90 суток рана заживала, и животное выздоравливало. Фиг.35В - визуализация всего тела по красной флуоресценции самцов голых мышей CD-1 с ортотопической опухолью MDA-MB-231-RFP. Сигнал отсутствовал на 90 сутки после обработки.

35 Для исследования накопления фотосенсibilизатора в первичных опухолях молочной железы клетки MDA-MB-231-RFP (4×10^6) имплантировали мышам ортотопически в подушечку молочной железы. В течение 3-4 недель опухоли достигали желаемого размера, более 1 см^2 .

40 Для оценки накопления мышей анестезировали в/б введением 30 мкл смеси кетамин:ксилазин 85:15, и им вводили в/в в хвостовую вену конъюгат 13 в дозе 15 мг/кг. Флуоресценцию опухолевых клеток и конъюгата 13 определяли с использованием системы IVIS[®]100 Imaging system (Xenogen). Основные фильтры визуализации опухолей включали: фильтр возбуждения 500-550 нм, фильтр
 45 эмиссии 575-650 нм; фоновый фильтр для вычитания аутофлуоресценции тканей; фильтр экстинкции 460-490 нм, фильтр эмиссии 575-650 нм. Основные фильтры визуализации фотосенсibilизатора включали: фильтр возбуждения 665-695 нм, фильтр эмиссии 810-875 нм.

50 Снимки делали на следующие временные точки после введения препарата: 15 мин, 1; 2; 3; 4,5; 6; 7,5; 9; 24 ч, 2; 3; 4; 5; 6; 7 суток. Результаты приведены на фиг.36 и 37.

На фиг.36 показано накопление конъюгата 13 в ортотопической человеческой

первичной опухоли молочной железы MDA-MB-231-RFP (размер опухолей $\sim 1 \text{ см}^3$). Снимки делали в период от 15 мин до 24 ч после введения препарата. Верхняя панель - визуализация целого тела по красной флуоресценции самок голых мышей CD-1 с ортотопической опухолью MDA-MB-231-RFP в условиях *in vivo*.
 5 Нижняя панель - визуализация целого тела по NIR флуоресценции накопления конъюгата 13 в условиях *in vivo*. Не наблюдали специфического накопления в опухоли в первые 24 ч.

На фиг.37 показано накопление конъюгата 13 в человеческой ортотопической
 10 первичной опухоли молочной железы MDA-MB-231-RFP (размер опухолей $\sim 1 \text{ см}^3$). Снимки делали в период от 1 до 6 суток после введения препарата. Верхняя панель - визуализация целого тела по красной флуоресценции самок голых мышей CD-1 с ортотопической опухолью MDA-MB-231-RFP в условиях *in vivo*. Нижняя панель -
 15 визуализация целого тела по NIR флуоресценции накопления конъюгата 13 в условиях *in vivo*. Наблюдали накопление препарата в опухоли с пиком концентрации специфически в опухоли с 2 суток после введения препарата.

Схема 1

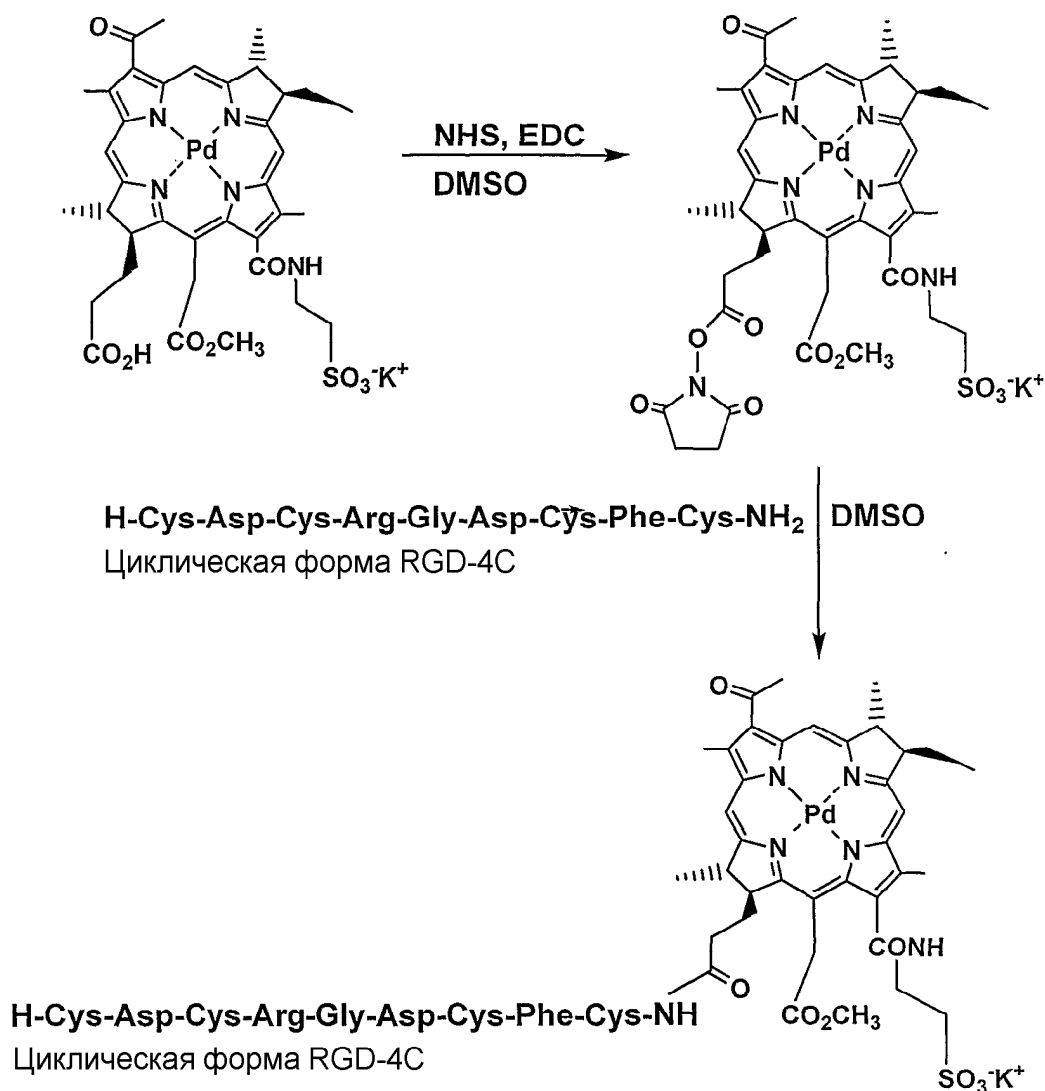


Схема 2

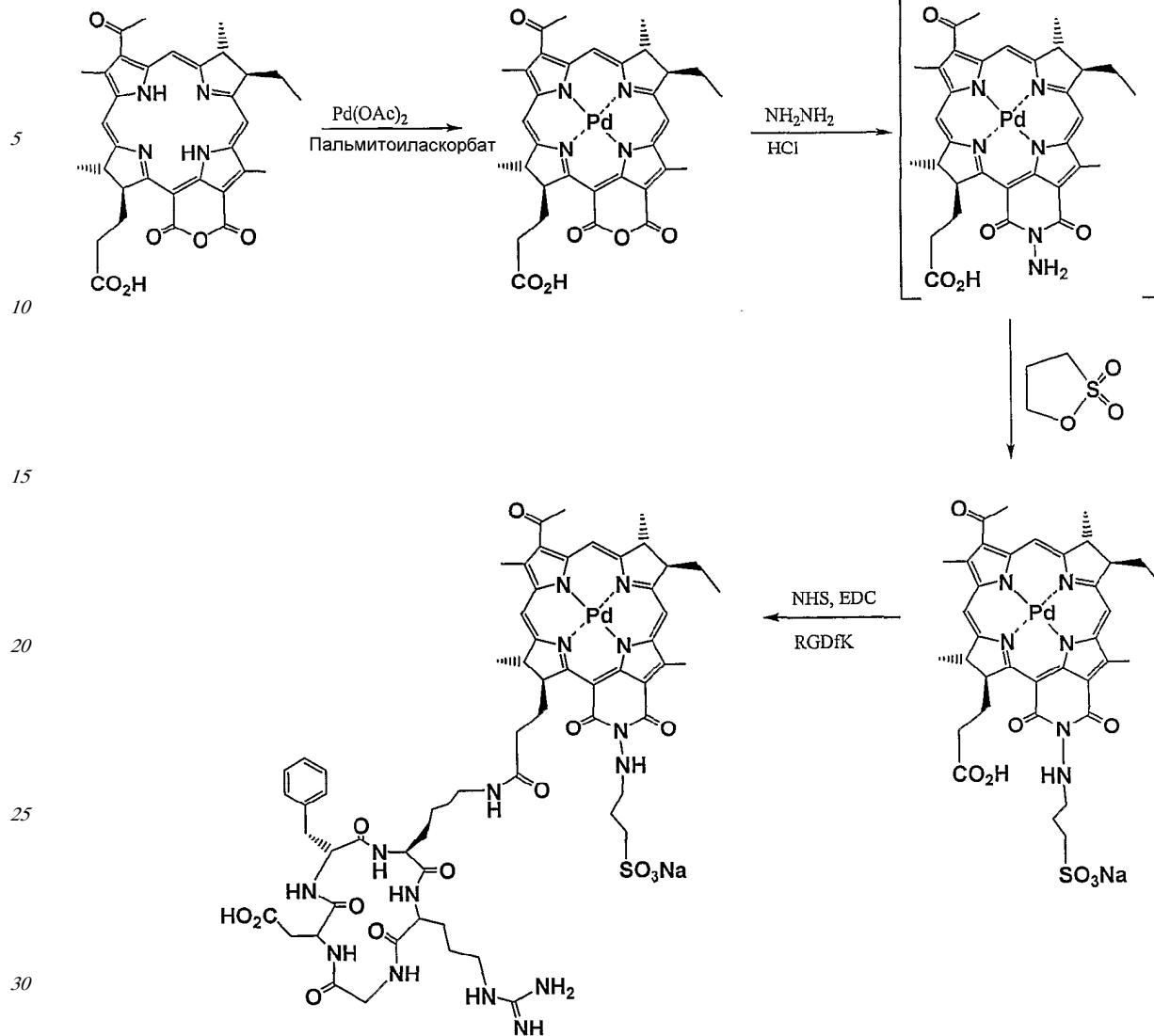


Схема 3



15

20



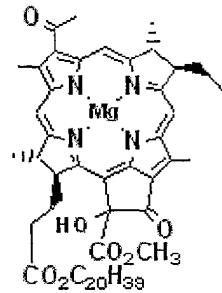
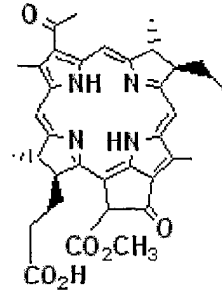
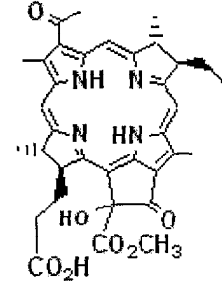
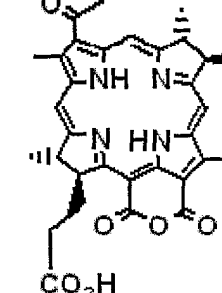
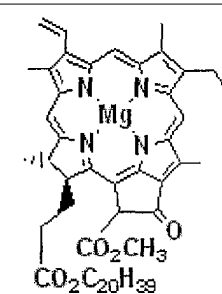
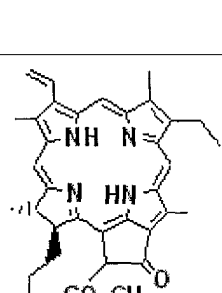
30

35

40

45

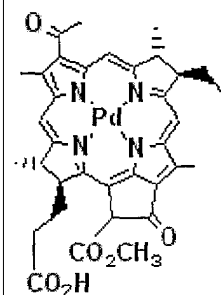
50

5	2	13 ² -ОН-бактериохлорофилл	
10	3	Бактериофеофорбид	
15	4	13 ² -ОН-бактериофеофорбид	
20	4a	Бактериопурпурин 18	
25	5	Хлорофилл	
30	6	Феофорбид	
35			
40			
45			
50			

5

7

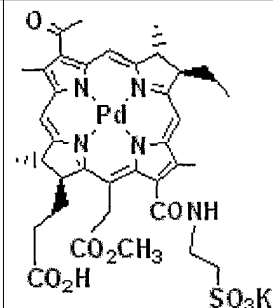
Палладий бактериофеофорбид



10

8

Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид калиевая соль

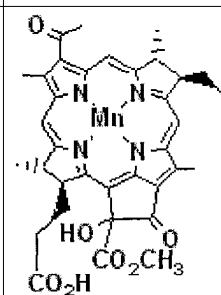


15

20

9

Марганец (III) 13²-ОН-бактериофеофорбида

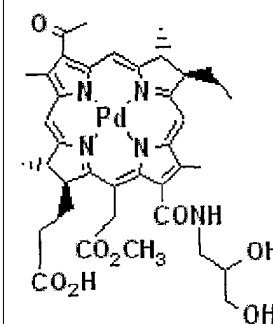


25

30

10

Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2,3-дигидроксипропил)амид калиевая соль

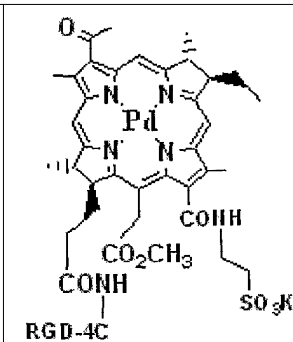


35

40

11

Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(RGD-4C)амид калиевая соль



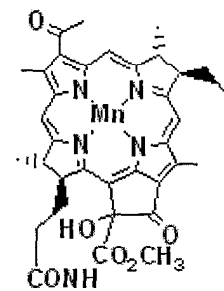
45

50

5

12

Марганец(III) 13²-ОН-бактериофеофорбид-17³-
(циклоRGDfK)амид



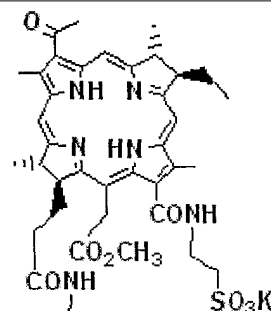
циклоRGDfK

10

15

13

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая
соль



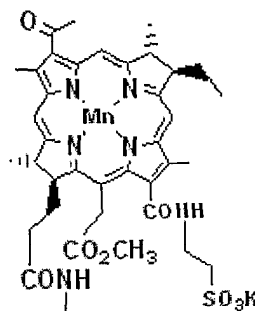
циклоRGDfK

20

25

14

Марганец(III) 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-
родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-
(циклоRGDfK)амид калиевая соль



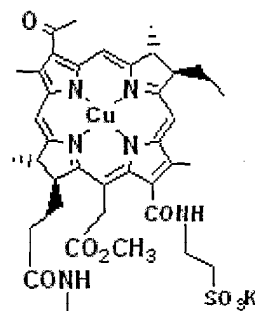
ЦИКЛОRGDfK

30

35

15

Медь(II) 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-
родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-
(циклоRGDfK)амид калиевая соль



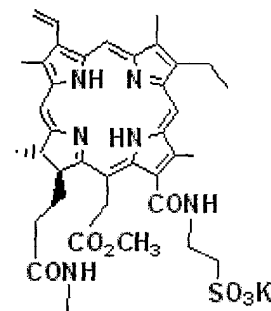
циклоRGDfK

40

45

16

3¹,3²-Дидегидрородохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-
(циклоRGDfK)амид калиевая соль



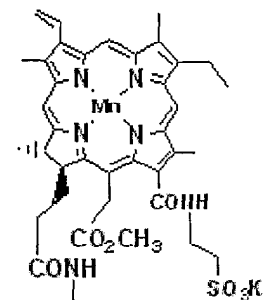
циклоRGDfK

50

5

17

Марганец(III) 3¹,3²-дидегидрородохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль



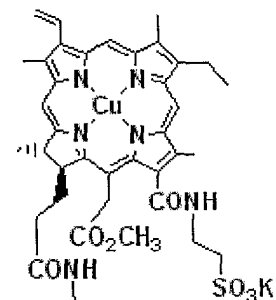
циклоRGDfK

10

15

18

Медь(II) 3¹,3²-дидегидрородохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль



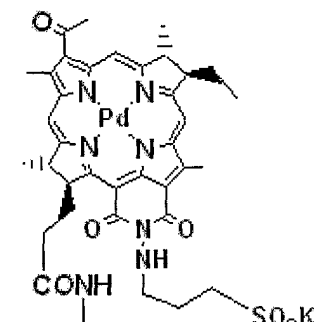
циклоRGDfK

20

25

19

Палладий бактериопурпурин N-(3-сульфопропиламино)имид-17³-(циклоRGDfK)амид калиевая соль



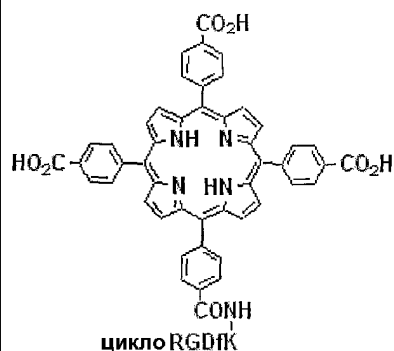
циклоRGDfK

30

35

20

Мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфин



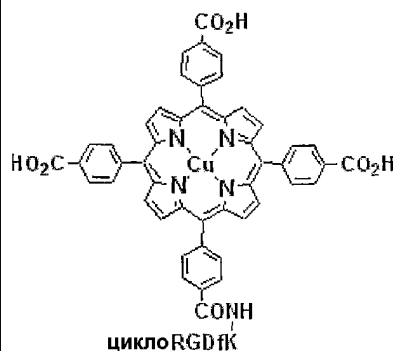
циклоRGDfK

40

45

21

Медь(II) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфин



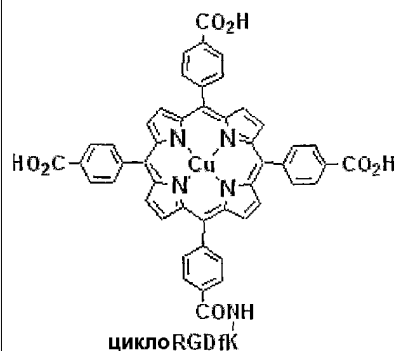
циклоRGDfK

50

5

22

Гадолиний(III) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-
трис(4-карбоксифенил)порфин

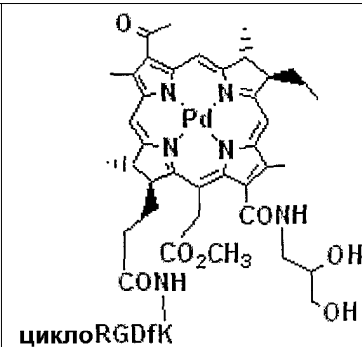


10

15

23

Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-
родобактериохлорин 13¹-(2,3-дигидроксипропил)амид-17³-
(циклоRGDfK)амид

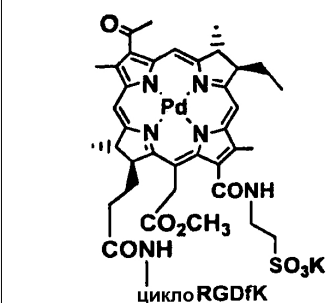


20

25

24

Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-
родобактериохлорин 13¹-(2,3-сульфоэтил)амид-17³-
(циклоRGDfK)амид калиевая соль

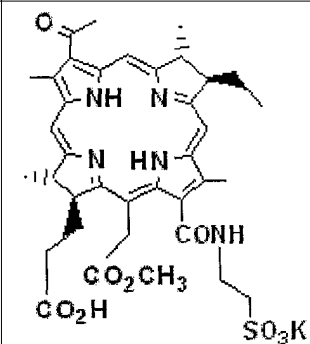


30

35

25

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-(2-сульфоэтил)амид калиевая соль

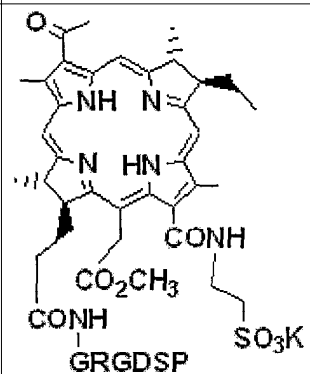


40

45

26

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-(GRGDSP)амид калиевая соль

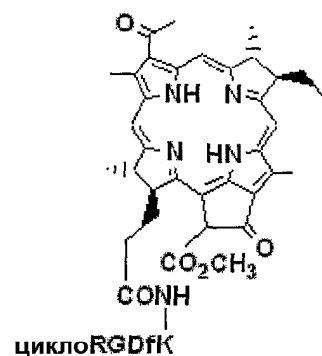


50

5

27

Бактериофеофорбид-17³-(циклоRGDfK)амид

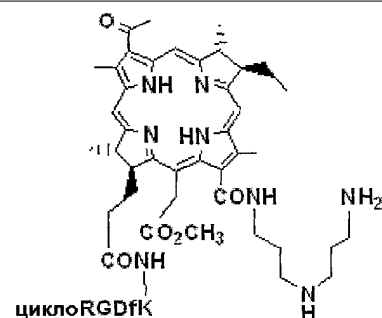


10

15

28

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-(3-[(3-аминопропил)амино]пропил)
амид-17³-(циклоRGDfK)амид

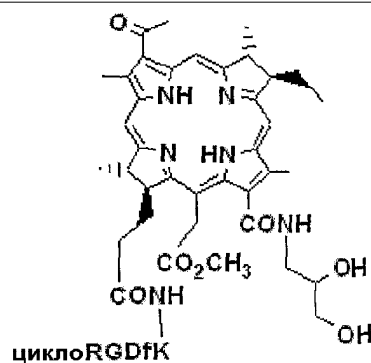


20

25

29

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-(2,3-дигидроксипропил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид

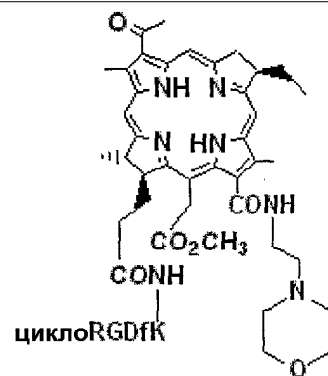


30

35

30

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-(2-морфолино-N-этил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид

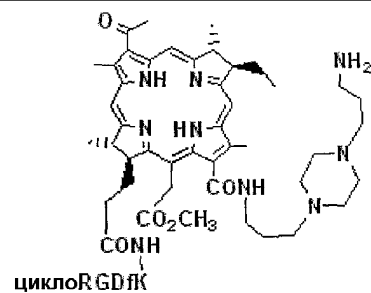


40

45

31

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-{3-[4-(3-аминопропил)пиперазин-1-ил]пропил} амид-17³-
(циклоRGDfK)амид



50

5

10

15

20

25

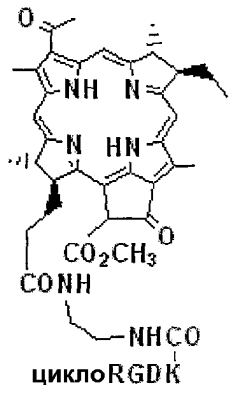
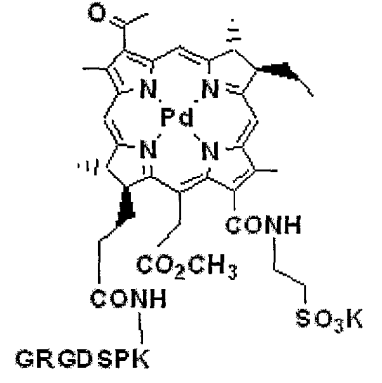
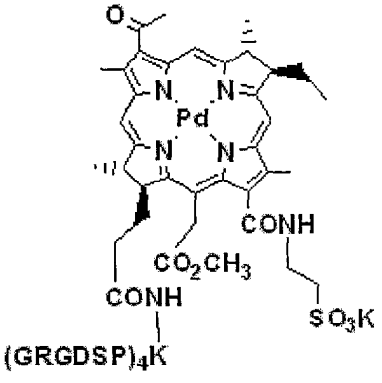
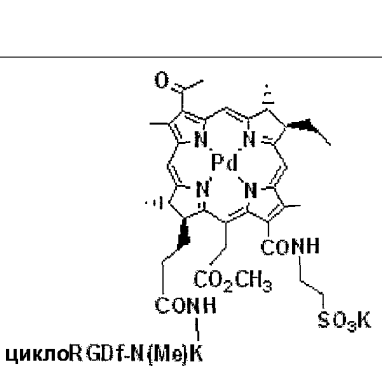
30

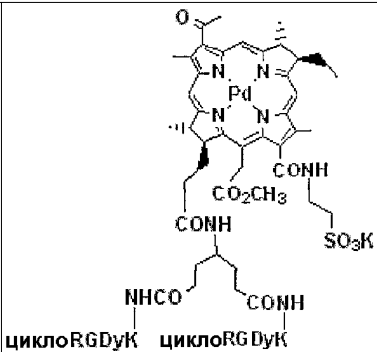
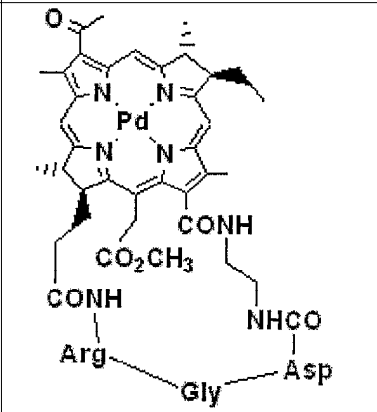
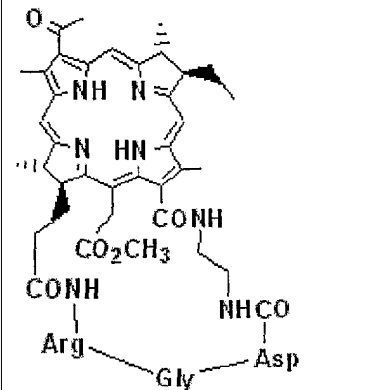
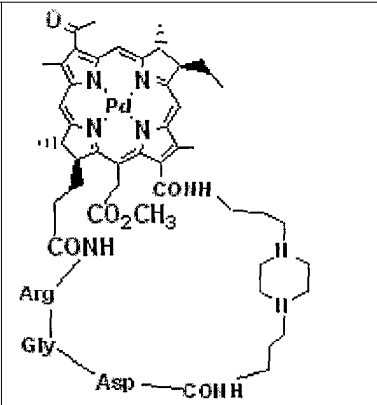
35

40

45

50

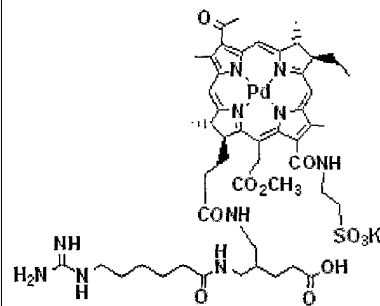
32	Бактериофеофорбид-17 ³ -(2-циклоRGDK-амидо-N-этил)амид	
33	Палладий 3 ¹ -оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13 ¹ -(2-сульфоэтил)амид-17 ³ -(GRGDSPK)амид калиевая соль	
34	Палладий 3 ¹ -оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13 ¹ -(2-сульфоэтил)амид-17 ³ -[(GRGDSP) ₄ K]амид калиевая соль	
35	Палладий 3 ¹ -оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13 ¹ -(2-сульфоэтил)амид-17 ³ -(циклоRGDf-N(Me)K)амид калиевая соль	

5 10	36	Палладий 3 ¹ -оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13 ¹ -(2-сульфоэтил)-17 ³ -N-[4-гептандикислота бис(циклоRGDyK-амидо)]амид калиевая соль	
15 20	37	Палладий 3 ¹ -оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13 ¹ ,17 ³ -цикло(2-RGD-амидо-N-этил)диамид	
25 30	38	3 ¹ -оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13 ¹ ,17 ³ -цикло(2-RGD-амидо-N-этил)диамид	
35 40 45	39	Палладий 3 ¹ -оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин 13 ¹ ,17 ³ -цикло{3-[4-(3-аминопропил-RGD-амидо)пиперазин-1-ил]пропил}диамид	

5

40

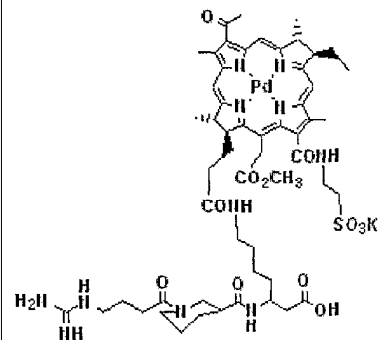
Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-
родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-[4-
(метил-5-(6-гуанидиногексаноиламино)пентановая кислота)]
амид калиевая соль



10

41

Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-
родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-[7-
амидо-3-[[1-(4-гуанидинобутирил)пиперидин-3-карбонил]
амино]гептановая кислота] калиевая соль

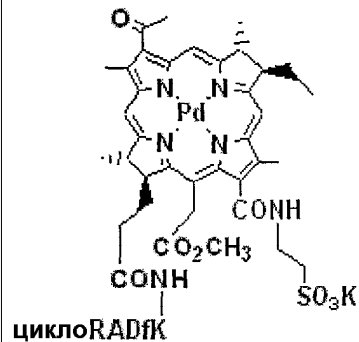


15

20

42

Палладий 3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-
родобактериохлорин 13¹-(2-сульфоэтил)амид-17³-
(циклоRADfK)амид калиевая соль



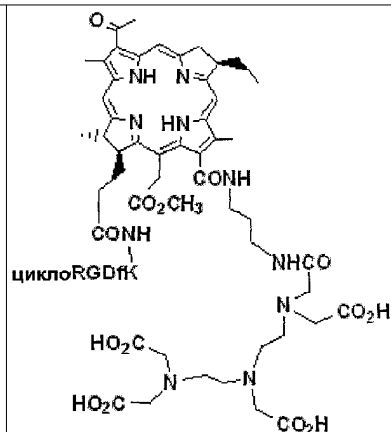
25

30

35

43

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-(3-DTPA-амидо-N-пропил)амид-17³-(циклоRGDfK)амид



40

45

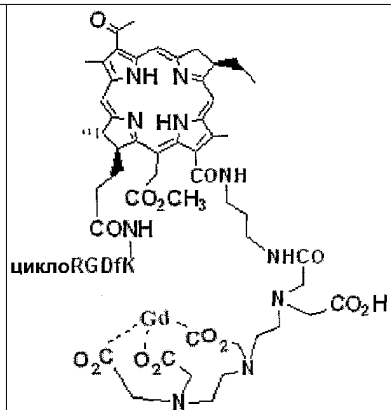
50

5

44

3¹-оксо-15-метоксикарбонилметил-родобактериохлорин
13¹-(3-Gd-DTPA-амидо-N-пропил)амид-17³-
(циклоRGDfK)амид

10



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

15

Arap W., Haedicke W., Bernasconi M., Kain R., Rajotte D., Krajewski S., Ellerby H.M., Bredesen D.E., Pasqualini R. and Ruoslahti E. (2002) "Targeting the prostate for destruction through a vascular address", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99(3):1527-1531.

Arap W., Pasqualini R. and Ruoslahti E., (1998) "Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model", Science, 279:377-380.

20

Assa-Munt N., Jia X., Laakkonen P. and Ruoslahti E. (2001) "Solution structures and integrin binding activities of an RGD peptide with two isomers", Biochemistry, 40:2373-2378.

Bauminger S. and Wilchek M. (1980) "The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. Methods Enzymol", 70(A):151-159.

25

Bogdanowich-Knipp S.J., Jois D.S. and Siahaan T.J. (1999) "The effect of conformation on the solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides", J. Pept. Res., 53(5):523-9.

Bonnett R. (1999) "Photodynamic therapy in historical perspective", Rev. Contemp. Pharmacother., 10:1-17.

30

Borza CM, Pozzi A, Borza DB, Pedchenko V, Hellmark T, Hudson BG, Zent R. (2006) "Integrin alpha3beta1, a novel receptor for alpha3(IV) noncollagenous domain and a trans-dominant Inhibitor for integrin alphavbeta3", J Biol Chem. 281(30):20932-20939.

Brandis A., Mazor O., Gross S., Koudinova N., Hami R., Kalin-Kammhuber N., Rosenbach-Belkin V., Greenwald M., Bondon A., Simonneaux G., Scheer H., Salomon Y. and Scherz A.

35

(2003) "Novel palladium-bacteriochlorophyll derivatives for antivascular Photodynamic therapy: synthesis, phototoxicity, pharmacokinetics and efficacy", J. Med. Chem. submitted.

Brandis A., Mazor O., Neumark E., Rosenbach-Belkin V., Salomon Y. and Scherz A. (2005) "Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: synthesis, solubility, phototoxicity, and the effect of serum proteins", Photochem Photobiol., 81, 983-993.

40

Brooks P.C., Clark R.A. and Cheresh D.A. (1994a) "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis", Science, 264(5158):569-571.

45

Brooks P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G. and Cheresh D.A. (1994b) "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels", Cell, 79(7):1157-1164.

Brooks P.C., Stromblad S, Klemke R., Visscher D., Sarkar F.H. and Cheresh D.A. (1995) "Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin", J. Clin. Invest., 96(4):1815-1822.

50

Burrows F.J. and Thorpe P.E. (1994) "Vascular targeting-a new approach to the therapy of solid tumors", Pharmacol. Ther., 64(1):155-74.

Castel S., Pagan R., Mitjans F., Piulats J., Goodman S., Jonczyk A., Huber F., Vilaro S. and Reina M. (2001) "RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of α_v -integrin, enter

the cells by independent endocytic pathways", *Lab. Invest.*, 81(12):1615-1626.

Chaleix V., Sol V., Huang Y.M., Guilloton M., Granet R., Blais J.C., and Krausz P. (2003) "RGD-porphyrin conjugates: synthesis and potential application in photodynamic therapy", *Eur. J. Org. Chem.*, 1486-1493.

5 Chang Y.S., di Tomaso E., McDonald D.M., Jones R. and Jain R.K. (2000) "Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood", *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(26):14608-14613.

Dougherty D.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J. and
10 Qian P. (1998) "Photodynamic therapy", *JNCI*, 90(12):889-905.

D'Souza S.E., Ginsberg M.H. and Plow E.F. (1991) "Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif", *Trends Biochem. Sci.*, 16(7):246-250.

Elceiri B.P. and Cheresh D.A. (1999) "The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development", *J. Clin. Invest.*, 103(9):
15 1227-1230.

Ellerby H.M., Arap W., Ellerby L.M., Kain R., Andrusiak R., Del Rio G., Krajewski S., Rao R., Ruoslahti E., Bredesen D.E. and Pasqualini R. (1999) "Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides", *Nat. Med.*, 5(9):1032-1038.

20 Fiedor L., Rosenbach-Belkin V. and Scherz A. (1992) "The stereospecific interaction between chlorophylls and chlorophyllase. Possible implication for chlorophyll biosynthesis and degradation", *J. Biol. Chem.* 267:22043-22047.

Freidinger R.M., Hinkle J.S., Perlow D.S., and Arison B.H. (1983) "Synthesis of 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Protected N-Alkyl Amino Acids by Reduction of Oxazolidinones",
25 *J. Org. Chem.* 48:77-81.

Goligorsky M.S., Kessler H. and Romanov V.I. (1998) "Molecular mimicry of integrin ligation: therapeutic potential of arginine-glycine aspartic acid (RGD) peptides", *Nephrol. Dial. Transplant.*, 13:254-263.

30 Gross S., Brandis A., Chen L., Rosenbach-Belkin V., Roehrs S., Scherz A., and Salomon Y. (1997) "Protein-A-mediated targeting of bacteriochlorophyll-IgG to *Staphylococcus aureus*: a model for enhanced site-specific photocytotoxicity", *Photochem Photobiol.*, 66(6):872-8.

Gross S., Gilead A. Scherz A. Neeman M. and Salomon Y. (2003b) "Monitoring Photodynamic Therapy of Solid Tumors Online by BOLD Contrast MRI", *Nature Medicine* in
35 Press.

Gross S., Gilead A., Brandis A., Schreiber S., Machluf Y., Neeman M., Scherz A. and Salomon Y. (2003a) "Selective vascular and tumor responses of photodynamic therapy (PDT) with Pd bacterioporphorbide (TOOKAD®): online and offline analyses", *Proceedings of the 94th annual meeting of the American association for cancer research (AACR)*, Toronto, April 5-
40 9, 44: 27.

Hahn S.M. and Glatstein E. (1999) "The emergence of photodynamic therapy as a major modality in cancer treatment", *Rev. Contemp. Pharmacother.*, 10:69-74.

Hardan I., Weiss L., Hershkovitz R., Greenspoon N., Alon R., Cahalon L., Reich S., Slavin S.
45 and Lider O. (1993) "Inhibition of metastatic cells colonization in murine lungs and tumor-induced morbidity by non-peptidic Arg-Gly-Asp mimetics", *Int. J. Cancer*, 55:1023-1028.

Hart S.L., Knight A.M., Harbottle R.P., Mistry A., Hunger H.D., Cutler D.F., Williamson R. and Coutelle C. (1994) "Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide", *J. Biol. Chem.*, 269(17): 12468-12474.
50

Haubner R. et al. (1999) "Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting", *J Nucl Med.* 40:1061-1071

Haubner R., Wester H.J., Weber W.A., Mang C, Ziegler S.L., Goodman S.L., Senekowitsch-

Schmidtke R., Kessler H. and Schwaiger M. (2001) "Noninvasive imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography", *Cancer res.*, 61:1781-1785.

Horrocks W.D. Jr. and Hove E.G., 1978, "Water-Soluble Lanthanide Porphyrins: Shift Reagents for Aqueous Solution", *Journal of the American Chemical Society*, 100: 4386-4392.

Huang X., Molema G., King S., Watkins L., Edgington T.S. and Thorpe P.E. (1997) "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature", *Science*, 275:547-550.

Janssen M.L., Oyen W.J., Dijkgraaf I., Massuger L.F., Frielink C, Edwards D.S., Rajopadhye M., Boonstra H., Corstens F.H., Boerman O.C. (2002a) Tumor Targeting with Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ Integrin Binding Peptides in a Nude Mouse Model. *Cancer research* 62:6146-6151.

Janssen M, Oyen WJ, Massuger LF, Frielink C, Dijkgraaf I, Edwards DS, Radjopadhye M, Corstens FH, Boerman OC. (2002b) Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-peptide for tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm.* 17(6):641-646.

Joshi P., Chung C.Y., Aukhil I. and Erickson H.P. (1993) "Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. J", *Cell Sci.*, 106 (Pt 1):389-400.

Kawaguchi M., Hosotani R., Ohishi S., Fujii N., Tulachan S.S., Koizumi M., Toyoda E., Masui T., Nakajima S., Tsuji S., Ida J., Fujimoto K., Wada M., Doi R., and Imamura M. (2001) "A novel synthetic Arg-Gly-Asp-containing peptide cyclo(-RGDf=V-) is the potent inhibitor of angiogenesis", *Biochem. Biophys. res. com.*, 288:711-717.

Kessel D. and Dougherty T.J. (1999) "Agents used in Photodynamic therapy", *Rev. Contemp. Pharmacother*, 10:19-24.

Koivunen E., Wang B. and Ruoslahti E. (1995) "Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins", *Biotechnology (N Y)*, 13(3):265-70.

Koivunen E., Wang B., Dickinson C.D. and Ruoslahti E. (1994) "Peptides in cell adhesion research", *Methods Enzymol*, 245:346-369.

Koudinova N.V., Pinthus J.H., Brandis A., Brenner O., Bendel P., Ramon J., Eshhar Z., Scherz A. and Salomon Y. (2003) "Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts", *Int J Cancer.*, 104(6):782-789.

Mazon M.D. (1999) "Cellular aspects of photodynamic therapy for cancer", *Rev. Contemp. Pharmacother.*, 10:25-37.

Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Kuo PC. (2006) "Integrin-linked kinase regulates osteopontin-dependent MMP-2 and uPA expression to convey metastatic function in murine mammary epithelial cancer cells", *Carcinogenesis*. 27(6):1134-1145.

Mironov A.F. et al. (2003) "New bacteriochlorin derivatives with a fused N-aminoimide ring", *J. Porphyrins Phthalocyanins*, 7:725-730.

Mironov A.F., Kozyrev A.N. and Brandis A.S. (1992) "Sensitizers of second generation for photodynamic therapy of cancer based on chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives", *Proc. SPIE*, 1922:204-208.

Omata T. and Murata N. (1983) "Preparation of Chlorophyll a, Chlorophyll b and Bacteriochlorophyll a by column chromatography with DEAE-Sepharose Cl-6B and Sepharose Cl-6B", *Plant Cell Physiol.*, 24:1093-1100.

Pasqualini R. and Ruoslahti E. (1996) "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries", *Nature*, 380(6572):364-366.

Pasqualini R., Koivunen E. and Ruoslahti E. (1997) "Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands", *Nat. Biotechnol.*, 15(6):542-546.

Pasqualini R., Koivunen E., Kain R., Lahdenranta J., Sakamoto M., Stryhn A., Ashmun R.H., Shapiro L.H., Arap W. and Rouslahti E. (2000) "Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis", *Cancer res.*, 60:722-727.

Pierschbacher M. and Ruoslahti E. (1984) "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule", *Nature*, 309:30-33.

Pierschbacher M.D. and Rouslahti E. (1987) "Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion", *J. Biol. Chem.*, 262(36): 17294~17298.

Preise D., Mazor O., Koudinova N., Liscovitch M., Scherz A. and Salomon Y. (2003) "Bypass Of Tumor Drug Resistance By Antivascular Therapy", *Neoplasia*, in Press.

Rajotte D., Arap W., Hagedorn M., Koivunen E., Pasqualini R. and Ruoslahti E. (1998) "Molecular Heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display", *J. Clin. Invest.*, 102:430-437.

Romanov V.I. and Goligorsky M.S. (1999) "RGD-recognizing integrins mediate interactions of human prostate carcinoma cells with endothelial cells in vitro", *The prostate*, 39:108-118.

Rosenbach-Belkin V., Chen L., Fiedor L., Tregub I., Paviotsky F., Brumfeld V., Salomon Y. and Scherz A. (1996) "Serine conjugates of chlorophyll and bacteriochlorophyll: photocytotoxicity in vitro and tissue distribution in mice bearing melanoma tumors", *Photochem Photobiol.*, 64(1):174-181.

Ross D.T. et al., (2000) "Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines", *Nat Genet.* 24(3):227-235.

Ruoslahti E. (1996) "RGD and other recognition sequences for integrins", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:697-715.

Ruoslahti E. (2000) "Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display", *Seminars in cancer biology*, 10:435-442.

Ruoslahti E. (2002) "Drug targeting to specific vascular sites", *DDT*, 7(22):1138-1143.

Ruoslahti E. and Pierschbacher M.D. (1987) "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins", *Science*, 238(4826):491-497.

Ruoslahti E. and Rajotte D. (2000) "An address system in the vasculature of normal tissues and tumors", *Annu. Rev. Immunol.*, 18:813-827.

Saiki I., Murata J., Iida J., Sakurai T., Nishi N., Matsuno K. and Azuma I. (1989) "Antimetastatic effects of synthetic polypeptides containing repeated structures of the cell adhesive Arg-Gly-Asp (RGD) and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) sequence", *Br. J. Cancer*, 60: 722-728.

Scherz A. and Parson W.W. (1984) "Oligomers of bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin with spectroscopic properties resembling those found in photosynthetic bacteria", *Biochim. Biophys. Acta*, 766:653-665.

Schiffenbauer YS, Meir G, Maoz M, Even-Ram SC, Bar-Shavit R, Neeman M. (2002) "Gonadotropin stimulation of MLS human epithelial ovarian carcinoma cells augments cell adhesion mediated by CD44 and by alpha(v)-integrin", *Gynecol. Oncol.* 84(2):296-302.

Schreiber S., Gross S., Brandis A., Harmelin A., Rosenbach-Belkin V., Scherz A. and Salomon Y. (2002) "Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery", *Int. J. Cancer*, 99: 279-285.

Struck A., Cmiel E., Katheder I., Schafer W. and Scheer H. (1992) "Bacteriochlorophylls modified at position C-3: long-range intramolecular interaction with position C-13[2]", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1101 (3):321-328.

Su Z.F., Liu G., Gupta S., Zhu Z., Rusckowski M. and Hnatowich D.J. (2002) "In vitro and

in vivo evaluation of a Technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of alpha(V)beta(3) integrin for tumor imaging", *Bioconjug. Chem.*, 13(3):561-570.

Temming K. et al. (2005) RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug resistance updates*. 8(6):381-402.

Vaillancourt V.A. et al. (2001) "Synthesis and Biological Activity of Aminoguanidine and Diaminoguanidine Analogues of the Antidiabetic/Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid", *J. Med. Chem.*, 44:1231-1248.

van Hagen P.M., Breeman W.A., Bernard H.F., Schaar M., Mooij C.M., Srinivasan A., Schmidt M.A., Krenning E.P. and de Jong M. (2000) "Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumour imaging and radionuclide therapy", *Int. J. Cancer*, 90:186-198.

Wanunu M., Vaskevich A., Cohen S.R., Cohen H., Arad-Yellin R., Shanzer A., Rubinstein I. (2005) "Branched Coordination Multilayers on Gold", *JACS*, 127: 17877-17887.

Wasielewski M.R. and Svec W.A. (1980) "Synthesis of Covalently Linked Dimeric Derivatives of Chlorophyll a, Pyrochlorophyll a, Chlorophyll b, and Bacteriochlorophyll a", *J. Org. Chem.*, 45(10):1969-1974.

Yao B. et al. (2005) "Enhanced antitumor effect of the combination of tumstatin gene therapy and gemcitabine in murine models", *Hum Gene Ther.* 16(9):1075-1086.

Zhang S.Z., Lipsky M.M., Trump B.F. and Hsu I.C. (1990) "Neutral Red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes", *Cell. Biol. Toxicol.* 6:219-234.

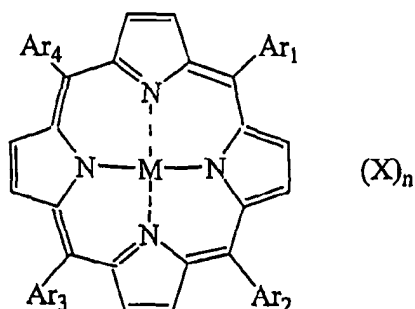
Zilberstein J., Bromberg A., Frantz A., Rosenbach-Belkin V., Kritzman A., Pfefermann R., Salomon Y. and Scherz A. (1997) "Light-dependent oxygen consumption in bacteriochlorophyll-serine-treated melanoma tumors: on-line determination using a tissue-inserted oxygen microsensor", *Photochem Photobiol.*, 65(6):1012-1019.

Zilberstein J., Schreiber S., Bloemers M.C. W.M., Bendel P., Neeman M., Schechtman E., Kohen F., Scherz A. and Salomon Y. (2001) "Antivascular treatment of solid melanoma tumors with bacteriochlorophyll-serine-based photodynamic therapy", *Photochem. Photobiol.*, 73:257-266.

Zitzmann S., Ehemann V. and Schwab M. (2002) "Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD)-peptide bind to both tumor and tumor-endothelial cells in vivo", *Cancer res.*, 62:5139-5143.

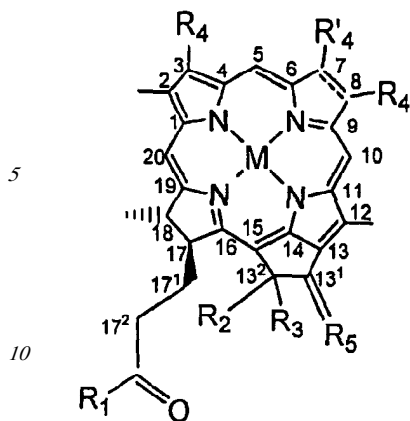
Формула изобретения

1. Конъюгат RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика и фотосенсибилизатора, выбранного из тетраарилпорфирина формулы:

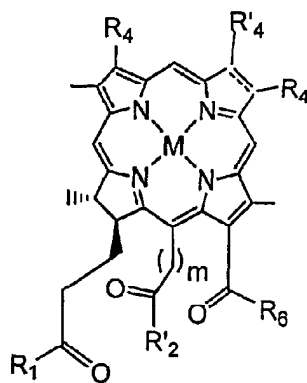


или

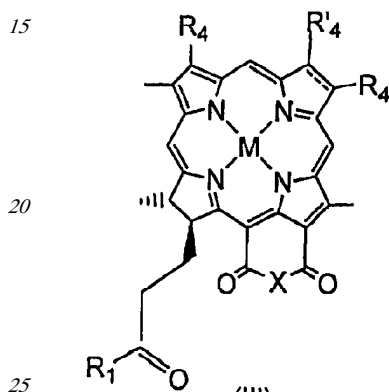
хлорофилла или бактериохлорофилла формул I, II или III



(I)



(II)



(III)

где М представляет 2Н или атом, выбранный из группы, состоящей из Mg, Pd, Pt, Co, Ni, Sn, Cu, Zn, Mn, In, Eu, Fe, Au, Al, Gd, Er, Yb, Lu, Ga, Y, Rh, Ru, Si, Ge, Cr, Mo, P, Re, Tl или Tc и их изотопов, предпочтительно М является 2Н или металлом, выбранным из Pd, Cu, Mn или Gd;

в которой Ar₁, Ar₂, Ar₃ и Ar₄ одинаковые или различные, каждый представляет арил, выбранный из карбоциклического арила, где каждый карбоциклический арил представляет моноциклическую или бициклическую ароматическую группу, выбранную из фенила, бифенила и нафтила, замещенную одним или более заместителями, выбранными из карбокси, и, по меньшей мере, один из Ar₁, Ar₂, Ar₃ и Ar₄ замещен RGD-содержащим пептидом или RGD-пептидомиметиком, связанным, по меньшей мере, с одной указанной арильной группой через -CO-NH-группу;

n равно 0, когда заместители являются нейтральными, или n равно целому числу в пределах от 1 до 4;

X' представляет фармацевтически приемлемый анион, когда арильные группы заряжены положительно, или фармацевтически приемлемый катион, когда арильные группы заряжены отрицательно;

X представляет собой N-R₇;

R₁, R₂['] и R₆ каждый независимо представляет Y-R₈, -NR₉R₉['] или -N⁺R₉R₉[']R₉^{'''}A⁻;

или R₁ и R₆ вместе образуют кольцо, содержащее остаток RGD-пептида или RGD-пептидомиметика;

Y представляет O;

R₂ является H, OH или COOR₉;

R₃ представляет H, OH;

R₄ представляет -CH=CR₉, R₉['], -CH₂-R₉, -CH₂-CH₂-R₉ или -COCH₃;

R_4' представляет метил;

R_5 представляет =O;

R_7 представляет собой -NRR', где R и R' каждый является H или C_1-C_{25}

5 гидрокарбилом, замещенным SO_3^- ;

R_8 , R_9 , R_9' и R_9'' каждый независимо представляет:

a) H;

b) C_1-C_{25} гидрокарбил;

10 c) C_1-C_{25} гидрокарбил, замещенный одной или более функциональными группами, выбранными из OH, COOH, $-SO_3R''$, R'' является катионом, $-(R)N-C(=NR)-NR'R''$, в которых каждый из R и R' независимо представляет H или алкил, или NRR', где R и R' каждый независимо представляет собой H или алкил или R и R' вместе с атомом N образуют 5-7-членное насыщенное кольцо, необязательно дополнительно

15 содержащее гетероатом, выбранный из O или N, и необязательно дополнительно замещенное по дополнительному атому N;

d) C_1-C_{25} гидрокарбил, содержащий один или более гетероатомов и/или одну или более гетероциклических групп;

20 e) C_1-C_{25} гидрокарбил, содержащий один или более гетероатомов и/или одну или более гетероциклических групп и замещенный одной или более функциональными группами, имеющими значения, определенные в п. c);

f) остаток пептида или полидентат-лиганд и его хелатный комплекс с металлами;

25 A^- является физиологически приемлемым анионом;

m равно 1;

пунктирная линия в положениях 7-8 представляет необязательную двойную связь;

и

его фармацевтически приемлемые соли и оптические изомеры;

30 в котором указанное производное хлорофилла или бактериохлорофилла формулы I, II или III содержит, по меньшей мере, один остаток RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика.

2. Конъюгат по п.1, в котором RGD-содержащий пептид представляет

35 полностью-L, полностью-D или L, D линейный или циклический пептид, состоящий из 4-100, предпочтительно из 5-50, 5-30, 5-20, более предпочтительно из 4, 5, 6, 7, 9 или 25 аминокислотных остатков, выбранных из модифицированных природных или не относящихся к природным аминокислот, где указанные природные аминокислоты

40 выбраны из Ala, Arg, Asp, Cys, Gin, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr и Val; причем модификация включает D-модификацию; N-алкилирование пептидной связи; ацилирование или алкилирование концевой аминогруппы или свободной аминогруппы Lys; эстерификацию или амидирование концевой карбоксильной группы или свободной аминогруппы Asp или Glu; и эстерификацию или

45 этерификацию гидроксильной группы Ser или Tyr, предпочтительно N-метилование или D-модификация; и где не относящиеся к природным аминокислоты выбраны из 4-аминомасляной кислоты (Abu), 2-аминоадипиновой кислоты, диаминопропионовой кислоты (Dap), оксизина, гомосерина, гомовалина, гомолейцина, норлейцина (Nle), норвалина (Nva), орнитина (Orn) и

50 нафтилаланина (Nal).

3. Конъюгат по п.2, в котором RGD-содержащий пептид является циклическим пептидом, выбранным из:

i) пентапептида циклоRGDfK (SEQ ID NO:1), в котором f обозначает D-Phe;

- ii) нонапептида, обозначенного в данном документе RGD-4C (SEQ ID NO:2);
- iii) тетрапептида циклоRGDK (SEQ ID NO:4);
- iv) пентапептида циклоRGDf-n(Me)K (SEQ ID NO:7), в котором f обозначает D-Phe,
- v) пентапептид циклоRGDyK (SEQ ID NO:8), в котором y обозначает D-Tyr; или

линейным пептидом, выбранным из:

- i) гексапептида GRGDSP (SEQ ID NO:3);
- ii) гептапептида GRGDSPK (SEQ ID NO:5) или
- iii) пептида последовательности (GRGDSP)₄K (SEQ ID NO:7).

4. Конъюгат по п.1, содержащий RGD-пептидомиметик, который представляет соединение, не относящееся к пептидам, содержащее гуанидин и концевые карбоксильные группы, пространственно разделенные цепью из 11 атомов, по меньшей мере, 5 из указанных атомов являются атомами углерода, и указанная цепь содержит один или более атомов O, S или N и может быть необязательно замещена оксо, тиоксо, атомом галогена, amino, C1-Сбалкилом, гидроксилом или карбокси, или один или более атомов указанной цепи могут образовать 3-6-членное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо, предпочтительно формулы:



5. Конъюгат по любому одному из пп.1-3, выбранный из: i) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфина (соединения 20); ii) медь (II) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфина (соединения 21); и iii) гадолиний (III) мезо-5-(4-циклоRGDfK-бензамидо)-10,15,20-трис(4-карбоксифенил)порфина (соединения 22).

6. Конъюгат по п.1, в котором пунктирные линии в положениях 7-8 представляют двойную связь, и фотосенсибилизатор является хлорофиллом формул I, II или III, или пунктирная линия в положениях 7-8 отсутствует, и фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формул I, II или III; в которых (i) каждый R₄ независимо представляет ацетил, винил или этил; (ii) M представляет собой 2H или металл, выбранный из Pd, Mn или Cu, и (iii) любой C₁-C₂₅гидрокарбил представляет C₁-C₂₅алкил, предпочтительно C₁-C₆алкил, более предпочтительно C₂-C₃алкил.

7. Конъюгат по п.6, в котором фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формул I или II, в которых R₄ в положении 3 является ацетилом, R₄ в положении 8 является этилом, R'₄ представляет метил, и положения 7-8 гидрированы, или хлорофилл формул I или II, в которых R₄ в положении 3 является винилом, R₄ в положении 8 является этилом, R'₄ представляет метил, и в положениях 7-8 находится двойная связь.

8. Конъюгат по п.7, в котором указанный хлорофилл или бактериохлорофилл имеет формулу II, и R₆ является -NR₉R'₉, где R₉ представляет H, и R'₉ является C₁-C₁₀алкилом, замещенным SO₃H или его основной солью, предпочтительно R₉ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K или -NH-(CH₂)₃-SO₃K.

9. Конъюгат по п.6, где R₈, R₉, R'₉ и R''₉ каждый независимо замещен одной или более основными группами, которые превращаются в положительно заряженные группы в физиологических условиях, в котором указанная основная группа представляет -(R)N-C(=NR)-NR'R'', где каждый из R и R' независимо представляет H или алкил, или NRR', где R и R' каждый независимо представляет собой H или алкил или R и R' вместе с атомом N образуют 5-7-членное насыщенное кольцо, необязательно содержащее гетероатом, выбранный из O или N, и необязательно

дополнительно замещенное по дополнительному атому N; где указанное кольцо выбрано из морфолина или пиперазина, необязательно замещенных по дополнительному атому N C₁-C₆алкилом, необязательно замещенным амино.

10. Конъюгат по п.6, в котором фотосенсибилизатор выбран из:

i) хлорофилла или бактериохлорофилла формулы II, и R₆ является основной группой $-NR_gR'_g$, в которой R_g представляет H, и R'_g является C₁-C₆алкилом, замещенным основной группой $-NH-(CH_2)_{2-6}-NRR'$, в которой каждый из R и R' независимо представляет H, C₁-C₆алкил, необязательно замещенный NH₂, или R и R' вместе с атомом N образуют 5-6-членное насыщенное кольцо, необязательно содержащее атом O или N и необязательно дополнительно замещенное по дополнительному атому N $-(CH_2)_{2-6}-NH_2$, предпочтительно бактериохлорофилла формулы II, где R₆ представляет $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH_2$, $-NH-(CH_2)_{2-1}$ -морфолино или $-NH-(CH_2)_3$ -пиперазино- $(CH_2)_3-NH_2$;

ii) хлорофилла или бактериохлорофилла формулы II, и R₁ и R₆ вместе образуют циклическое кольцо, содержащее RGD-пептид или RGD-пептидомиметик;

iii) хлорофилла или бактериохлорофилла формулы III, в которой X представляет $-NR_7$, R₇ является $-NRR'$, R представляет H, и R' является C₂-C₆алкилом, замещенным SO_3^- или его основной солью, в которой R₇ предпочтительно является $-NH-(CH_2)_3-SO_3K$;

iv) хлорофилла или бактериохлорофилла формулы II, и R₆ является $-NR_gR'_g$, R_g является H, и R'_g представляет $HOCH_2-CH(OH)-CH_2-$;

v) хлорофилла или бактериохлорофилла формулы II, и R₆ представляет $-NR_gR'_g$, R_g является H, и R'_g представляет C₁-C₆алкил, замещенный полидентатом-лигандом или его хелатными комплексами с металлами, предпочтительно бактериохлорофилла формулы II, где указанный полидентат-лиганд представляет ЭДТА, ДТРА или ДОТА, R₆ является $-NR_gR'_g$, R_g является H, и R'_g представляет C₁-C₆алкин, замещенный полидентатом-лигандом, предпочтительно $-NH-(CH_2)_3-NH$ -ДТРА, или его хелатными комплексами с металлами, такими как Gd; или

vi) хлорофилла или бактериохлорофилла формулы I, II или III, где R₇, R₈, R₉ или R'_g каждый представляет собой C₁-C₆алкил, замещенный одной или несколькими -ОН группами.

11. Конъюгат по п.6, в котором фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формул I, II или III, и M является Pd, или фотосенсибилизатор представляет хлорофилл формул I, II или III, и M является 2H, Cu или Mn.

12. Конъюгат по п.1, в котором фотосенсибилизатор выбран из:

i) бактериохлорофилла формулы II, в которой M является Pd, Mn, Cu или 2H, предпочтительно Pd или 2H; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R'₂ представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R'₄ представляет метил; и R₆ представляет $-NH-(CH_2)_2-SO_3^-Me^+$ где Me⁺ является Na⁺, или K⁺, или $-NH-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$;

ii) бактериохлорофилла формулы III, в которой M является Pd; R₁

представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R₄' представляет метил; X является N-R₇, и R₇ представляет $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^-\text{Me}^+$, где Me⁺ является Na⁺ или K⁺;

iii) бактериохлорофилла формулы I, в которой M является Mn; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R₂ представляет OH; R₃ представляет COOCH₃; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R₄' представляет метил; R₅ является O;

iv) хлорофилла формулы II, в которой M выбран из Mn, Cu или 2H; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R₄ в положении 3 является винилом и в положении 8 является этилом; R₄' представляет метил; и R₆ представляет $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3^-\text{Me}^+$, где Me⁺ является Na⁺ или K⁺; и

v) бактериохлорофилла формулы II, в которой M является 2H; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика, связанного непосредственно с NH- или через спейсер; R₂'

представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R₄' представляет метил; и R₆ представляет -NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₃-NH₂, -NH-(CH₂)₂-морфолино или -NH-(CH₂)₃-пиперазино-(CH₂)₃-NH₂.

13. Конъюгат по п.7, в котором R₁ и R₆ вместе образуют циклическое кольцо, содержащее -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-NH- или -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-пиперазино-(CH₂)₂-NH-.

14. Конъюгат по любому одному из пп.3 или 13, в котором

i) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой M является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-пептидомиметика; R₂' представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R₄' представляет метил; и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 40) или -NH-(CH₂)₂-SO₃K (конъюгат 41);

ii) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой m равно 0; R₂' представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R₄' представляет метил; и R₁ и R₆ вместе образуют циклическое кольцо, содержащее -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-NH-, и M представляет Pd (конъюгат 37) или M представляет 2H (конъюгат 38) или R₁ и R₆ вместе образуют циклическое кольцо, содержащее -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-пиперазино-(CH₂)₂-NH- и M представляет Pd (конъюгат 39);

iii) фотосенсибилизатор представляет хлорофилл формулы II, в которой R₁ представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R₄ в положении 3 является винилом и в положении 8 является этилом; R₄' представляет метил; и R₆ представляет -NH-(CH₂)₂-SO₃K, и M является 2H (конъюгат 16), M является Mn (конъюгат 17), или M является Cu (конъюгат 18);

iv) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы I, в которой

R_1 представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R_2 представляет OH; R_3 является COOCH_3 ; R_4 в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R_4' представляет метил; R_5 представляет O, и M является Mn (конъюгат 12) или M является 2H (конъюгат 27);

v) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы I, в которой M является 2H; R_1 представляет $\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{P}$, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:4; R_2 представляет OH; R_3 является COOCH_3 ; R_4 в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R_4' представляет метил; и R_5 представляет O (конъюгат 32);

vi) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой M является Pd; m равно 0; R_1 представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:2; R_2' представляет метокси; R_4 в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R_4' представляет метил; и R_6 представляет $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{K}$ (конъюгат 11);

vii) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой m равно 0; R_1 представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R_2' представляет метокси; R_4 в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R_4' представляет метил; и R_6 представляет $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{K}$, и M является 2H (конъюгат 13), M является Mn (конъюгат 14), M является Cu (конъюгат 15) или M является Pd (конъюгат 24).

viii) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы III, в которой M является Pd; R_1 представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R_4 в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R_4' представляет метил; X представляет собой N- R_7 и R_7 представляет $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{K}$ (конъюгат 19);

ix) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой M является 2H; m равно 0; R_1 представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:3; R_2' представляет метокси; R_4 в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R_4' представляет метил; и R_6 представляет $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{K}$ (конъюгат 26);

x) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой M является Pd; m равно 0; R_2' представляет метокси; R_4 в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R_4' представляет метил; R_6 представляет $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{K}$, и R_1 представляет NH-P, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:5 (конъюгат 33), SEQ ID NO:6 (конъюгат 34) или SEQ ID NO:7 (конъюгат 35);

xi) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой M является Pd; m равно 0; R_1 представляет $\text{NH}-\text{CH}[(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{P}]_2$, где P является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:8; R_2' представляет метокси; R_4 в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R_4' представляет метил; и R_6 представляет $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{K}$ (конъюгат 36);

xii) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой

М является Pd; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R₂['] представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R₄[']

представляет метил; и R₆ представляет -NH-CH₂-CH(OH)-CH₂OH (конъюгат 23); или

xiii) фотосенсибилизатор представляет бактериохлорофилл формулы II, в которой М является 2Н; m равно 0; R₁ представляет NH-P, где Р является остатком RGD-содержащего пептида с последовательностью SEQ ID NO:1; R₂['] представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R₄[']

представляет метил; и R₆ представляет -NH-(CH₂)₃-NH-CO-DTPA (конъюгат 43) или его хелатный комплекс с Gd (конъюгат 44).

15. Бактериохлорофилл формулы II по п.1, в которой М является Pd; R₁ представляет -ОН; R₂['] представляет метокси; R₄ в положении 3 является ацетилом и в положении 8 является этилом; R₄['] представляет метил; и R₆ представляет -NH-CH₂-CH(OH)-CH₂-ОН (соединение 10).

16. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат RGD-содержащего пептида или RGD-пептидомиметика и фотосенсибилизатора, выбранного из тетраарилпорфирина, хлорофилла или бактериохлорофилла по одному из пп.1-15 для фотодинамической терапии (ФДТ), направленной на сосуды ФДТ (УТР), или для диагностических целей, и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, в которой конъюгат выбран из конъюгатов 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 40, 41, 43 и 44, предпочтительно конъюгата 24.

18. Фармацевтическая композиция по п.16 или 17 для фотодинамической терапии (ФДТ) или направленной на сосуды ФДТ (УТР).

19. Фармацевтическая композиция по п.18 для лечения:

i) опухолей, включая первичные опухоли или метастатические опухоли, такие как меланома, злокачественная опухоль ободочной кишки, рак молочной железы, злокачественная опухоль легких, рак предстательной железы, злокачественная опухоль мозга или злокачественная опухоль головы и шеи; ii) тканей, не относящихся к злокачественным; iii) возрастной дегенерации желтого пятна и iv) ожирения посредством ограничения снабжения сосудами жировой ткани.

20. Фармацевтическая композиция по п.16 или 17 для визуализации органов и тканей и диагностики опухолей, включая:

i) диагностику опухолей динамической флуоресцентной визуализацией, где М в фотосенсибилизаторе представляет 2Н или металл, выбранный из Cu, Pd, Gd, Pt, Zn, Al, Eu, Er, Yb или их изотопов; или

ii) диагностику опухолей молекулярной магнитно-резонансной томографией (МРТ), где М представляет парамагнитный металл, выбранный из Mn³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺ и Dy³⁺, или фотосенсибилизатор замещен хелатным комплексом полидентата-лиганда с металлом, и металл имеет значения, определенные выше.

21. Способ диагностики опухолей динамической флуоресцентной визуализацией, который включает:

а) введение субъекту с подозрением на наличие опухоли конъюгата по одному из пп.1-15, в котором М представляет 2Н или металл, выбранный из Cu, Pd, Gd, Pt, Zn, Al, Eu, Er, Yb или их изотопов;

б) облучение светом субъекта стандартными методами и определение флуоресценции подозреваемой области, где наличие более высокой флуоресценции указывает на наличие опухоли.

5 22. Молекулярная магнитно-резонансная томография (МРТ) для диагностики опухолей, включающая стадии:

а) введения субъекту с подозрением на наличие опухоли конъюгата по одному из пп.1-15, в котором М представляет парамагнитный металл, выбранный из Mn^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} или Dy^{3+} ; и

10 б) проведения субъекту магнитно-резонансной томографии воспроизведением, по меньшей мере, одного МР снимка интересующей области опухоли в теле пациента до указанного введения и одного или более МР снимков после и

с) обработки и анализа данных для диагностики наличия или отсутствия опухоли.

15 23. Способ фотодинамической терапии опухолей, который включает:

а) введение индивидууму, нуждающемуся в этом, конъюгата по одному из пп.1-15;

и

б) облучение светом области опухоли.

20

25

30

35

40

45

50

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Yeda Research and Development Co.Ltd
 Scherz, AVIGDOR
 Salomon, YORAM
 Rubinstein, Efrat
 Brandis, Alexander
 Eren, Doron
 Neimann, Karin
- <120> КОНЬЮГАТЫ RGD-ПЕПТИДОВ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ПОРФИРИНА ИЛИ
 (БАКТЕРИО)ХЛОРОФИЛЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ
- <130> STEBA-007 RU
- <140> PCT/IL2007/001055
 <141> 2007-08-23
- <150> 60/839,409
 <151> 2006-08-23
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная
- <220>
 <223> Связывающий мотив интегрина
- <220>
 <221> Цикло
 <222> (1)..(5)
- <220>
 <221> D-аминокислота
 <222> (4)..(4)
- <400> 1
- Arg Gly Asp Phe Lys
 1 5
- <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная
- <220>
 <223> Связывающий мотив интегрина
- <220>
 <221> Циклический
 <222> (1)..(9)
 <223> Спонтанное окислительное образование дисульфидных связей
- <400> 2

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Связывающий мотив интегрин

<220>
<221> Линейный
<222> (1)..(6)

<400> 3

Gly Arg Gly Asp Ser Pro
1 5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Связывающий мотив интегрин

<220>
<221> Цикло
<222> (1)..(4)

<400> 4

Arg Gly Asp Lys
1

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Связывающий мотив интегрин

<400> 5

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
1 5

<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Связывающий мотив интегрин

<400> 6

Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp
1				5					10					15	

Ser	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Lys
				20				25

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Связывающий мотив интегрина

<220>

<221> Циклический

<222> (1)..(5)

<220>

<221> Метиламид

<222> (4)..(4)

<400> 7

Arg	Gly	Asp	Phe	Lys
1				5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Связывающий мотив интегрина

<220>

<221> Циклический

<222> (1)..(5)

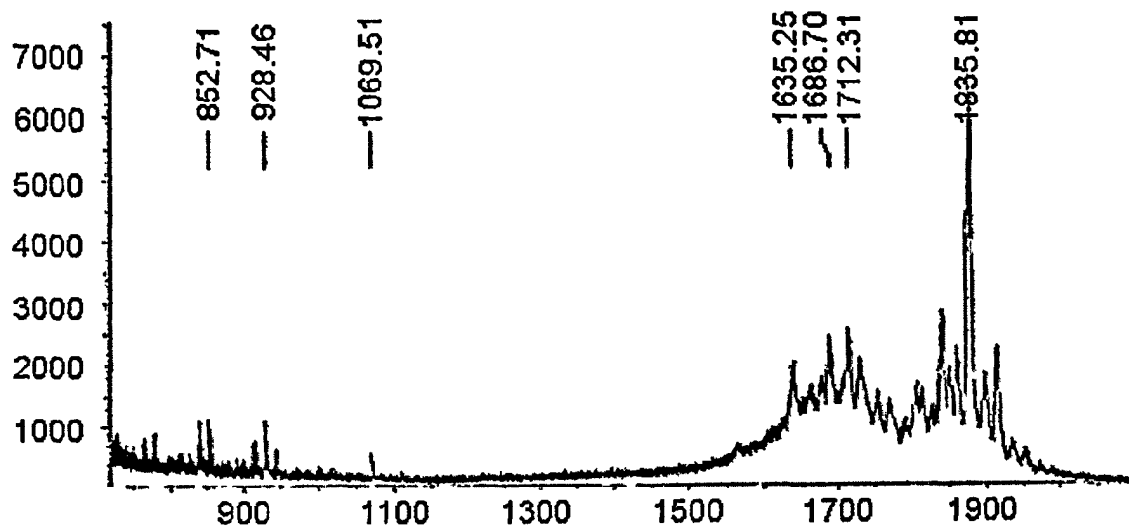
<220>

<221> D-аминокислота

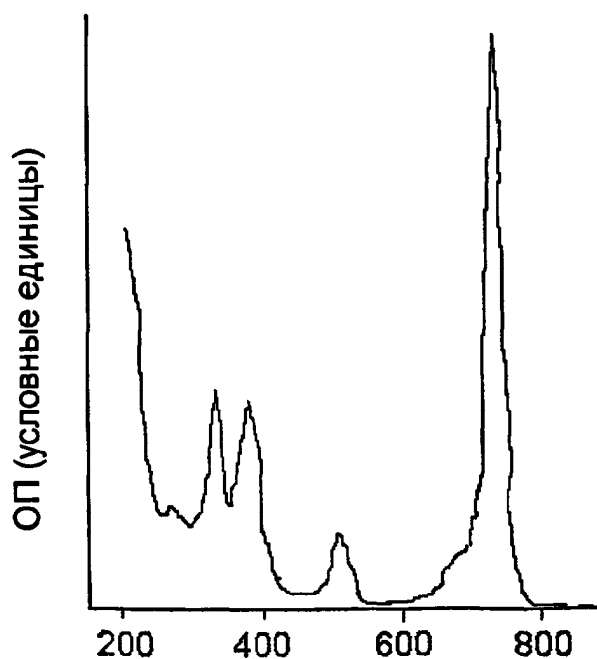
<222> (4)..(4)

<400> 8

Arg	Gly	Asp	Tyr	Lys
1				5

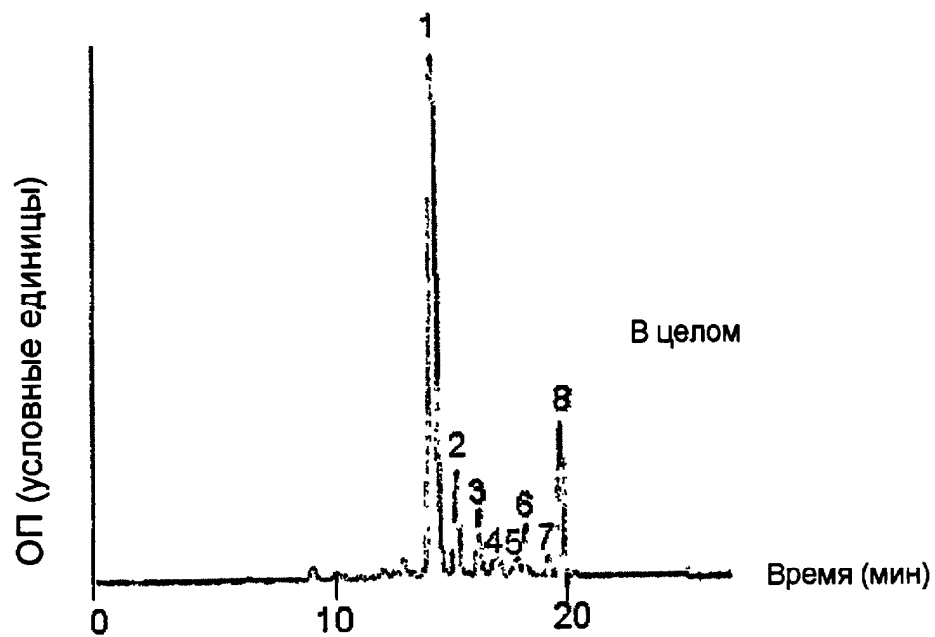


ФИГ. 1А

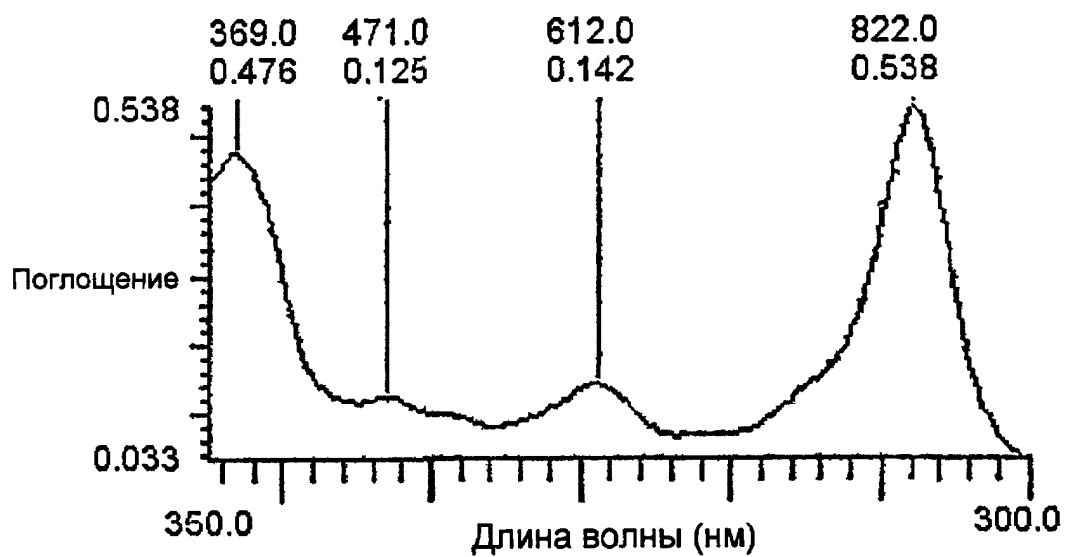


Длина волны (нм)

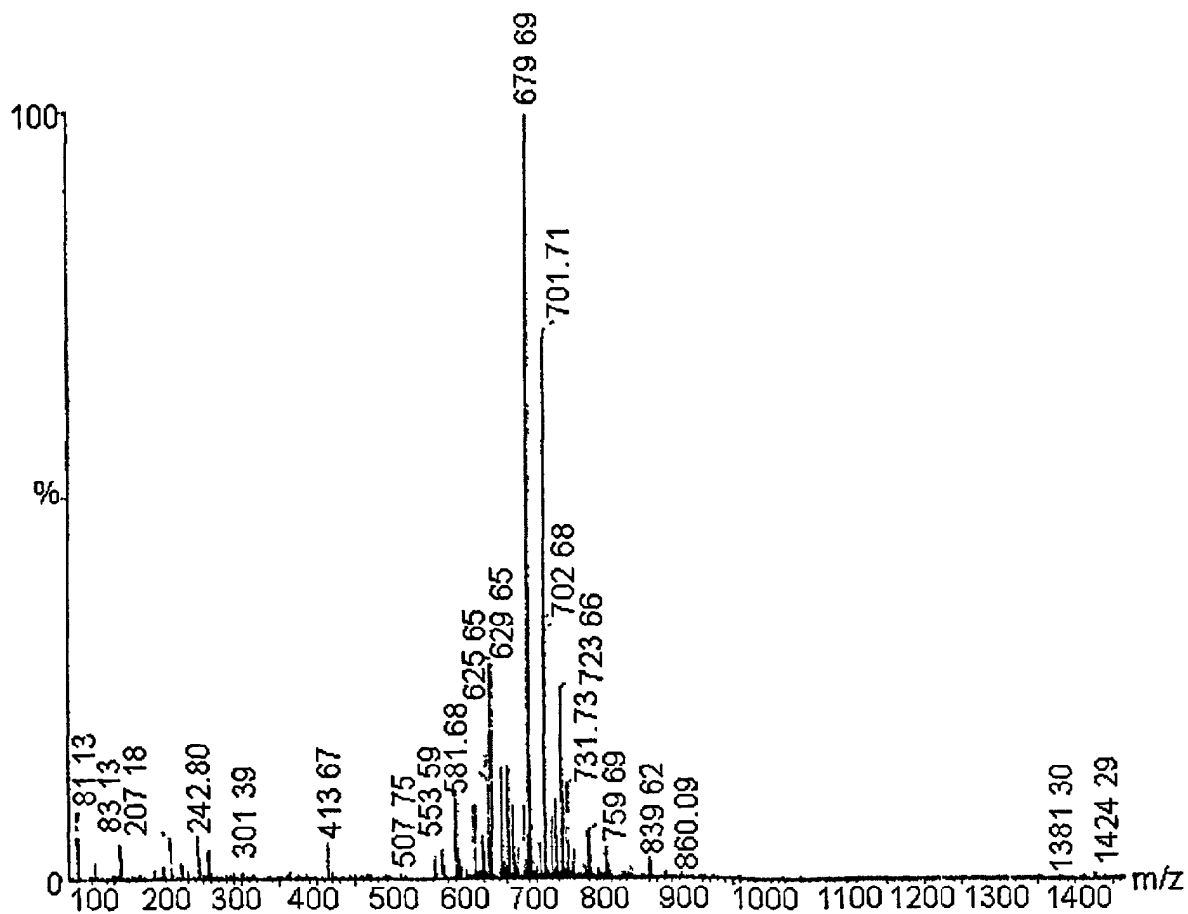
ФИГ. 1В



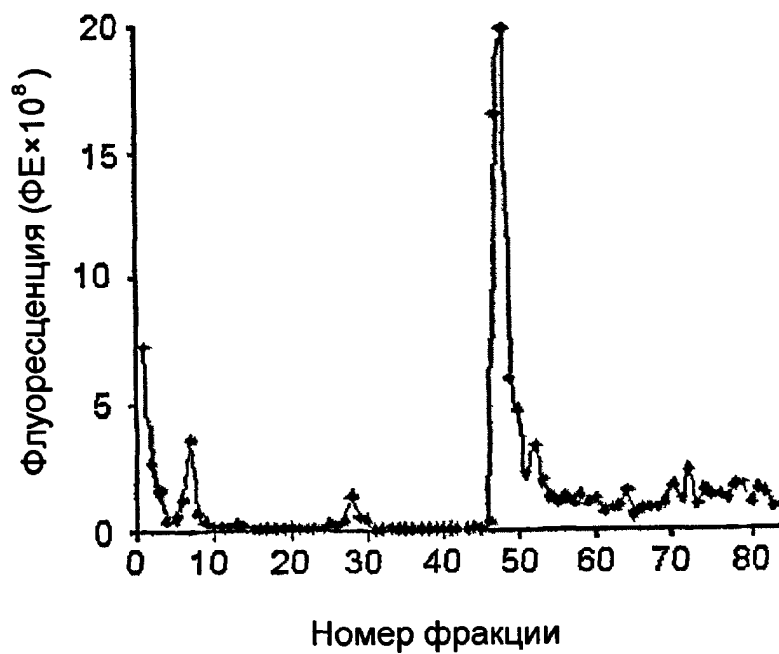
ФИГ. 1С



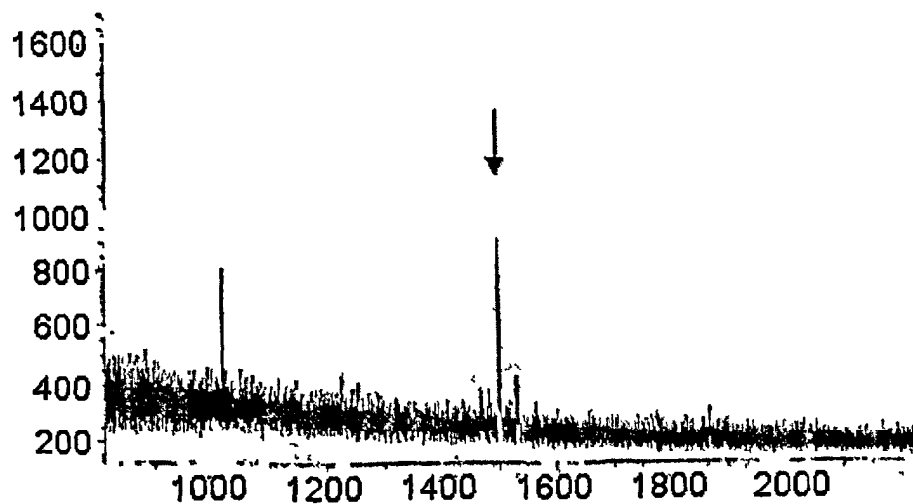
ФИГ. 2А



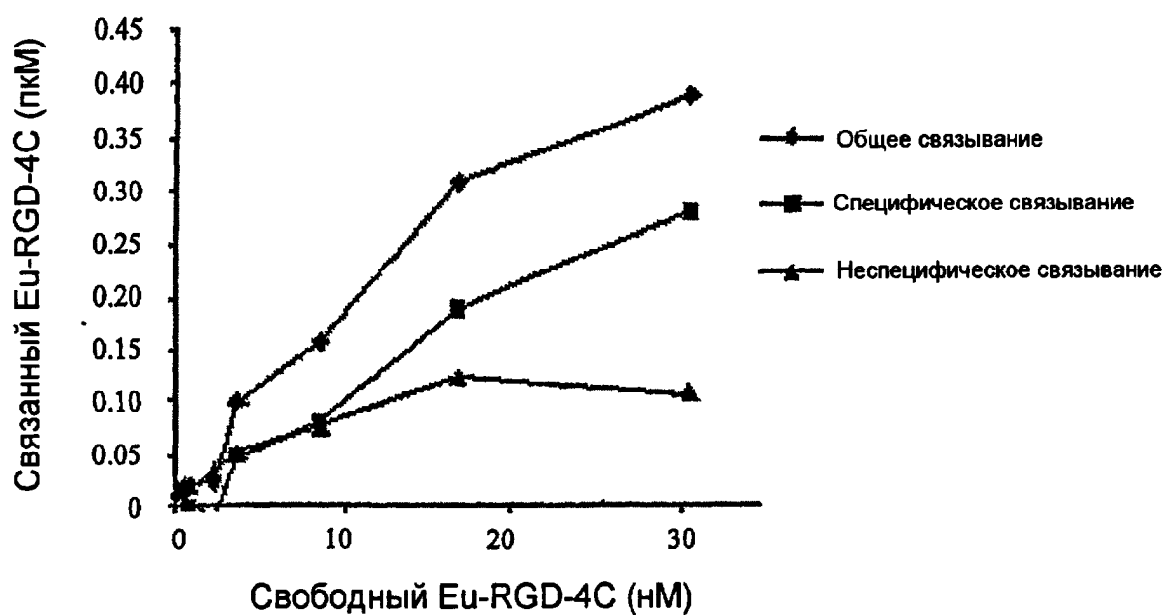
ФИГ. 2В



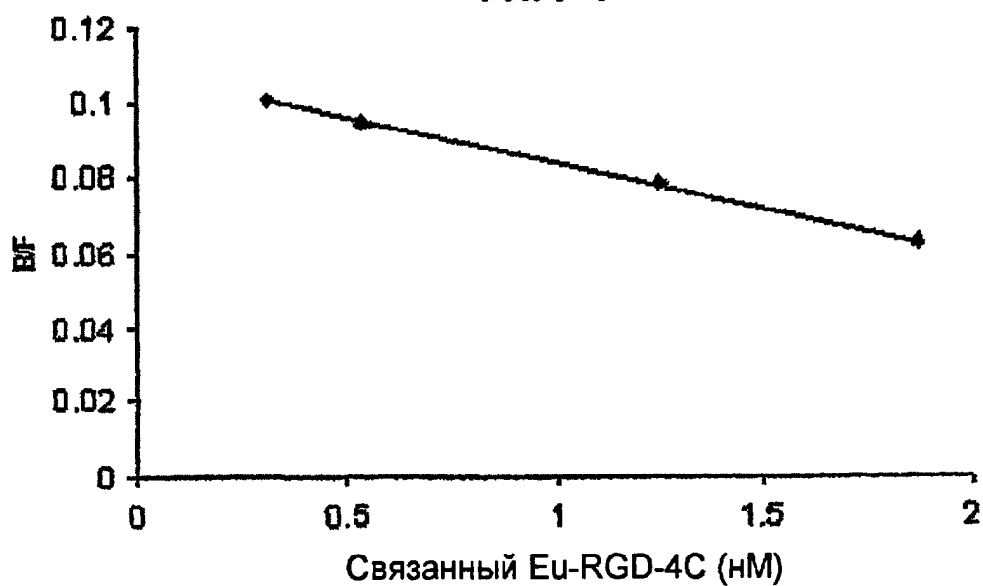
ФИГ. 3А



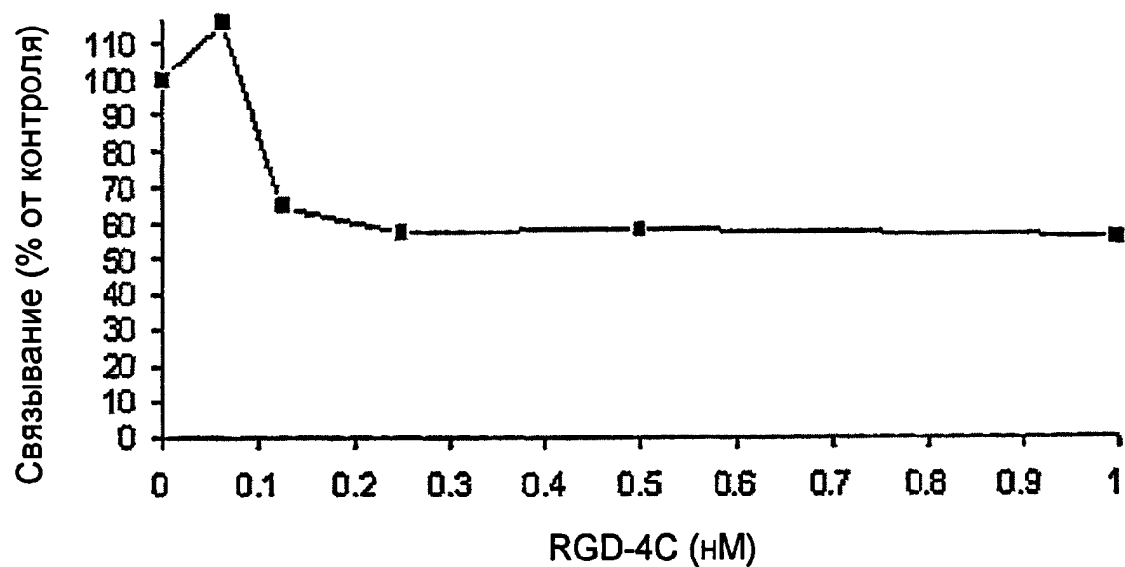
ФИГ. 3В



ФИГ. 4



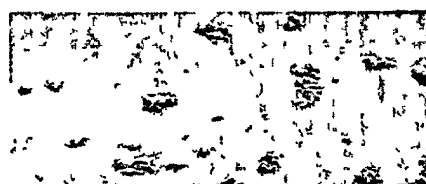
ФИГ. 5



ФИГ. 6



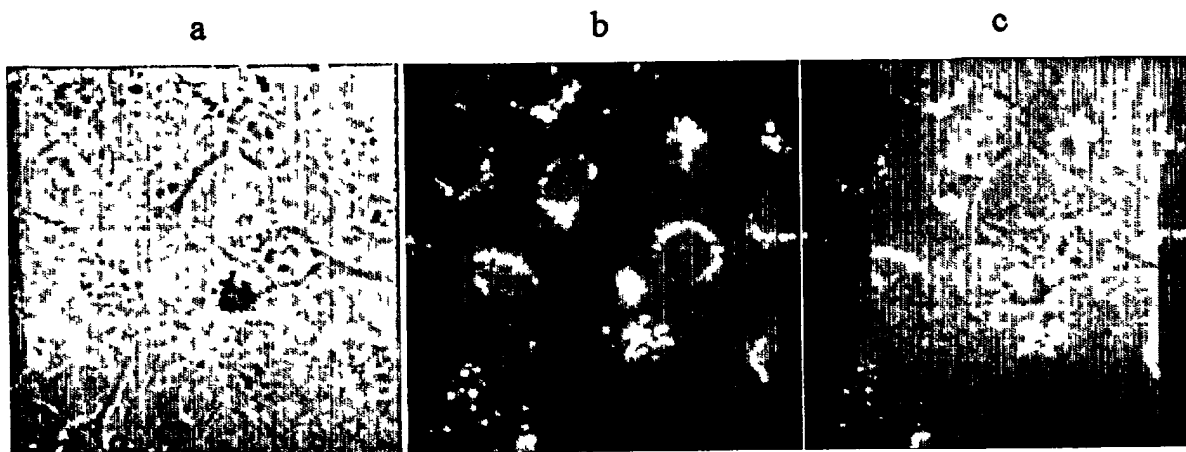
ФИГ. 7А



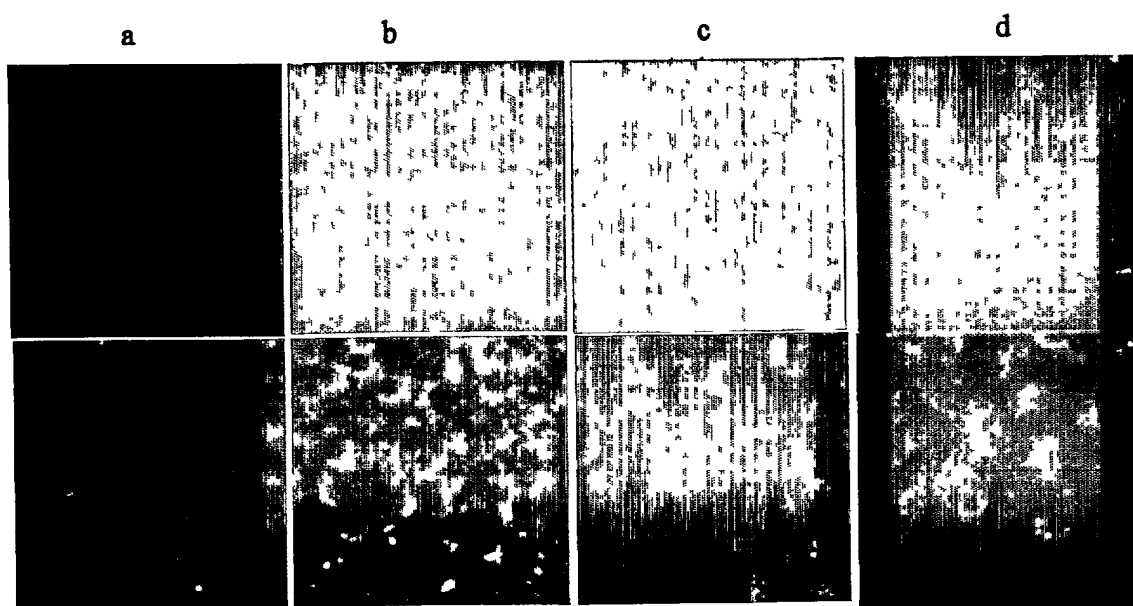
ФИГ. 7В



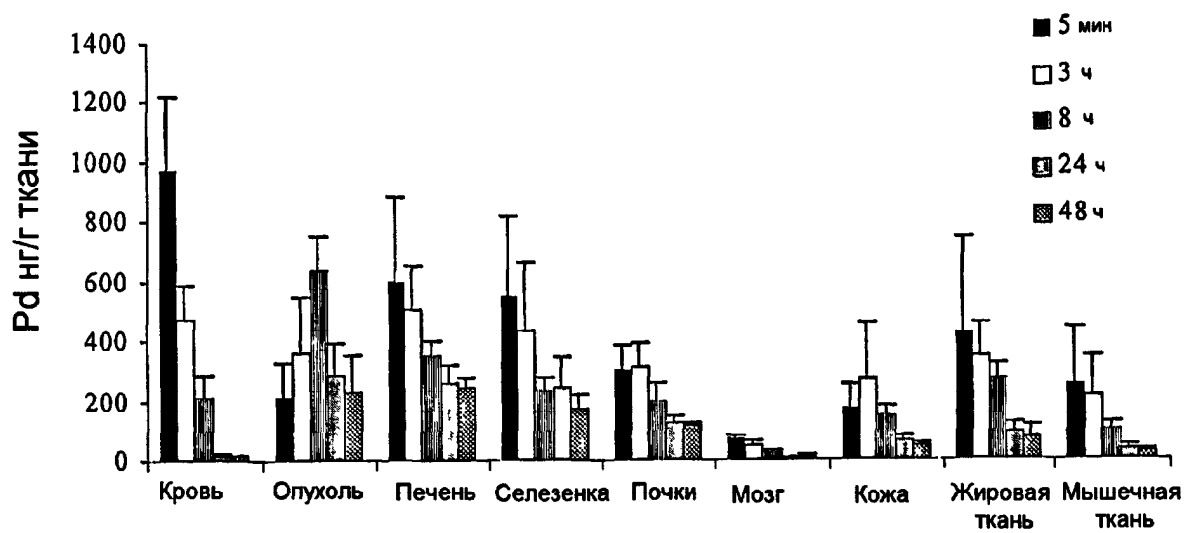
ФИГ. 8



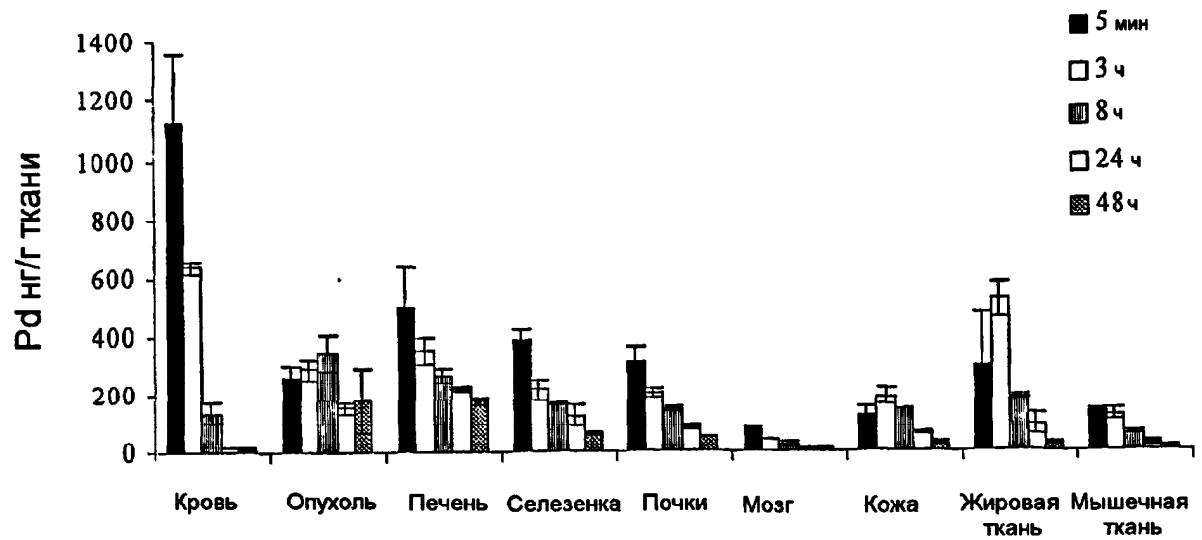
ФИГ. 9



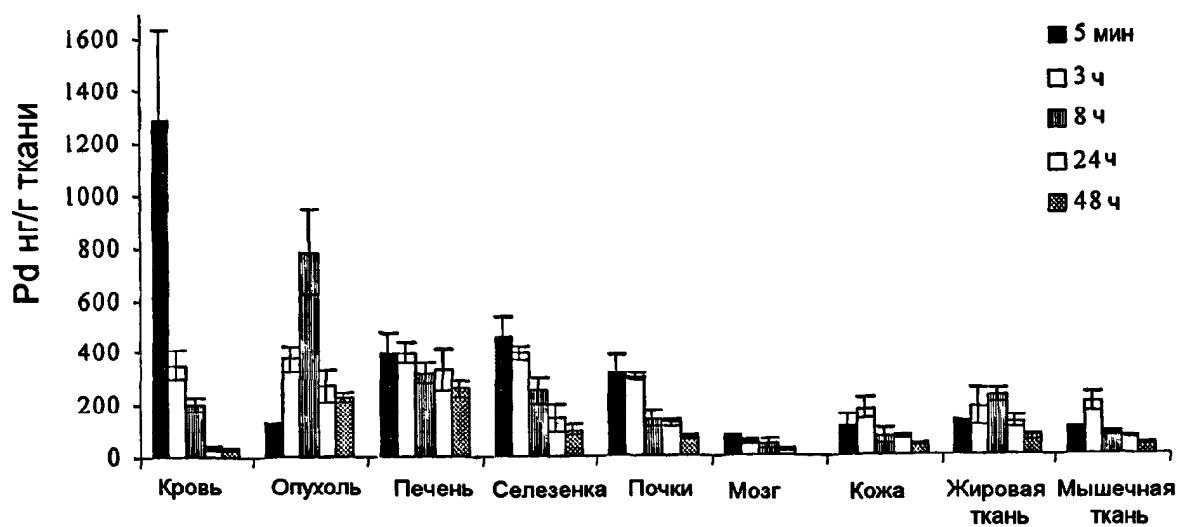
ФИГ. 10



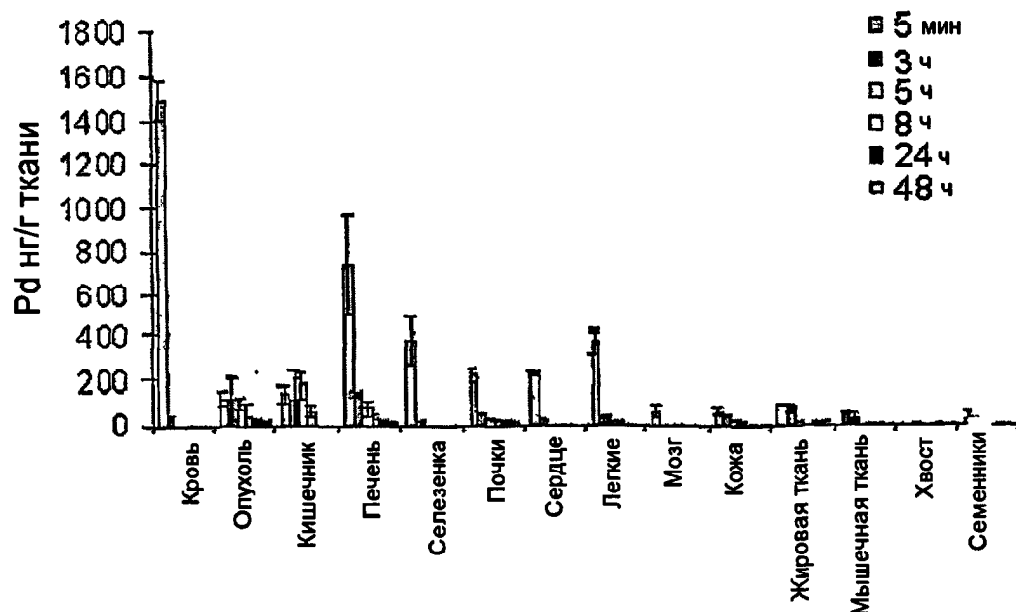
ФИГ. 11A



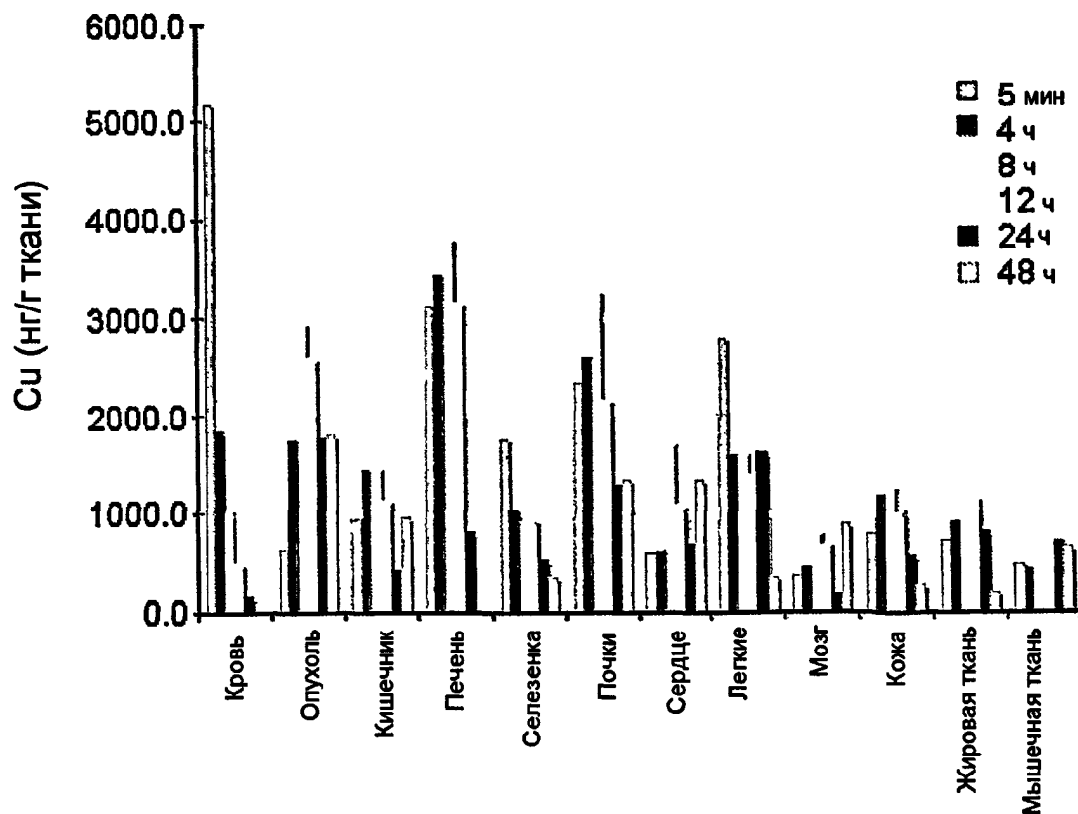
ФИГ. 11В



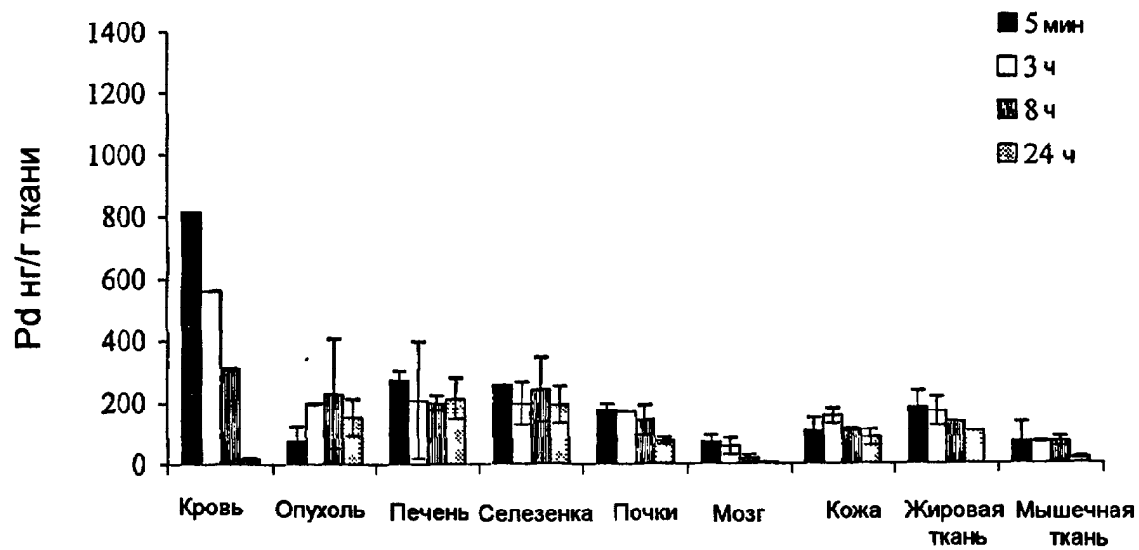
ФИГ. 11С



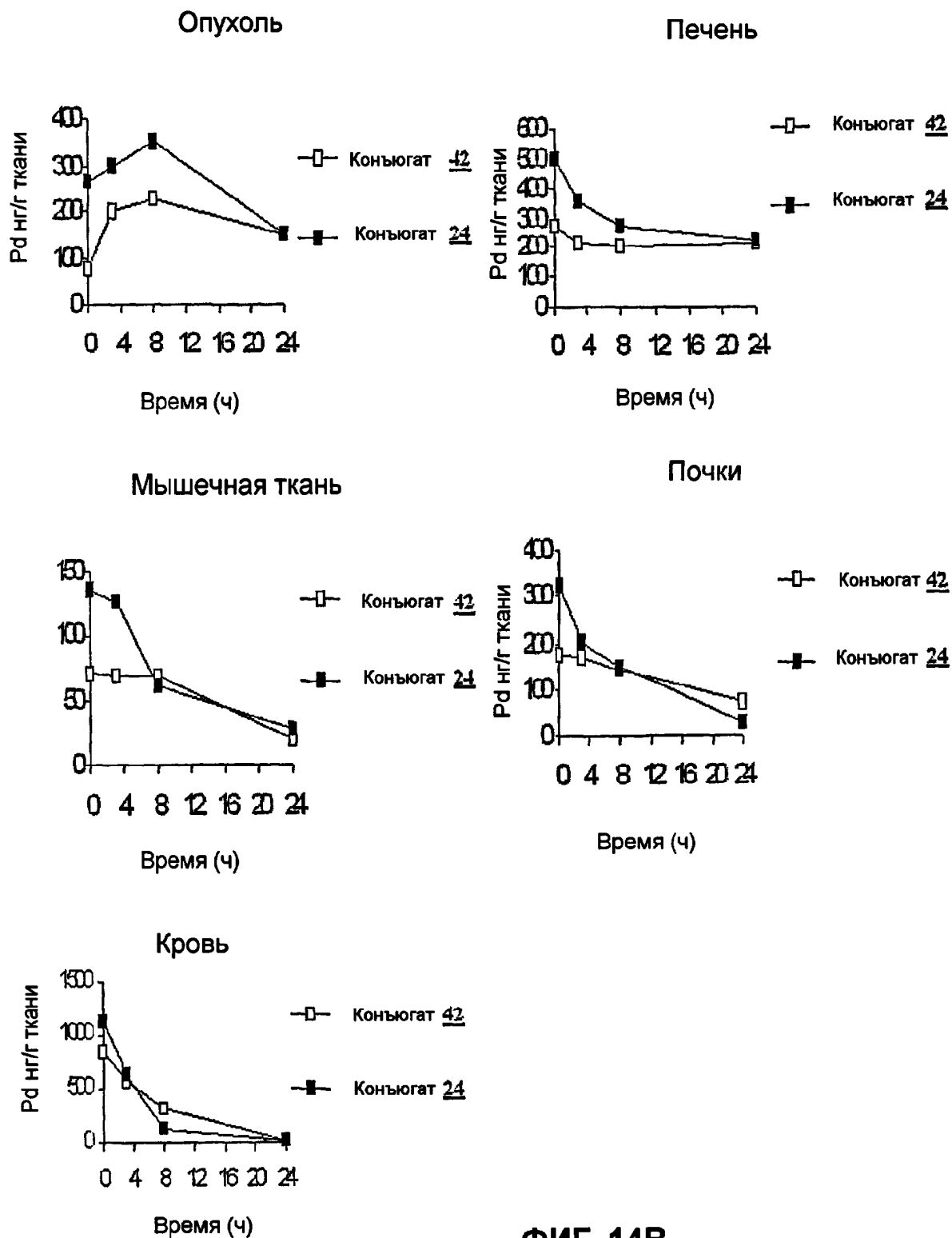
ФИГ. 12



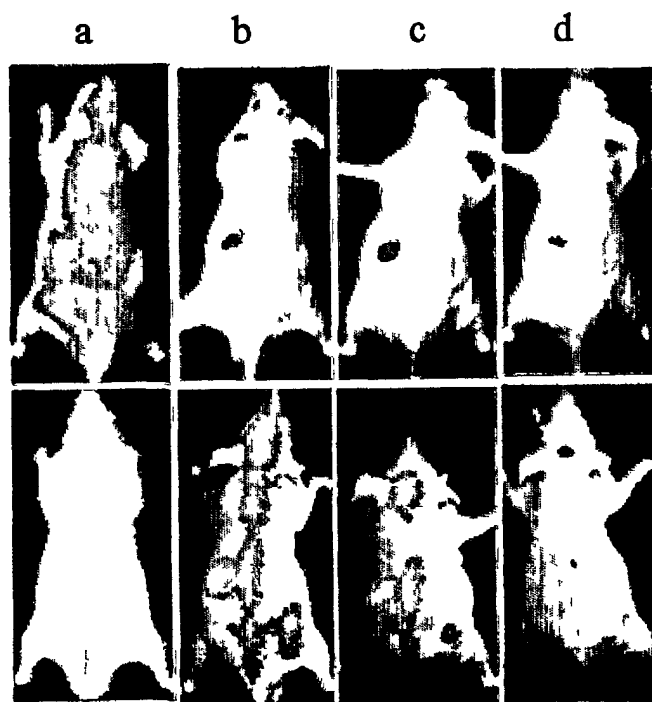
ФИГ. 13



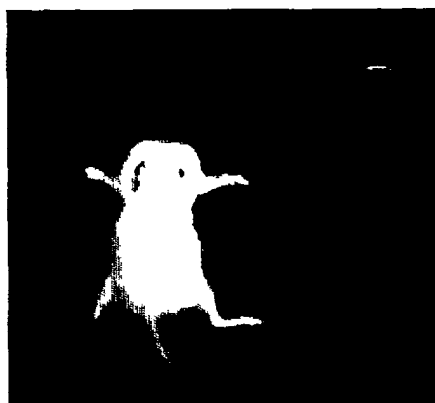
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



ФИГ. 15



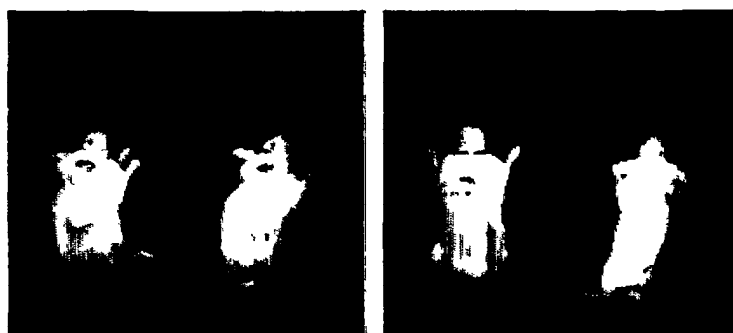
ФИГ. 16А



ФИГ. 16В



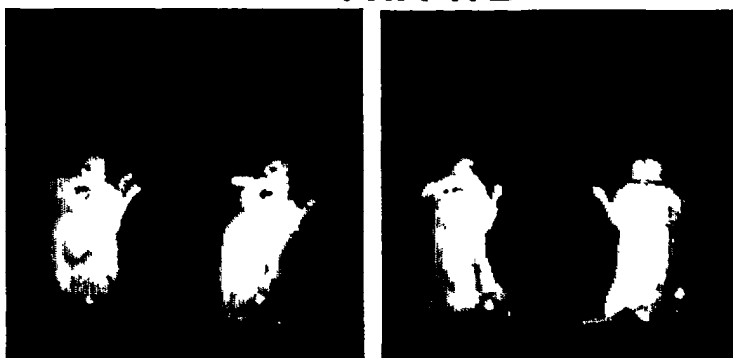
ФИГ. 16С



ФИГ. 17А



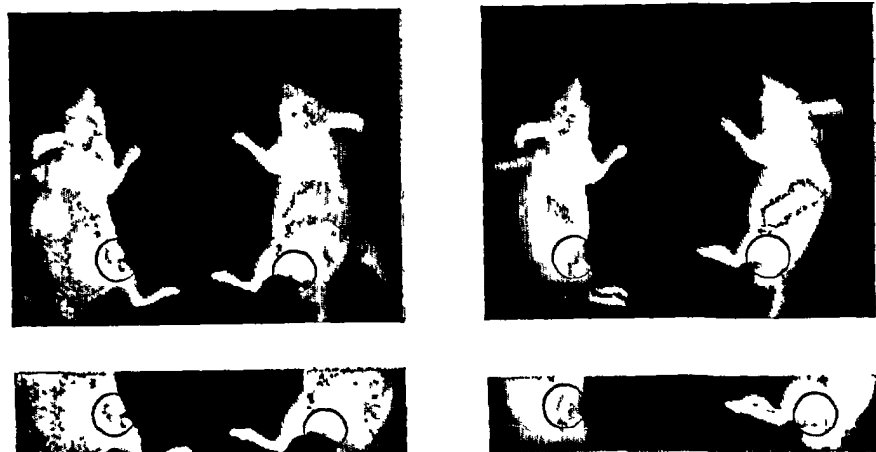
ФИГ. 17В



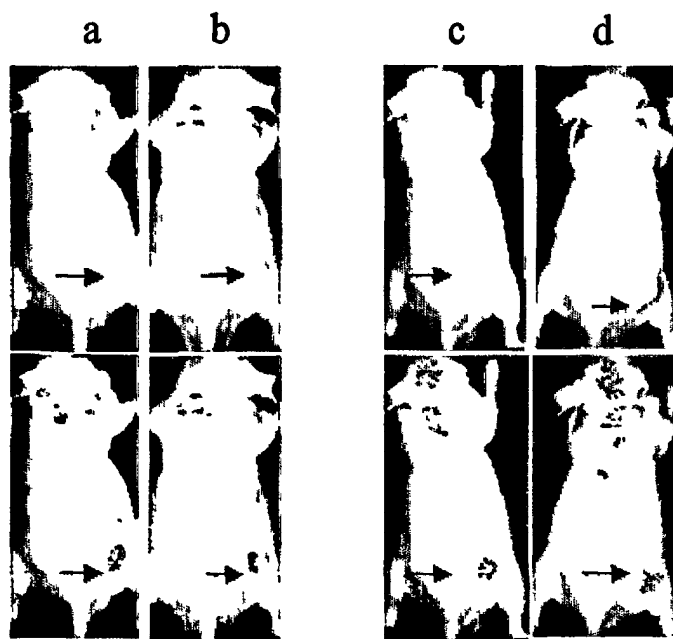
ФИГ. 17С



ФИГ. 18



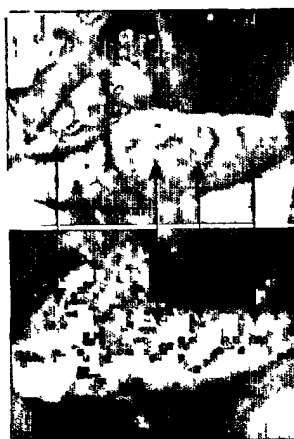
ФИГ. 19



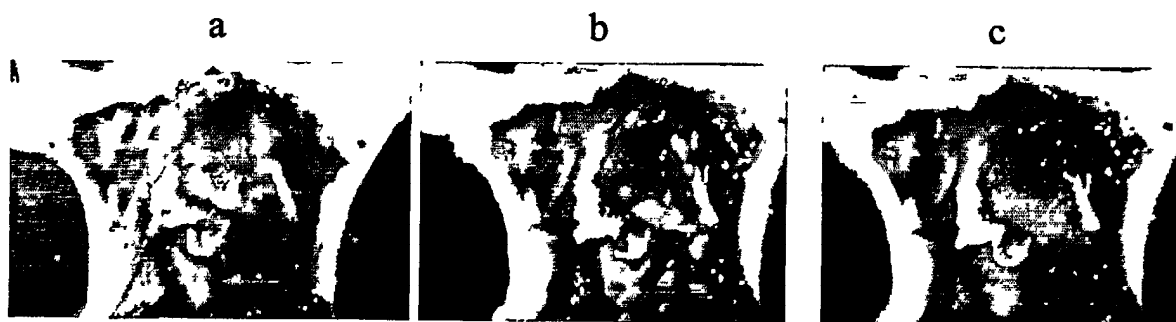
ФИГ. 20



ФИГ. 21



ФИГ. 22



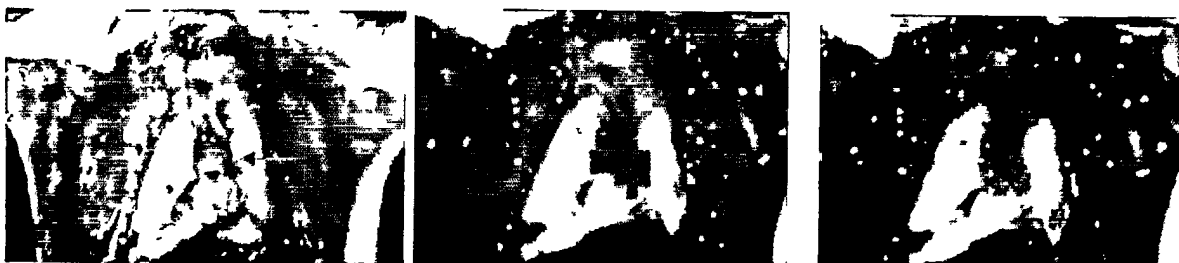
ФИГ. 23А



ФИГ. 23В



ФИГ. 23С



ФИГ. 23D

a

b

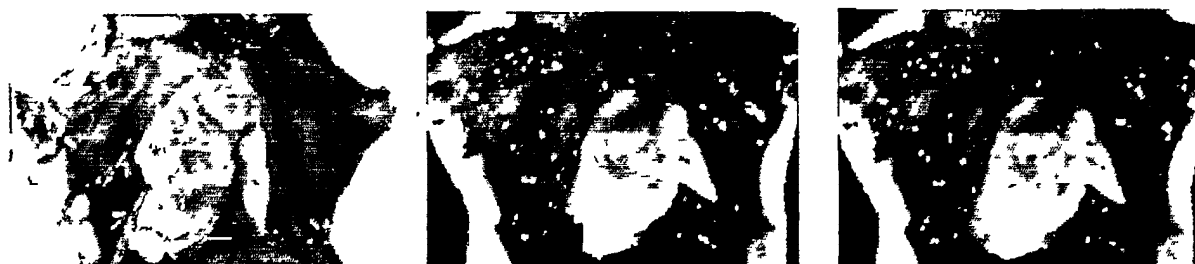
c



ФИГ. 23Е



ФИГ. 23F



ФИГ. 23G



ФИГ. 23H

a

b

c



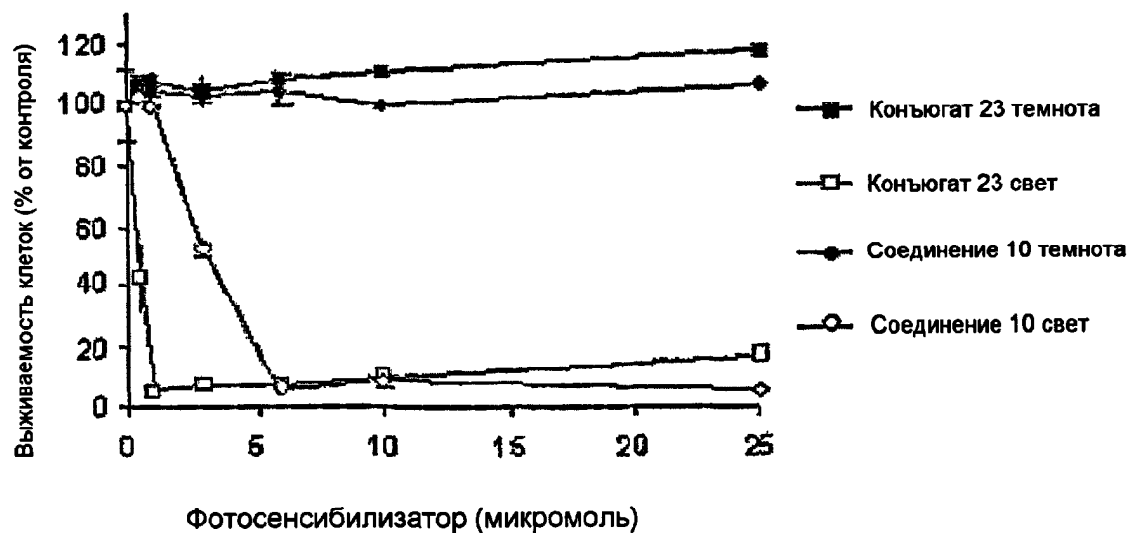
ФИГ. 23I



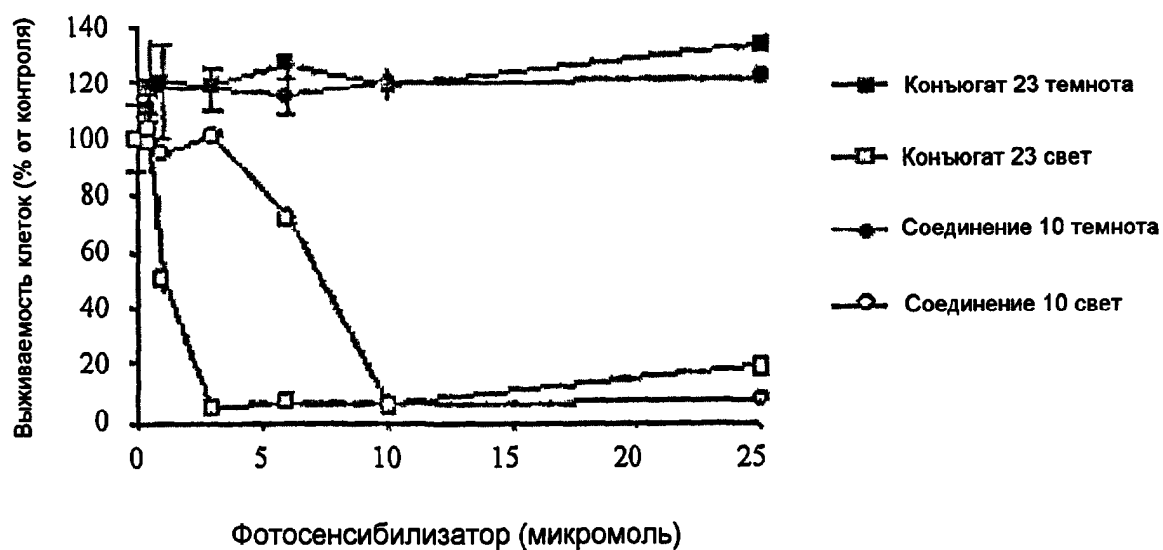
ФИГ. 24



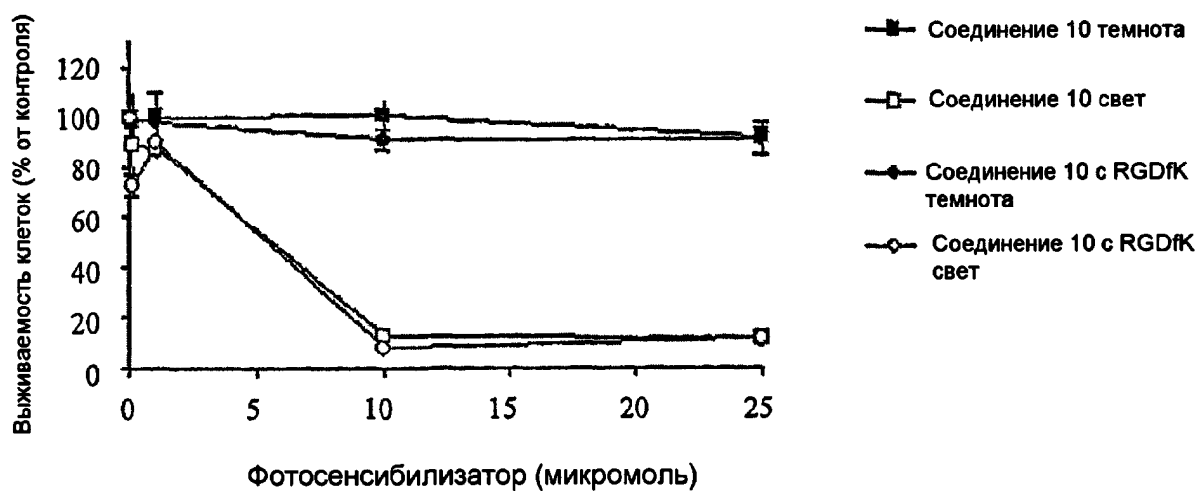
ФИГ. 25A



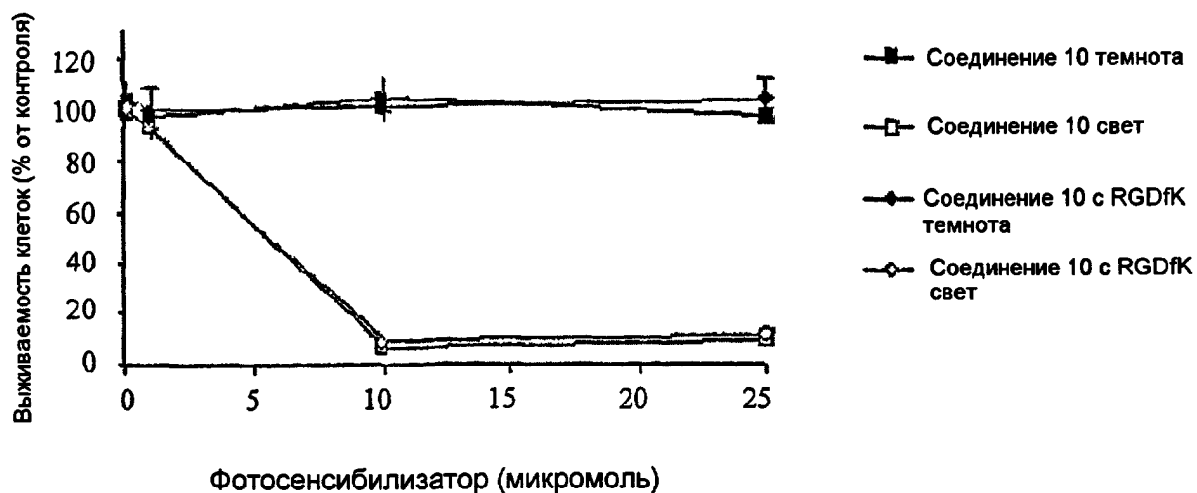
ФИГ. 25В



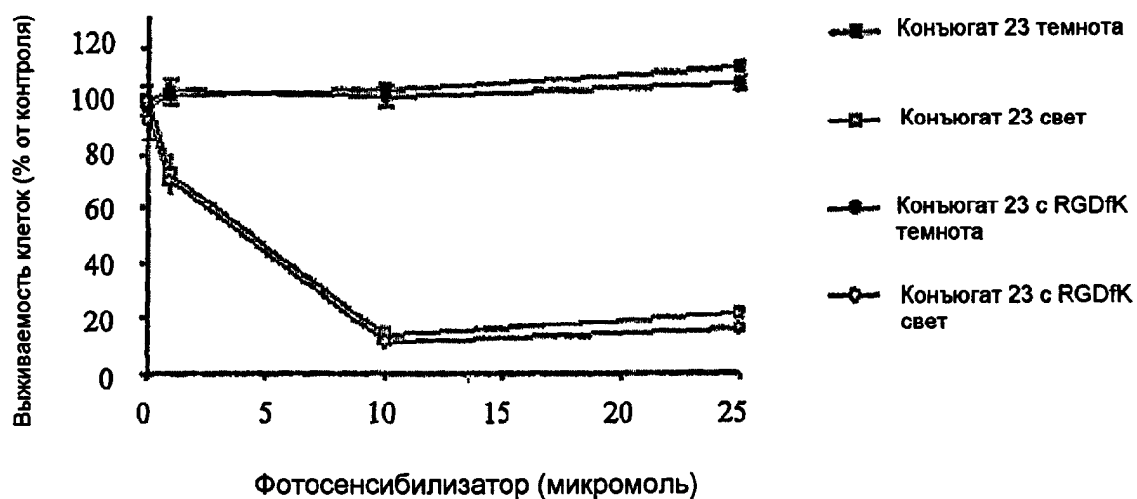
ФИГ. 25С



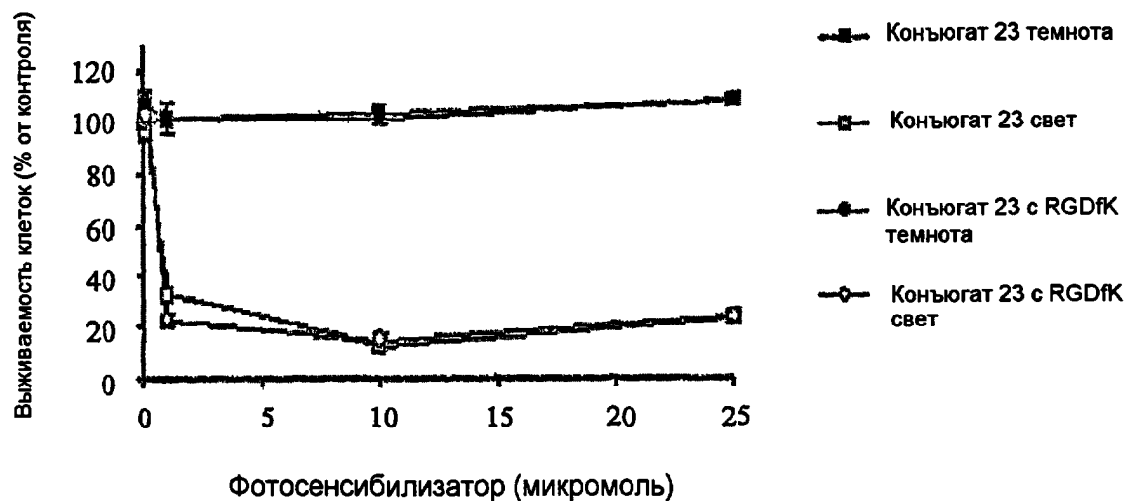
ФИГ. 26А



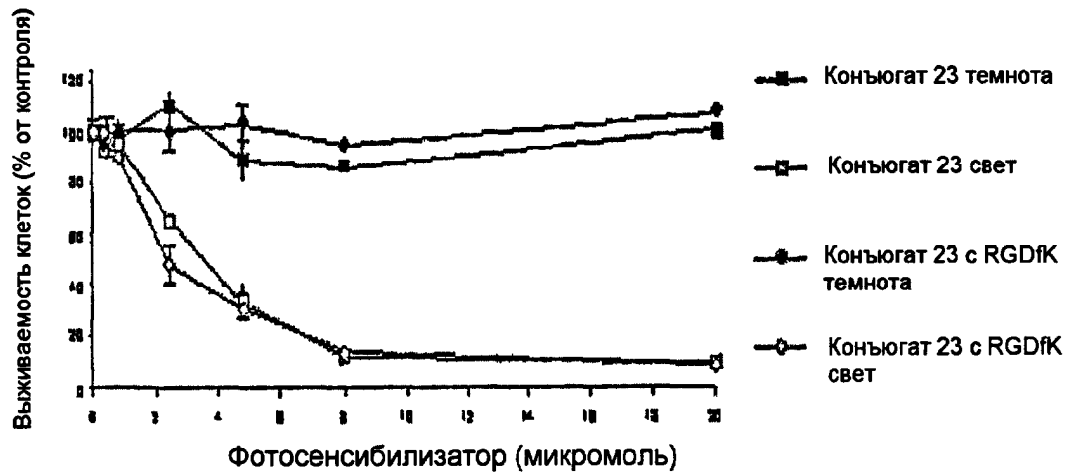
ФИГ. 26В



ФИГ. 26С



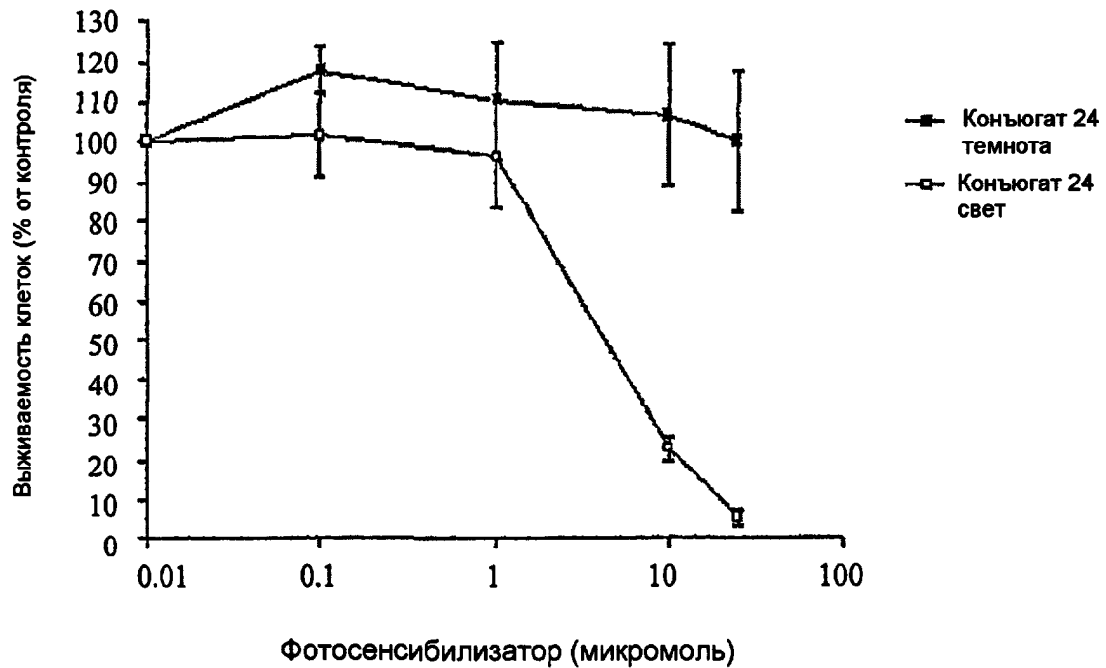
ФИГ. 26D



ФИГ. 27А



ФИГ. 27В



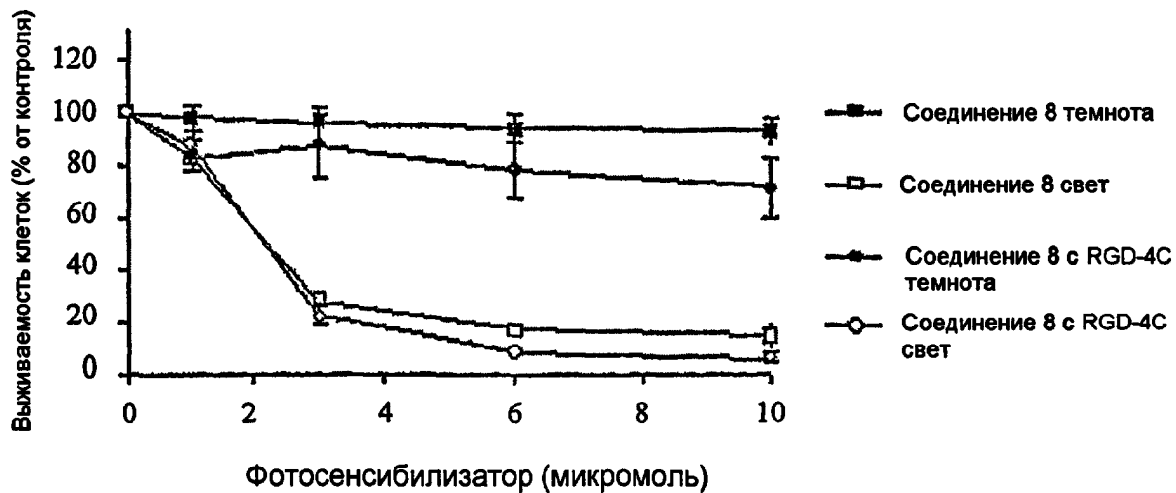
ФИГ. 28



ФИГ. 29



ФИГ. 30А



ФИГ. 30В

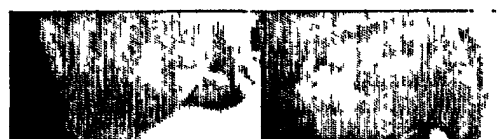


1 CM

ФИГ. 31А



ФИГ. 31В



ФИГ. 31С



ФИГ. 31D

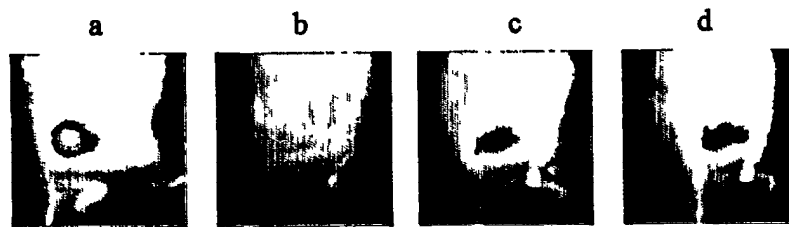


ФИГ. 31Е

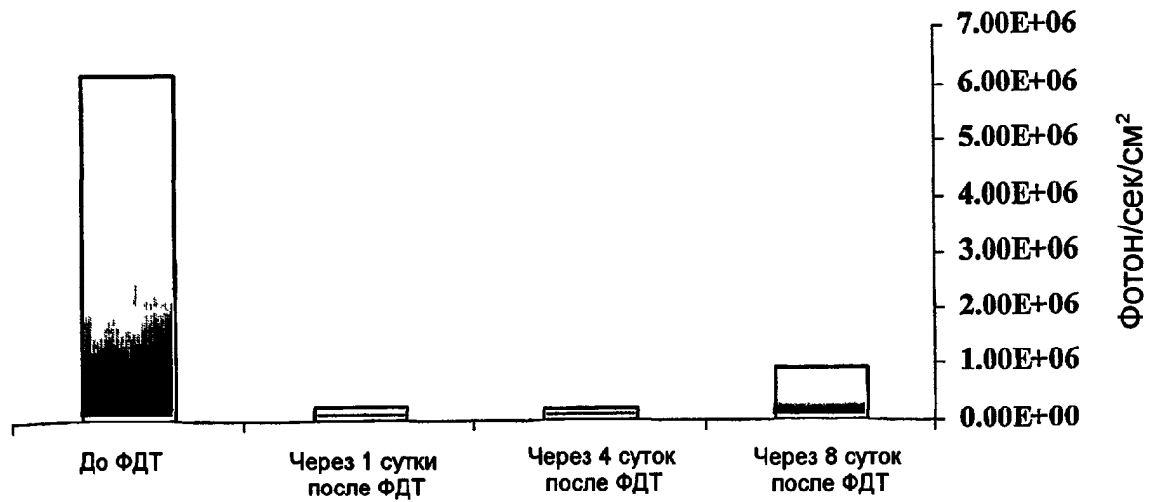


1 CM

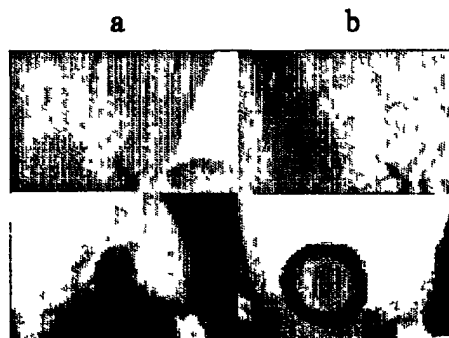
ФИГ. 32А



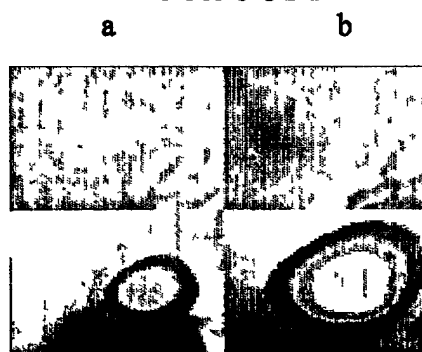
ФИГ. 32В



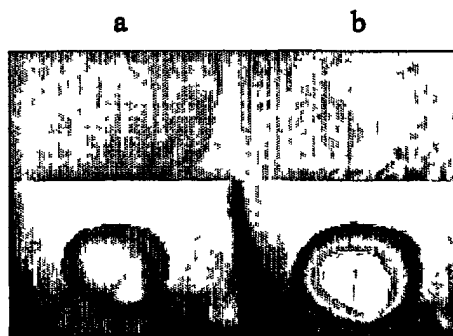
ФИГ. 32С



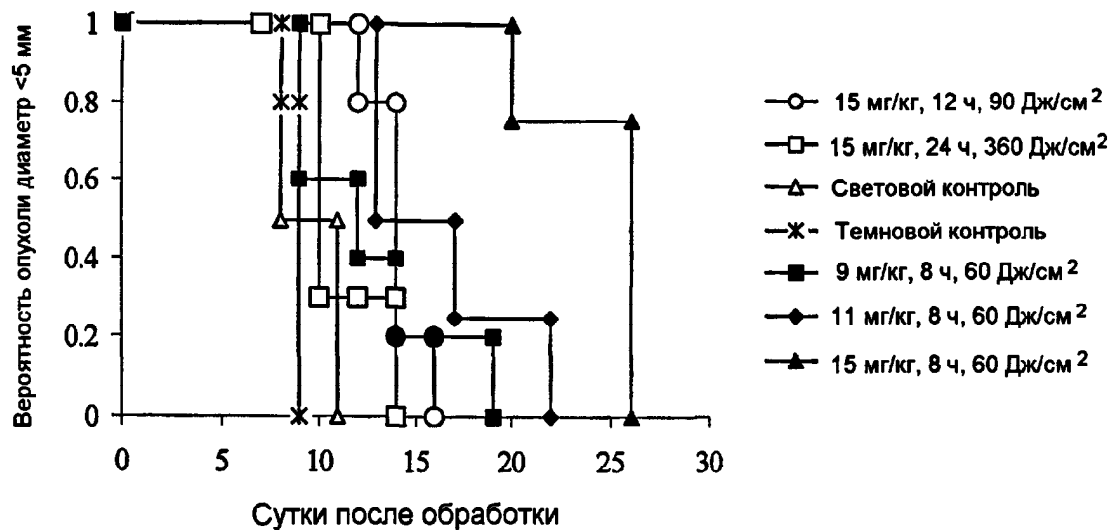
ФИГ. 32D



ФИГ. 32Е



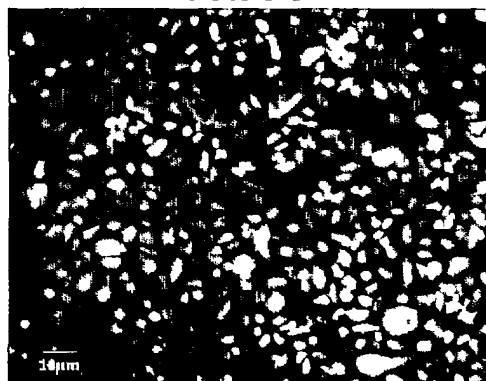
ФИГ. 32F



ФИГ. 33



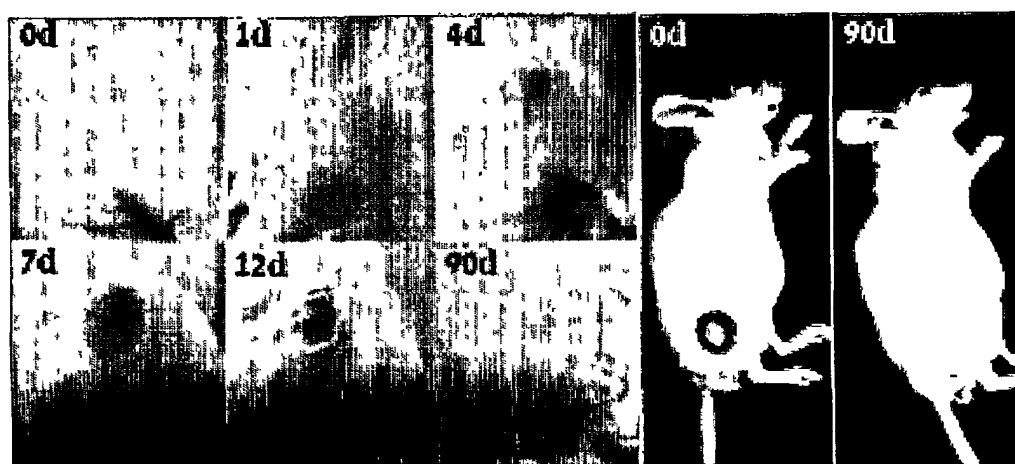
ФИГ. 34А



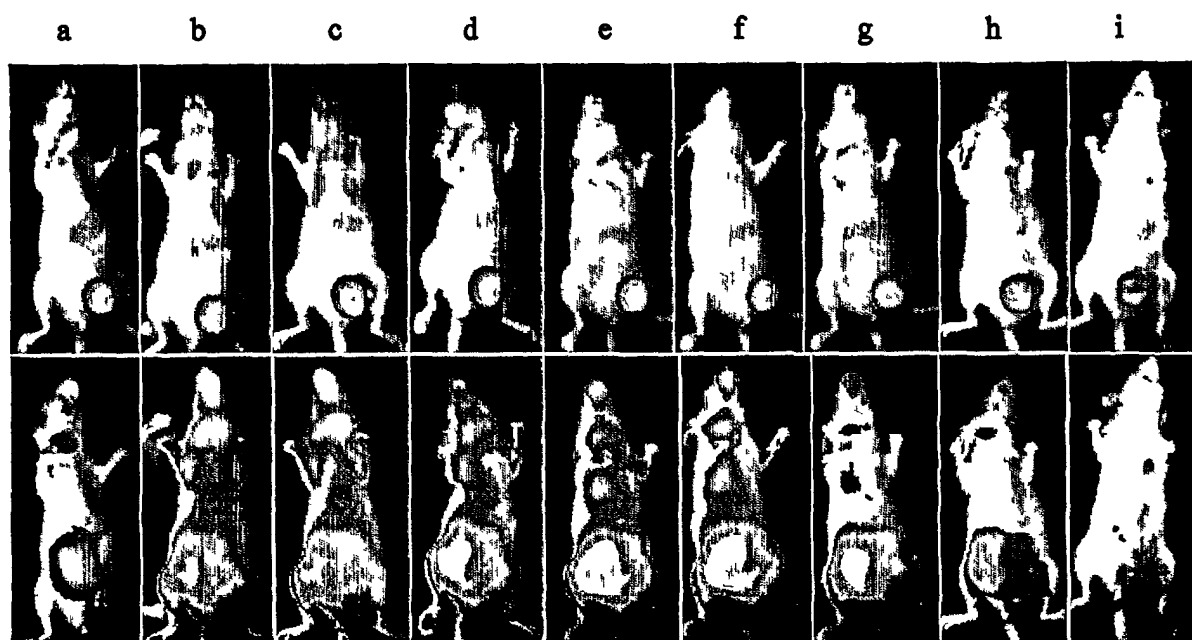
ФИГ. 34В



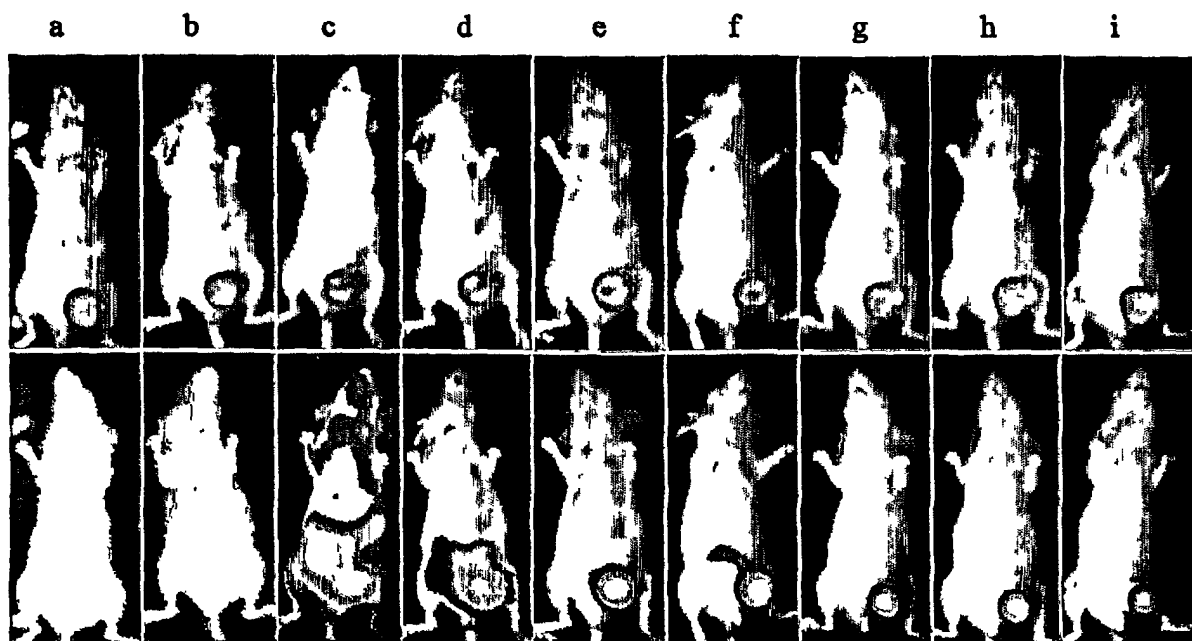
ФИГ. 35А



ФИГ. 35В



ФИГ. 36



ФИГ. 37