

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201992252 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.04.02

(51) Int. Cl. G01N 21/64 (2006.01)  
G01N 33/483 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.04.05

(54) ЛОГОМЕТРИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

(31) 62/483,004

(72) Изобретатель:

(32) 2017.04.07

Харутунян Алек, Гонзалез Хесус И.  
(US)

(33) US

(86) PCT/US2018/026336

(74) Представитель:

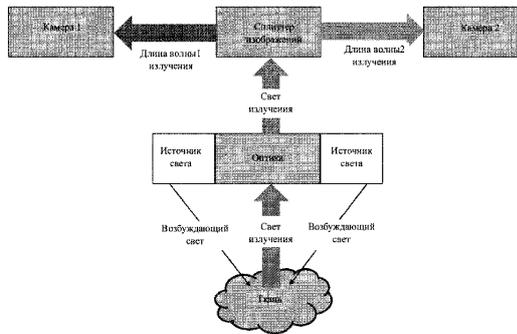
(87) WO 2018/187629 2018.10.11

Строкова О.В., Глухарёва А.О.,  
Лыу Т.Н., Христофоров А.А.,  
Гизатуллина Е.М., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,  
Парамонова К.В., Угрюмов В.М. (RU)

(71) Заявитель:

АВЕЛАС БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК.  
(US)

(57) В данном изобретении раскрыты логометрические реагенты визуализации флуоресценции, а также способы обработки изображений с целью применения порогов отношения и интенсивности флуоресценции для детекции и визуализации биологической активности в биологических образцах с повышенной точностью.



A1

201992252

201992252

A1

# **ЛОГОМЕТРИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Ссылка**

[1] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет перед предварительной заявкой США № 62/483004, поданной 7 апреля 2017 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

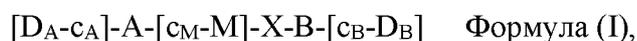
### **Сущность изобретения**

[2] В данном документе раскрыты способы применения порогов отношения и интенсивности флуоресценции с целью детекции и визуализации областей биологической активности в биологическом образце, при этом способы предусматривают: а) приведение биологического образца в контакт с логометрическим флуоресцентным индикатором в отношении биологической активности; б) получение первого изображения интенсивности флуоресценции при первой длине волны излучения и второго изображения интенсивности флуоресценции при второй длине волны излучения для биологического образца; с) комбинирование первого изображения флуоресценции и второго изображения флуоресценции для создания изображения отношения флуоресценции; d) обработку изображения отношения флуоресценции, первого изображения флуоресценции, второго изображения флуоресценции или любой их комбинации с помощью алгоритма анализа изображений, при этом алгоритм анализа изображений: i) использует порог отношения флуоресценции, первый порог интенсивности флуоресценции, второй порог интенсивности флуоресценции или любую их комбинацию для создания изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, ii) осуществляет логическую операцию AND в отношении изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, если два или больше изображения маски были созданы на этапе (i), и iii) обеспечивает классификацию биологического образца либо как положительного либо как отрицательного в отношении биологической активности, при этом классификация основана на детекции области, представляющей интерес, в пределах изображения интенсивности флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, которая характеризуется значением

отношения флуоресценции или значением интенсивности флуоресценции, которое превышает значение порога отношения флуоресценции, порога интенсивности флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой и комбинации, и е) отображение области, представляющей интерес, в пределах первого изображения интенсивности флуоресценции или второго изображения интенсивности флуоресценции, для пользователя, и необязательно сохранение результата классификации в памяти компьютера.

**[3]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец представляет собой клеточный образец, образец ткани *ex vivo* или образец ткани *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологическая активность, подлежащая детекции и визуализации, коррелирует с заболеванием. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание представляет собой артрит, атеросклероз, рак, предрак, воспаление или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологическая активность, подлежащая детекции и визуализации, коррелирует со злокачественной тканью или коагуляцией (свертыванием крови). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления этапы (b)-(e) повторяют два или больше раз через определенные интервалы времени с целью получения серии первых изображений интенсивности флуоресценции, вторых изображений интенсивности флуоресценции и изображений отношения флуоресценции для контроля изменения биологической активности с течением времени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления отображение области, представляющей интерес, предусмотрено в реальном времени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления отображение области, представляющей интерес, используется хирургом в интраоперационных условиях с целью направления хирургической процедуры. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первое изображение интенсивности флуоресценции и второе изображение интенсивности флуоресценции получают с помощью эндоскопа, а отображение области, представляющей интерес, используют с целью направления расположения эндоскопа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления логометрический флуоресцентный индикатор содержит фрагмент донора флуоресценции и фрагмент акцептора флуоресценции, которые разделены расщепляемым линкером. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фрагмент донора флуоресценции и фрагмент акцептора флуоресценции представляют собой Cy5 и Cy7 соответственно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления расщепляемый фрагмент содержит пептидную связь, которая

расщепляется протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления протеаза представляет собой металлопротеазу, сериновую протеазу, треониновую протеазу или цистеиновую протеазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления логометрический флуоресцентный индикатор содержит молекулу формулы (I):



где X представляет собой расщепляемый линкер, который расщепляется протеазой, A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 кислых аминокислотных остатков, B представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 основных аминокислотных остатков, каждое из  $C_A$ ,  $C_B$  и  $C_M$  независимо представляет собой 0-1 аминокислоту, M представляет собой макромолекулу и  $D_A$  и  $D_B$  представляют собой пару фрагментов акцептора и донора флуоресценции, которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции с одного на другой; и при этом  $[C_M-M]$  связана с любым положением на A или X,  $[D_A-C_A]$  связана с любым аминокислотным остатком A и  $[C_B-D_B]$  связана с любым аминокислотным остатком B. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула формулы (I) представляет собой SDM-25. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления только порог отношения флуоресценции используют для создания файла маски.

**[4]** В данном документе также описаны способы автоматизированной оптимизации порогов отношения флуоресценции и интенсивности флуоресценции, используемых для детекции областей биологической активности в логометрических изображениях флуоресценции биологических образцов, при этом способы предусматривают: а) предоставление множества биологических образцов; б) приведение в контакт каждого из биологических образцов с логометрическим флуоресцентным индикатором биологической активности; в) получение первого изображения интенсивности флуоресценции при первой длине волны излучения и второго изображения интенсивности флуоресценции при второй длине волны излучения для каждого из биологических образцов; г) комбинирование первого изображения флуоресценции и второго изображения флуоресценции для создания изображения отношения флуоресценции для каждого из биологических образцов; д) предоставление исходного значения для первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции, порога отношения флуоресценции или любой их комбинации; и е) для каждого из биологических образцов: и) обработку изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с помощью алгоритма анализа изображений,

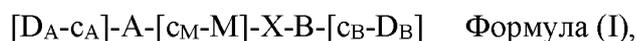
при этом алгоритм анализа изображений: использует порог отношения флуоресценции, первый порог отношения флуоресценции, второй порог отношения флуоресценции или любую их комбинацию для создания изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, осуществляет логическую операцию AND в отношении изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, если два или больше изображения маски были созданы на предыдущем этапе, необязательно проверяет то, что выявляемая область, представляющая интерес, в пределах изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации является большей, чем определенный минимальный размер, при этом выявляемая область, представляющая интерес, представляет собой область, которая характеризуется значением отношения флуоресценции или интенсивности флуоресценции, которое превышает значение порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, и обеспечивает классификацию биологического образца как положительного в отношении биологической активности, если область, представляющая интерес, была выявлена, или обеспечивает классификацию биологического образца как отрицательного в отношении биологической активности, если область, представляющая интерес, не была выявлена; ii) сравнение классификации, предусмотренной алгоритмом анализа изображений с результатом лабораторного исследования при патологии в случае биологического образца с целью определения является ли классификация истинно-положительной, ложно-отрицательной, истинно-отрицательной или ложно-положительной; iii) хранение истинно-положительного, ложно-отрицательного, истинно-отрицательного или ложно-положительного результата классификации в памяти компьютера; и g) повторение этапа (f) с: i) постепенно возрастающим значением первого порога интенсивности флуоресценции, при этом второй порог интенсивности флуоресценции и порог отношения флуоресценции поддерживаются фиксированными до тех пор, пока все из биологических образцов не классифицируются как отрицательные с помощью алгоритма обработки изображений, или ii) постепенно возрастающим значением второго порога интенсивности флуоресценции, при этом первый порог интенсивности флуоресценции и порог отношения флуоресценции поддерживаются фиксированными до тех пор, пока все из

образцов не классифицируют как отрицательные с помощью алгоритма обработки изображений, или iii) постепенно возрастающим значением порога отношения флуоресценции, при этом первый порог интенсивности флуоресценции и второй порог интенсивности флуоресценции поддерживаются фиксированными до тех пор, пока все из образцов не классифицируют как отрицательные с помощью алгоритма обработки изображений; h) расчет кривой зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) с помощью сохраненных результатов классификации для каждой совокупности значений порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции и второго порога интенсивности флуоресценции; и i) сравнение площади под кривой ROC для каждой совокупности значений порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции и второго порога интенсивности флуоресценции с целью оптимальных условий для порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации.

**[5]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец представляет собой клеточный образец, образец ткани *ex vivo* или образец ткани *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологическая активность, подлежащая выявлению, коррелирует с заболеванием. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание представляет собой артрит, атеросклероз, рак, предрак, воспаление или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль молочной железы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологическая активность, подлежащая детекции и визуализации, коррелирует со злокачественной тканью или коагуляцией (свертыванием крови). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления логометрический флуоресцентный индикатор содержит фрагмент донора флуоресценции и фрагмент акцептора флуоресценции, которые разделены расщепляемым линкером. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фрагмент донора флуоресценции и фрагмент акцептора флуоресценции представляют собой Cy5 и Cy7 соответственно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления расщепляемый фрагмент содержит пептидную связь, которая расщепляется протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления протеаза представляет собой металлопротеазу, сериновую протеазу, треониновую протеазу или цистеиновую протеазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления логометрический флуоресцентный индикатор представляет собой SDM-25, меченый Cy5 и Cy7.

[6] В данном документе раскрыты логотметрические способы визуализации флуоресценции с целью детекции биологической активности в биологическом образце, при этом способы предусматривают: а) приведение в контакт биологического образца с логотметрическим флуоресцентным индикатором биологической активности; б) облучение биологического образца возбуждающим светом первой длины волны возбуждения; в) получение первого изображения интенсивности флуоресценции биологического образца при первой длине волны излучения; г) последовательное или одновременное получение второго изображения интенсивности флуоресценции биологического образца при второй длине волны излучения; и е) обеспечение компьютерной обработки изображения с целью комбинирования первого изображения интенсивности флуоресценции и второго изображения интенсивности флуоресценции для создания изображения отношения флуоресценции, при этом используется алгоритм обработки изображений для детекции или отображения области, представляющей интерес, в пределах изображения отношения флуоресценции, которое характеризуется значением отношения флуоресценции, первым значением интенсивности флуоресценции, вторым значением интенсивности флуоресценции или любой их комбинацией, которая превышает значение порога интенсивности флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции, порога отношения флуоресценции или любую их комбинацию.

[7] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первое и второе изображения интенсивности флуоресценции получают на основе биологического образца *in vitro*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первое и второе изображения интенсивности флуоресценции получают на основе биологического образца *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец представляет собой клеточный образец, образец ткани *ex vivo* или образец ткани *in vivo*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления логотметрический флуоресцентный индикатор представляет собой молекулу формулы (I):



где X представляет собой расщепляемый линкер, который расщепляется протеазой, A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 кислых аминокислотных остатков, B представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 основных аминокислотных остатков, каждое из  $C_A$ ,  $C_B$  и  $C_M$  независимо представляет собой 0-1 аминокислоту, M представляет собой макромолекулу и  $D_A$  и  $D_B$  представляют собой пару фрагментов акцептора и донора флуоресценции, которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции с одного

на другой; и при этом [с<sub>М</sub>-М] связана с любым положением на А или Х, [D<sub>А</sub>-с<sub>А</sub>] связана с любым аминокислотным остатком А и [с<sub>В</sub>-D<sub>В</sub>] связана с любым аминокислотным остатком В.

**[8]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 9 кислых аминокислотных остатков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А представляет собой пептид с последовательностью, содержащей 5 или 9 последовательных глутаматных остатков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления В представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 7 до 9 основных аминокислотных остатков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления В представляет собой пептид с последовательностью, содержащей 8 или 9 последовательных аргининовых остатков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А представляет собой пептидную последовательность, содержащую 5 или 9 последовательных глутаматных остатков, а В представляет собой пептидную последовательность, содержащую 8 или 9 последовательных аргининовых остатков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А представляет собой пептидную последовательность, содержащую 5 последовательных глутаматных остатков, а В представляет собой пептидную последовательность, содержащую 8 последовательных аргининовых остатков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>А</sub>, с<sub>В</sub> и с<sub>М</sub> независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты или не встречающейся в природе аминокислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>А</sub>, с<sub>В</sub> и с<sub>М</sub> независимо выбирают из D-аминокислоты, L-аминокислоты, α-аминокислоты, β-аминокислоты или γ-аминокислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>А</sub>, с<sub>В</sub> и с<sub>М</sub> независимо выбирают из любой аминокислоты, имеющей свободную тиоловую группу, любой аминокислоты, имеющей N-концевую аминогруппу, и любой аминокислоты с боковой цепью, способной образовывать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>А</sub>, с<sub>В</sub> и с<sub>М</sub> независимо выбирают из D-цистеина, D-глутамата, лизина и пара-4-ацетил-L-фенилаланина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с<sub>В</sub> представляет собой любую аминокислоту, имеющую свободную тиоловую группу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с<sub>В</sub> представляет собой D-цистеин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с<sub>А</sub> представляет собой любую аминокислоту, имеющую N-концевую аминогруппу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с<sub>А</sub> представляет собой D-глутамат. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления  $S_A$  представляет собой лизин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $S_M$  представляет собой любую аминокислоту с одной цепью, способной образовывать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $S_M$  представляет собой пара-4-ацетил-L-фенилаланин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $X$  содержит пептидную связь. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $X$  содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: PLGLAG, PLG-C(me)-AG, RPLALWRS, ESPAYYTA, DPRSFL, PPRSFL, RLQLKL и RLQLK(Ac)L. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $X$  расщепляется металлопротеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления металлопротеиназа представляет собой матриксную металлопротеиназу, металлопротеиназу ADAM, адамализин, паппализин, матрилизин, неприлизин (нейтральную эндопептидазу), ангиотензинпревращающий фермент, металлокарбоксипептидазу или глутаматкарбоксипептидазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $X$  содержит аминокислотную последовательность, которая расщепляется MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, MMP13 или MMP14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $X$  расщепляется сериновой протеазой или треониновой протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сериновая протеаза представляет собой эластазу, фактор коагуляции (тромбин, фактор VIIa, фактор IXa или фактор Xa), тканевой активатор плазминогена, активатор плазминогена урокиназного типа, плазмин, тестизин, корин, тканевой или плазменный калликреин, триптазу или дипептидилпептидазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $X$  расщепляется цистеиновой протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления цистеиновая протеаза представляет собой катепсин B, катепсин K, катепсин S, катепсин L, каспазу или легумин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $D_A$  и  $D_B$  представляют собой пару фрагментов акцептора и донора флуоресценции, которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции с одного на другой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $D_A$  и  $D_B$  представляют собой Cy5 и Cy7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первая длина волны возбуждения составляет от приблизительно 610 нм до приблизительно 650 нм. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первая длина волны излучения составляет от приблизительно 660 нм до приблизительно 720 нм. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторая длина волны излучения составляет от приблизительно 760 нм до приблизительно 830 нм. В соответствии с некоторыми

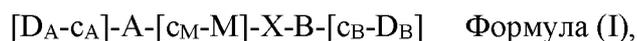
вариантами осуществления  $D_A$  и  $D_B$  представляют собой Cy5 и IR Dye750. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $D_A$  и  $D_B$  представляют собой Cy5 и IR Dye800. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $D_A$  и  $D_B$  представляют собой Cy5 и ICG. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления этапы (c)-(e) повторяют два или больше раз через определенные интервалы времени с целью получения серии изображений отношения флуоресценции для контроля изменений биологической активности с течением времени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первое и второе изображения интенсивности флуоресценции нормализуют на время экспозиции изображения перед созданием изображения отношения флуоресценции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритм обработки изображений предусматривает применение порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с целью детекции области, представляющей интерес. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритм обработки изображений дополнительно предусматривает: (i) применение порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с целью создания изображения маски изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, (ii) осуществление логической операции AND в отношении изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, если два или больше изображения маски были созданы на этапе (i), и (iii) обеспечение классификации биологического образца как положительного в отношении биологической активности, если область, представляющая интерес, была выявлена, или обеспечение классификации биологического образца как отрицательного в отношении биологической активности, если область, представляющая интерес, не была выявлена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среднее отношение флуоресценции или среднее значение интенсивности флуоресценции в пределах области, представляющей интерес, предусматривает качественную характеристику биологической активности в области, представляющей интерес. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среднее отношение флуоресценции или среднее значение интенсивности флуоресценции в пределах области, представляющей интерес, предусматривает количественную характеристику биологической активности в области, представляющей интерес. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления выявляемая область, представляющая интерес, коррелирует со связанной с раком биологической активностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изображение отношения флуоресценции предусматривает контрастное отношение, составляющее по меньшей мере 1,5:1 между раковой и нормальной тканью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритм обработки изображений дополнительно предусматривает проверку того, что выявляемая область, представляющая интерес, является большей, чем определенный минимальный размер.

**[9]** В данном документе раскрыты способы выполнения диагностического исследования на наличие рака на основе логометрической визуализации флуоресценции, при этом способы предусматривают: а) приведение в контакт биологического образца с логометрическим флуоресцентным индикатором; b) облучение биологического образца возбуждающим светом первой длины волны возбуждения; с) получение первого изображения интенсивности флуоресценции биологического образца при первой длине волны излучения; d) последовательное или одновременное получение второго изображения интенсивности флуоресценции биологического образца при второй длине волны излучения; и e) обеспечение компьютерной обработки изображения с целью комбинирования первого изображения интенсивности флуоресценции и второго изображения интенсивности флуоресценции для создания изображения отношения флуоресценции, при этом используется алгоритм обработки изображений для детекции или отображения области, представляющей интерес, в пределах изображения отношения флуоресценции биологического образца, которое коррелирует со связанной с раком биологической активностью.

**[10]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первое изображение интенсивности флуоресценции и второе изображение интенсивности флуоресценции нормализуют на время экспозиции изображения перед созданием изображения отношения флуоресценции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритм обработки изображений предусматривает применение порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с целью детекции области, представляющей интерес, которая коррелирует с относящейся к раку биологической активностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритм обработки изображений дополнительно предусматривает: (i) применение порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с целью создания изображения маски

изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, (ii) осуществление логической операции AND в отношении изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, если два или больше изображения маски были созданы на этапе (i), и (iii) необязательно проверку того, что область, представляющая интерес, является большей, чем определенный минимальный размер, и (iv) обеспечение классификации биологического образца как положительного в отношении связанной с раком активности, если область, представляющая интерес, была выявлена, или обеспечение классификации биологического образца как отрицательного в отношении связанной с раком активности, если область, представляющая интерес, не была выявлена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления логометрический флуоресцентный индикатор представляет собой молекулу формулы (I):



где X представляет собой расщепляемый линкер, который расщепляется протеазой, A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 кислых аминокислотных остатков,

**[11]** В представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 основных аминокислотных остатков, каждое из  $C_A$ ,  $C_B$  и  $C_M$  независимо представляет собой 0-1 аминокислоту, M представляет собой макромолекулу и  $D_A$  и  $D_B$  представляют собой пару фрагментов акцептора и донора флуоресценции, которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции с одного на другой; и при этом  $[C_M-M]$  связана с любым положением на A или X,  $[D_A-C_A]$  связана с любым аминокислотным остатком A и  $[C_B-D_B]$  связана с любым аминокислотным остатком B. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления логометрический флуоресцентный индикатор представляет собой SDM-25, меченую Cy5 и Cy7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связанная с раком биологическая активность ассоциирована с меланомой, немеланомным раком кожи, раком легких, раком молочной железы, раком предстательной железы, колоректальным раком, раком поджелудочной железы, раком печени, раком яичников, раком шейки матки, раком головы и шеи, раком лимфатических узлов, раком щитовидной железы, глиомой, раком желудочно-кишечного тракта или саркомой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациента инфузируют логометрическим флуоресцентным индикатором и способ используется для

детекции рака молочной железы в образцах, полученных после хирургического вмешательства. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клиническая чувствительность в случае диагностики рака составляет более 80%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клиническая специфичность в случае диагностики рака составляет более 80%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациента инфузируют логометрическим флуоресцентным индикатором и способ используется интраоперационно с целью направления хирургической процедуры. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает результат исследования, который используется врачом или медицинским работником для постановки диагноза или принятия решения о лечении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления результат исследования передается из локации, где способ осуществляется, в локацию врача или медицинского работника.

### **Краткое описание чертежей**

[12] Новые характеристики настоящего изобретения изложены с характерными свойствами в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание характеристик и преимуществ настоящего изобретения будет достигнуто посредством отсылки на следующее подробное описание, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и прилагаемые чертежи, на которых представлено следующее.

[13] **На Фиг. 1** представлена структура одного варианта осуществления молекулы для селективной доставки (SDM) (или активируемого проникающего пептида (ACPP)), содержащей донор флуоресценции  $Cy5$  и гаситель флуоресценции  $Cy7$ . Указанная структура, изображенная на **Фиг. 1**, представляет собой молекулу SDM-25.

[14] **На Фиг. 2А-Фиг. 2В** представлены спектры поглощения и излучения флуоресценции в случае SDM-25, логометрического ACPP (RACPP), содержащего полианионный домен, который конъюгирован с фрагментом  $Cy7$  и связан с помощью расщепляемого линкера с поликатионным доменом, который конъюгирован с фрагментом  $Cy5$ . **Фиг. 2А**: Спектр поглощения 17,5 мкг/мл SDM-25 (AVB-620) в 80%/20% смеси PBS/ацетонитрил в диапазоне 500-800 нм. **Фиг. 2В**: Спектр излучения флуоресценции SDM-25 в буфере TCNB с использованием длины волны возбуждения 630 нм и диапазона длины волны излучения 620-850 нм. Указанные два образца получали с использованием или без использования прединкубации с MMP9. Показаны иллюстративные спектры (на основе шести экспериментов). Спектры излучения флуоресценции измеряли в кювете спектрофотометра с помощью возбуждающего света 630 нм до (красный цвет) и после

(синий цвет) обработки протеазой MMP9. Перед расщеплением Су5 гасят с помощью Су7, который повторно излучает поглощенный возбуждающий свет при 780 нм. После расщепления Су7 больше не гасит Су5, что приводит к повышению 670 нм пика излучения Су5 и снижению повторного излучения Су7 при 780 нм. Остаточное плечо от 710 нм до 840 нм главным образом связано с излучением Су5.

[15] На Фиг. 3А-Фиг. 3С представлены примеры данных, иллюстрирующие различные скорости расщепления, наблюдаемые в случае SDM-25 (AVB-620) в опухолевой ткани рака молочной железы и нормальной ткани, и кривая зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) в случае применения SDM-25 при детекции раковой ткани молочной железы человека на основе логометрической визуализации флуоресценции. **Фиг. 3А:** Скорость расщепления SDM-25 (нМ, расщепляемых в минуту) в 25 парных гомогенатах ткани пациентов с раком молочной железы человека. Показаны положительная в отношении рака опухолевая ткань (ромбы красного цвета) и отрицательная в отношении рака прилегающая ткань (треугольники синего цвета). Парные образцы соединены с помощью линий. Парный t-критерий предусматривал  $P < 0,0001$  в случае значимой разницы между опухолью и нормой. **Фиг. 3В:** Диаграмма рассеяния тех же самых данных с учетом среднего  $\pm$  95% доверительный интервал. На Фиг. 3С показана кривая ROC в случае детекции скорости расщепления SDM-25 опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью.

[16] На Фиг. 4А-Фиг. 4В представлены примеры данных, иллюстрирующих применение SDM-25 для количественной оценки активности MMP в гомогенатах незлокачественной ткани молочной железы и гомогенатах опухоли. **Фиг. 4А:** гомогенаты из трех иллюстративных образцов рака молочной железы человека и парной нормальной ткани, выбранные от 25 пациентов, для которых данные представлены на Фиг. 3А-Фиг. 3С, анализировали в отношении 10% желатиновой зимограммы. Рекомбинантные активные MMP2 и MMP9 показаны в качестве стандартов (2 нг на полосу). **Фиг. 4В:** Количественная оценка с помощью ELISA шести MMP в пяти иллюстративных образцах рака молочной железы человека (помеченных как (1)) и парной нормальной ткани (помеченной как (2)), в том числе трех пар, показанных на Фиг. 4А. Планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения. Н.о. = не определено.

[17] На Фиг. 5 схематически изображен один неограничивающий пример системы логометрической визуализации флуоресценции, в которой используется распределитель изображений с целью визуализации излучения флуоресценции при двух различных длинах волн на двух различных камерах.

[18] На Фиг. 6 представлена схематическая иллюстрация системы логометрической визуализации, содержащей аппаратное оборудование (например, аппаратное оборудование для получения изображений, процессор и память компьютера) и компоненты программного обеспечения (например, операционную систему и модули программного обеспечения для получения изображений, обработки изображений и отображения изображений).

[19] На Фиг. 7 продемонстрирован алгоритм обработки изображений, используемый для детекции областей, представляющих интерес (ROI), которые характеризуются высокими значениями отношения флуоресценции и/или интенсивности флуоресценции в пределах изображения отношения флуоресценции.

[20] На Фиг. 8А-Фиг. 8В показаны примеры данных интенсивности флуоресценции в случае изображений биологических образцов из исследования с повышением дозы у человека, в котором проводили инфузию SDM-25 (также обозначаемой как AVB-620).

[21] На Фиг. 9 показаны примеры данных, которые указывают, что логометрическая визуализация флуоресценции с помощью SDM-25 может дифференцировать злокачественную (положительную) и незлокачественную (отрицательную) ткань у пациентов с раком молочной железы. Представлены данные из первичной опухоли и лимфатических узлов. Планки погрешностей обозначают стандартные отклонения.

[22] На Фиг. 10 изображен алгоритм обработки изображений, используемый для детекции областей, представляющих интерес (ROI), и получения прогноза биологической активности (например, повышенной ферментативной активности) в биологических образцах, которые были инфузирваны логометрическим флуоресцентным индикатором, например, SDM-25. Прогноз положительной или отрицательной оценки получают для определенной комбинации порога отношения интенсивности флуоресценции (например, порога отношения интенсивности флуоресценции  $Cy5/Cy7$ ) и/или порога интенсивности флуоресценции (например, порога интенсивности флуоресценции  $Cy5$ ).

[23] На Фиг. 11 изображен алгоритм обработки изображений, используемый для определения положительного или отрицательного прогноза биологической активности (например, повышенной ферментативной активности) в биологических образцах, которые были инфузирваны логометрическим флуоресцентным индикатором, например, SDM-25. Определение положительной или отрицательной активности получают для определенной комбинации порога отношения флуоресценции (например, порога отношения флуоресценции  $Cy5/Cy7$ ) и/или порога интенсивности флуоресценции (например, порога интенсивности флуоресценции  $Cy5$ ).

[24] На Фиг. 12 изображен один неограничивающий пример алгоритма обработки изображений, используемый для детекции наиболее точной комбинации порогов отношения и/или интенсивности флуоресценции с целью определения наличия биологической активности (например, повышенной ферментативной активности) в биологических образцах, которые были инфузирваны логотметрическим флуоресцентным индикатором, например, SDM-25. В указанном примере один порог (т.е., порог отношения флуоресценции или порог интенсивности флуоресценции) варьирует, в то время как другой поддерживается фиксированным с целью получения наиболее точного порога на основе сравнения данных визуализации с данными лабораторного исследования при патологии (или другими независимыми определениями биологической активности) для совокупности биологических образцов. Кривую зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) получают с помощью сравнения прогнозов на основе анализа изображений при различных порогах отношения и/или интенсивности флуоресценции, например, с результатами лабораторного исследования при патологии.

[25] На Фиг. 13А-Фиг. 13С представлены примеры кривых ROC в случае образца первичной опухоли от пациентов-людей, инфузирванных SDM-25, полученных с помощью различных комбинаций порога отношения флуоресценции и порога интенсивности флуоресценции.

[26] На Фиг. 14А-Фиг. 14В представлены примеры кривых ROC в случае образцов лимфатических узлов от пациентов-людей, инфузирванных SDM-25, полученных с помощью различных комбинаций порога отношения флуоресценции и порога интенсивности флуоресценции.

[27] На Фиг. 15А-Фиг. 15С представлены примеры кривых ROC в случае образцов отдельных пациентов, инфузирванных SDM-25, и полученных с помощью различных комбинаций порога отношения флуоресценции и порога интенсивности флуоресценции.

[28] На Фиг. 16 представлены примеры изображений образцов первичной опухоли в поперечном разрезе от пациентов, которым вводили дозу SDM-25 в количестве 8 мг, при этом визуализацию выполняли через день после инфузии. Белый цвет обозначает порог отношения флуоресценции  $Cy5/Cy7 R \geq 120$  и порог интенсивности  $Cy5 I \geq 50$ . Пороговые значения определяли с помощью описанных способов.

[29] На Фиг. 17А-Фиг. 17D представлена схематическая иллюстрация модели метастатического поражения лимфатического узла и протокол диагностической визуализации *in vivo*. Клетки рака молочной железы имплантируют в ухо мыши и метастазируют в шейные лимфатические узлы (Фиг. 17А). С целью оценки статуса

лимфатического узла SDM-25 (AVB-620) вводят с помощью инъекции в хвостовую вену и через 3-6 часов область шеи выводят в результате хирургического вмешательства (**Фиг. 17B**) и лимфатические узлы визуализируют. Изображение отношения флуоресценции получают и отображают наложенным на изображение белого света с помощью шкалы RGB, при этом высокое отношение флуоресценции представлено красным цветом, а низкое отношение флуоресценции представлено синим цветом, пример показан на **Фиг. 17C**. Затем узлы хирургически удаляют и обрабатывают для гистопатологического анализа с использованием H&E (**Фиг. 17D**). Результаты при патологии непосредственно сравнивают со значениями отношения изображения с использованием шкалы RGB, при этом красный цвет обозначает высокое отношение. Стрелка красного цвета обозначает метастатическое поражение (положительное в отношении рака) шейного лимфатического узла, меченого SDM-25 (AVB-620). Стрелки бирюзового цвета обозначают отрицательные в отношении рака шейные лимфатические узлы, определенные с помощью гистопатологического анализа.

**[30]** На **Фиг. 18A-Фиг. 18D** показано сравнение изображения отношения флуоресценции и гистопатологического анализа с использованием модели метастатического поражения лимфатических узлов при раке молочной железы у мышей 4T1. **Фиг. 18A**: Иллюстративные черно-белые дорсальные изображения мыши с наличием (справа) и без наличия (слева) наложенного изображения отношения флуоресценции, демонстрирующие высокое отношение флуоресценции в первичной опухоли в ухе мыши. **Фиг. 18B**: SDM-25 (AVB-620) приводила к образованию значений отношения флуоресценции для шейных лимфатических узлов, классифицируемых в зависимости от опухолевого статуса, определенного на основе гистопатологического анализа с использованием H&E. Показаны положительные в отношении рака (ромбы красного цвета) и отрицательные в отношении рака (ромбы синего цвета) лимфатические узлы. Линии черного цвета показывают среднее  $\pm$  95% доверительный интервал. **Фиг. 18C**: Иллюстративное изображение отношения флуоресценции выведенных лимфатических узлов, объединенное с изображением отраженного света, выполненное через 6 часов после введения SDM-25 (AVB-620). Указанное отношение отображено с помощью шкалы RGB, при этом высокое отношение обозначено красным цветом, а низкое отношение обозначено синим цветом. Стрелки красного и бирюзового цвета обозначают положительные и отрицательные в отношении рака лимфатические узлы, определенные с помощью окрашивания с использованием H&E. **Фиг. 18D**: Показана кинетика образования диагностического сигнала флуоресценции SDM-25 (AVB-620) *in vivo*. Визуализацию осуществляли во временные точки, варьирующие от 1 часа до 48

часов после введения. Показаны положительные в отношении рака (ромбы красного цвета) и отрицательные в отношении рака (ромбы синего цвета) лимфатические узлы. Число измерений (N) на точку данных варьировало от 3 до 24, а планки погрешностей обозначают стандартные отклонения.

**[31] На Фиг. 19А** представлен первый пример границ поверхности изображений образцов после первичной лампэктомии от пациентов, которым вводили дозу SDM-25 в количестве 8 мг, при этом визуализацию выполняли через день после инфузии.

**[32] На Фиг. 19В** представлен второй пример границ поверхности изображений образцов после первичной лампэктомии от пациентов, которым вводили дозу SDM-25 в количестве 8 мг, при этом визуализацию выполняли через день после инфузии.

### **Подробное раскрытие изобретения**

**[33]** Логометрическая детекция флуоресценции и детекция флуоресценции одной интенсивности представляют собой методики для применения в областях визуализации *in vitro* и *in vivo*. В некоторых случаях измерения излучения флуоресценции при одних длинах волн нарушаются вследствие того, что различные ткани характеризуются различной морфологией, толщиной, клеточным составом и внеклеточным матриксом. Логометрическая детекция флуоресценции использует комбинацию флуоресцентных средств или индикаторов, которые приводят к образованию логометрического изменения при двух различных длинах волн в ответ на специфическую биологическую активность. В некоторых случаях было показано, что указанная методика приводит к снижению артефактов вследствие ряда экспериментальных факторов, в том числе, например, различий в концентрации флуорофоров, движения субъекта и вариабельности интенсивностей возбуждающего света и/или эффективностей получения и детекции излучения флуоресценции в случае различных детекторов и инструментов флуоресценции.

**[34]** В данном документе раскрыты в соответствии с определенными вариантами осуществления логометрические способы визуализации флуоресценции с целью детекции и визуализации биологической активности в биологических образцах *in vivo* и *ex vivo*. В некоторых случаях логометрические способы визуализации флуоресценции, описанные в данном документе, характеризуются повышенной точностью по отношению к способу визуализации, описанному в данной области техники. В некоторых случаях повышение точности достигается с помощью применения специфических логометрических флуоресцентных индикаторов, которые обеспечивают более высокую дифференциацию между областями биологического образца, которые характеризуются биологической

активностью, представляющей интерес, и областями, которые не характеризуются такой активностью. Например, как будет описано более подробно далее, в некоторых случаях повышение точности детекции и визуализации областей биологической активности (например, повышенной протеазной активности) достигают с помощью применения логометрических активируемых проникающих пептидов (RACPP), которые содержат фрагмент донора флуоресценции и акцептора флуоресценции. Одним неограничивающим примером последнего является SDM-25 (также обозначаемый AVB-620), как будет более подробно описано далее.

**[35]** В некоторых случаях повышение точности детекции и визуализации областей биологической активности достигается с помощью применения алгоритмов обработки изображений, раскрытых в данном документе, с целью получения и отображения изображений отношения флуоресценции и областей, представляющих интерес (ROI), соответствующих областям в пределах биологического образца, подлежащим визуализации, которые характеризуются специфической биологической активностью или структурой, представляющей интерес. В некоторых примерах ROI получают на основе изображений отношения флуоресценции. В некоторых примерах ROI получают на основе комбинации изображений отношения флуоресценции и/или изображений интенсивности флуоресценции.

**[36]** В некоторых случаях повышение точности детекции и визуализации областей биологической активности достигают с помощью применения как специфических логометрических флуоресцентных индикаторов, которые обеспечивают более высокую дифференциацию, так и раскрываемых алгоритмов обработки изображений с целью получения и отображения изображений отношения флуоресценции и ROI.

**[37]** Примеры биологической активности, которые выявляют и визуализируют с помощью раскрываемых логометрических методик визуализации, включают в себя без ограничения изменения концентрации ионов (например, накопление или высвобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , или изменения локального значения pH), изменения трансмембранного потенциала возбудимых клеток, областей повышенной протеазной активности или любую их комбинацию. В некоторых случаях биологическая активность, подлежащая детекции и визуализации, коррелирует с различными патологическими состояниями, например, артритом, атеросклерозом, раком, раком молочной железы, предраком, злокачественной тканью, коагуляцией (свертыванием крови), воспалением или любой их комбинацией.

**[38]** В некоторых примерах раскрываемые способы визуализации и обработки изображений используют для визуализации ROI в реальном времени. В некоторых примерах указанные способы используют во время хирургического вмешательства. В

некоторых примерах указанные способы используют с целью направления хирургического удаления ткани. В некоторых примерах ткань, подлежащая удалению, представляет собой раковую ткань. В некоторых примерах указанные способы используют во время эндоскопической процедуры. В некоторых примерах указанные способы используют с целью направления расположения эндоскопа или с целью направления хирургического удаления ткани в минимально инвазивной хирургической процедуре. В некоторых примерах эти способы используют для визуализации ROI *ex vivo*. Как отмечено выше, в некоторых примерах указанные способы используют с активируемыми проникающими пептидами (ACPP), которые содержат донор флуоресценции и акцептор флуоресценции (т.е., логометрические ACPP). В некоторых примерах указанные способы используют с SDM-25. В некоторых примерах указанные способы используют у пациентов с раком молочной железы или с тканью, удаленной от указанных пациентов.

**[39] Определения**

**[40]** Если не указано иное, все технические термины, используемые в данном документе, имеют такое же самое значение, которое обычно понимается специалистом в данной области, к которой принадлежит настоящее раскрытие. Используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если контекст явное не указывает иное. Любая ссылка на «или» в данном документе предусматривает включение в себя «и/или», если не указано иное.

**[41]** Используемый в данном документе термин «биологический образец» включает в себя без ограничения образцы культивируемых клеток, первичные образцы тканей (например, образцы тканей, в которых внеклеточный матрикс был переварен или растворен с целью высвобождения отдельных клеток в суспензию), образцы крови или их фракции, образцы тканей *ex vivo* (например, образцы биоптатов или вырезанные хирургические образцы), образцы тканей *in vivo* (например, опухолевая ткань или пограничная ткань, выведенная во время хирургической процедуры) и т.п. Биологические образцы могут быть получены из любого из множества организмов, например, прокариотов, эукариотов, грибов, растений, животных или людей. В некоторых случаях биологические образцы представляют собой образцы пациента.

**[42]** Используемый в данном документе термин «биологическая активность» включает в себя без ограничения изменения концентрации ионов или активности транспорта (например, накопление или высвобождение ионов  $Ca^{2+}$ , или изменения локального значения pH), изменения трансмембранного потенциала возбудимых клеток, областей

повышенной протеазной активности, изменения других биохимических или физиологических процессов, которые могут быть отслежены с помощью логометрических флуоресцентных индикаторов, или любую их комбинацию.

**[43]** Используемые в данном документе термины «логометрический флуоресцентный индикатор» (или «логометрический флуоресцентный зонд») и «логометрическая визуализация флуоресценции» используются в широком смысле с целью включения не только применения стандартных логометрических индикаторов (например, зондов на основе резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET)) и ассоциированных методик визуализации, но также, например, и случаев, в которых используется комбинация из двух или больше флуорофоров (например, флуорофоров, которые не способны к спариванию при FRET), при этом один флуорофор выступает в качестве внутреннего контроля и по меньшей мере один флуорофор выступает в качестве индикатора биологической активности, представляющей интерес. В некоторых случаях логометрический флуоресцентный индикатор представляет собой визуализирующее средство, например, для применения в областях визуализации *in vivo*.

**[44]** Используемый в данном документе термин «длина волны возбуждения» относится к длине волны света, используемого для возбуждения флуоресцентного индикатора (например, молекулы флуорофора или красителя) и получения флуоресценции. Несмотря на то, что длина волны возбуждения в типичном случае определяется в виде одной длины волны, например, 620 нм, специалистам в данной области техники будет понятно, что указанное описание относится к диапазону длин волн или полосе пропускания фильтра возбуждения, который центрирован по отношению к определенной длине волны. В некоторых случаях свет определенной длины волны возбуждения содержит свет определенной длины волны  $\pm 2$  нм,  $\pm 5$  нм,  $\pm 10$  нм,  $\pm 20$  нм,  $\pm 40$  нм,  $\pm 80$  нм или больше. В некоторых случаях используемая длина волны возбуждения может совпадать или может не совпадать с максимумом пика поглощения флуоресцентного индикатора.

**[45]** Используемый в данном документе термин «длина волны излучения» относится к длине волны света, излучаемого флуоресцентным индикатором (например, молекулой флуорофора или красителя) при возбуждении светом соответствующей длины волны. Несмотря на то, что длина волны излучения в типичном случае определяется в виде одной длины волны, например, 670 нм, специалистам в данной области техники будет понятно, что указанное описание относится к диапазону длин волн или полосе пропускания фильтра излучения, который центрирован по отношению к определенной длине волны. В некоторых случаях свет определенной длины волны излучения содержит свет определенной длины волны  $\pm 2$  нм,  $\pm 5$  нм,  $\pm 10$  нм,  $\pm 20$  нм,  $\pm 40$  нм,  $\pm 80$  нм или больше.

**[46]** Используемый в данном документе термин «реальное время» относится к частоте, при которой данные визуализации флуоресценции получают, обрабатывают и/или отображают таким образом, что информация используется, например, хирургом во время хирургической процедуры с целью направления удаления патологической ткани. Как правило, термин «реальное время», используемый в данном документе, относится к частоте обновления в случае получения, обработки и/или отображения изображений, составляющей по меньшей мере 0,5 Гц, по меньшей мере 1 Гц, по меньшей мере 5 Гц, по меньшей мере 10 Гц, по меньшей мере 20 Гц, по меньшей мере 30 Гц, по меньшей мере 40 Гц, по меньшей мере 50 Гц, по меньшей мере 60 Гц, по меньшей мере 70 Гц, по меньшей мере 80 Гц, по меньшей мере 90 Гц или по меньшей мере 100 Гц.

**[47]** Термин «хирургическое вмешательство», используемый в данном документе, относится к любому способу, который используется для исследования, манипуляции, изменения или оказания эффекта в ткани в результате хирургического вмешательства. Указанные способы включают в себя без ограничения открытое хирургическое вмешательство, эндоскопическое хирургическое вмешательство, лапароскопическое хирургическое вмешательство, минимально инвазивное хирургическое вмешательство, роботизированное хирургическое вмешательство и любые процедуры, которые нарушают раковую ткань, такие как резекция опухоли, абляция раковой ткани, стадирование рака, диагностика рака, стадирование лимфатических узлов, детекция сторожевых лимфатических узлов или лечение рака.

**[48]** Термин «направленное хирургическое вмешательство», используемый в данном документе, относится к любой хирургической процедуре, при которой хирург использует визуализирующее средство с целью направления хирургического вмешательства.

**[49]** Термин «рак», используемый в данном документе, относится к любому заболеванию, включающему неконтролируемый рост или пролиферацию клеток в организме человека. Разновидности рака могут дополнительно быть охарактеризованы по способности клеток мигрировать из исходного очага и распространяться в удаленные очаги (т.е., метастазировать). Разновидности рака могут представлять собой саркомы, карциномы, лимфомы, лейкозы, бластомы или опухоли зародышевых клеток. Разновидности рака могут возникать в ряде тканей, в том числе без ограничения легком, молочной железе, яичниках, толстом кишечнике, пищеводе, прямой кишке, кости, предстательной железе, головном мозге, поджелудочной железе, мочевом пузыре, почке, печени, клетках крови, лимфатических узлах и желудке.

**[50]** Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Указанные

термины применяются в отношении встречающихся в природе полимеров аминокислот, а также полимеров аминокислот, в которых одна или несколько аминокислотных остатков представляют собой не встречающуюся в природе аминокислоту (например, аналог аминокислоты). Указанные термины включают в себя аминокислотные цепи любой длины, в том числе полноразмерные белки (т.е., антигены), при этом аминокислотные остатки связаны с помощью ковалентных пептидных связей.

**[51]** Если в данном документе предусмотрена аминокислотная последовательность, также предусмотрены L-, D- или бета-аминокислотные версии последовательности, а также ретро-, инверсные и ретро-инверсные изоформы. Пептиды также включают в себя полимеры аминокислот, в которых одна или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также встречающихся в природе полимеров аминокислот. Помимо этого, указанный термин применяется в отношении аминокислот, связанных с помощью пептидной связи или с помощью других модифицированных связей (например, если пептидная связь замещена  $\alpha$ -сложным эфиром,  $\beta$ -сложным эфиром, тиоамидом, фосфонамидом, карбаматом, гидроксилатом и т.п. (см., например, Spatola, (1983) *Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins* 7: 267-357), при этом амид замещен насыщенным амином (см., например, Skiles et al., патент США № 4496542, который включен в данный документ с помощью ссылки, и Kaltenbronn et al., (1990) Pp. 969-970 in *Proc. 11th American Peptide Symposium*, ESCOM Science Publishers, The Netherlands, и т.п.)).

**[52]** Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые с помощью генетического кода, а также такие аминокислоты, которые позже модифицируются, например, гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксихлутамат и O-фосфосерин. Аминокислоты классифицируют как гидрофобные аминокислоты, полярные аминокислоты, неполярные аминокислоты и заряженные аминокислоты. Гидрофобные аминокислоты включают в себя малые гидрофобные аминокислоты и большие гидрофобные аминокислоты. Малые гидрофобные аминокислоты могут представлять собой глицин, аланин, пролин и их аналоги. Большие гидрофобные аминокислоты могут представлять собой валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, метионин, триптофан и их аналоги. Полярные аминокислоты могут представлять собой серин, треонин, аспарагин, глутамин, цистеин, тирозин и их аналоги. Неполярные аминокислоты могут представлять собой глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин и их аналоги.

Заряженные аминокислоты могут представлять собой лизин, аргинин, гистидин, аспарат, глутамат и их аналоги. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые характеризуются той же самой основной химической структурой, что и встречающаяся в природе аминокислота, т.е.,  $\alpha$ -углеродом, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, однако сохраняют ту же самую основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, однако которые функционируют аналогично встречающейся в природе аминокислоте. Аминокислоты представляют собой либо D-аминокислоты, либо L-аминокислоты.

[53] В некоторых случаях такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по настоящему изобретению.

#### [54] *Логометрическая визуализация флуоресценции*

[55] Логометрическую визуализацию флуоресценции широко использовали для ряда измерений, в том числе измерений внутриклеточной концентрации ионов, потенциалов клеточных мембран и динамики внутриклеточных значений pH в реальном времени. Как отмечено выше, методики логометрической визуализации устраняют некоторые из ограничений, характерные для применения измерений интенсивности флуоресценции в случае количественной оценки (например, вариаций концентрации флуоресцентного индикатора, вариаций интенсивности возбуждающего света или эффективности получения и детекции излучений флуоресценции между различными инструментами, а также дополнительных проблем в случае визуализации *in vivo* вследствие того, что ткани характеризуются различной морфологией, толщиной, клеточным составом и внеклеточным матриксом и т.д.) в результате наблюдения сдвигов длины волны излучения флуоресценции или в результате сравнения интенсивности излучения комбинации флуорофоров, а не отслеживания простых изменений интенсивности.

[56] В некоторых случаях логометрический флуоресцентный индикатор представляет собой молекулу, которая возбуждается при одной длине волны возбуждения и которая характеризуется сдвигом длины волны излучения флуоресценции при определении специфической биологической активности, например, при связывании иона или расщеплении протеазой. В указанных случаях ассоциированная логометрическая

методика визуализации флуоресценции предусматривает облучение биологического образца, который инфузироваи индикатором, светом одной длины волны возбуждения и получение изображения флуоресценции при двух различных длинах волн излучения (последовательно или одновременно) с целью создания изображения отношения флуоресценции.

[57] В некоторых случаях логометрический флуоресцентный индикатор представляет собой молекулу, которая излучает флуоресценцию при одной длине волны возбуждения и которая характеризуется сдвигом максимума поглощения при определении специфической биологической активности, например, при связывании иона или расщеплении протеазой. В указанных случаях ассоциированная логометрическая методика визуализации флуоресценции предусматривает облучение биологического образца, который инфузироваи индикатором, светом двух различных длин волн возбуждения и последовательное получение изображения флуоресценции при одной длине волны излучения с целью создания изображения отношения флуоресценции.

[58] В некоторых случаях «логометрический флуоресцентный индикатор» представляет собой совокупность двух или больше флуорофоров, один из которых выступает в качестве внутреннего контроля (например, для отслеживания концентрации красителей или биологического процесса исходного уровня), и один или несколько из которых выступают в качестве индикаторов биологической активности, представляющей интерес. В указанных случаях ассоциированная логометрическая методика визуализации флуоресценции предусматривает облучение биологического образца, который инфузироваи совокупностью двух или больше флуорофоров, светом двух или больше различных длин волн возбуждения и последовательное получение изображения флуоресценции при двух или больше различных длинах волн излучения с целью создания одного или нескольких изображений отношения флуоресценции.

### [59] *Логометрические флуоресцентные индикаторы*

[60] Ряд логометрических флуоресцентных индикаторов был разработан для отслеживания внутриклеточных концентраций ионов, потенциалов клеточных мембран, протеазных активностей и других биологических процессов. Примеры включают в себя без ограничения индикаторы кальция Indo-1, Fura-2, Fura-4F, Fura-6F, Fura-FF и Fura-Red (или Fluo-3 и Fura Red, используемые в комбинации) (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс); pH-индикаторы SNARF, Oregon Green и BCECF (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс); индикаторы мембранной поляризации Di-4-ANEPPS, Di-8-ANEPPS, Di-2-ANEPEQ, JC-1 и JC-9 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) (см.

также Gonzalez, J.E. and Tsien, R.Y. (1997), “Improved Indicators of Cell Membrane Potential that use Fluorescence Resonance Energy Transfer”, *Chemistry & Biology* 4:269-277); и логометрические субстраты ферментов, меченые донором флуоресценции и акцептором флуоресценции, например, логометрические индикаторы протеазной активности HIV-1 (Jin, *et al.* (2011), “Visualization of HIV Protease Inhibition Using a Novel FRET Molecular Probe”, *Biotechnol Prog.* 27(4): 1107–1114), активностей матриксной металлопротеиназы MMP-7 и других матриксных металлопротеиназ (T. Jiang, *et al.* (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17867 – 17872; Scherer, *et al.* (2008), *Optical Imaging of Matrix Metalloproteinase-7 Activity In vivo Using a Proteolytic Nanobeacon*”, *Mol Imaging.* 7(3):118–131; Olson, *et al.* (2009) *Integr. Biol.* 1:382-393), эластазной активности (Whitney, *et al.*, (2010), *J. Biol. Chem.* 285:22532 – 22541), тромбиновой активности (Whitney, *et al.* (2013), “Ratiometric Activatable Cell-Penetrating Peptides Provide Rapid *In vivo* Readout of Thrombin Activation”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 325 –330) и активации каспазы-3 (Mizukami, S. *et al.* (1999), “Imaging of Caspase-3 Activation in HeLa Cells Stimulated with Etoposide Using a Novel Fluorescent Probe”, *FEBS Lett.* 453, 356-360).

**[61] Логометрические флуоресцентные индикаторы на основе резонансного переноса энергии флуоресценции**

**[62]** Некоторые логометрические флуоресцентные индикаторы основаны на механизме резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) с целью придания им восприимчивости к специфической биологической активности, представляющей интерес. Субстраты флуорогенных ферментов для отслеживания протеазной активности, например, представляют собой любой класс флуоресцентных индикаторов, которые часто основаны на механизме FRET, и в типичном случае представляют собой короткую пептидную последовательность или линкер (например, пептидную последовательность, которая соответствует всей или части последовательности нативного субстрата для определенной протеазы), которые метят на одном конце флуорофором (например, донором флуоресценции), а на другом конце гасителем флуоресценции (например, акцептором флуоресценции). Гаситель флуоресценции в отдельности может представлять собой или может не представлять собой флуорофор. В интактном зонде на основе FRET донор и гаситель флуоресценции удерживают в непосредственной близости друг от друга, например, в типичном случае разделенными друг с другом на менее чем приблизительно 100 Å. Помимо требования того, чтобы спектр излучения донора флуоресценции перекрывал спектр поглощения гасителя флуоресценции, эффективность процесса резонансного переноса энергии флуоресценции является крайне восприимчивой к разделительному расстоянию  $I$  и пропорциональной  $1/R^6$ . Расщепление линкера,

разделяющего донор и гаситель, протеазой подавляет эффективность процесса переноса энергии, тем самым приводя к повышению интенсивности излучения донора флуоресценции и снижению или устранению излучения акцептора флуоресценции (в случаях, если акцептор представляет собой флуорофор, что является типичным для логометрических зондов). Отслеживается изменение интенсивности флуоресценции (при длинах волн излучения как для донора, так и для акцептора в случае логометрических зондов) и оно коррелирует с протеазной активностью.

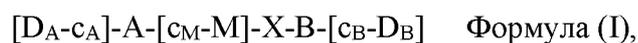
**[63] Логометрические активируемые проникающие пептиды (RACPP)**

**[64]** Активируемые проникающие пептиды (ACPP; также обозначаемые как «молекулы для селективной доставки» (SDM)) представляют собой молекулы, которые способны к целевой доставке различных грузов, в том числе флуоресцентных красителей или других визуализирующих средств, к участкам протеазной активности *in vivo* (Whitney, *et al.* (2013), “Ratiometric Activatable Cell-Penetrating Peptides Provide Rapid *In vivo* Readout of Thrombin Activation”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 325 –330; Liu, *et al.*, WO 2013/019681 A2). ACPP состоят из поликатионного проникающего пептида, присоединенного к грузу, и полианионного ингибирующего домена с расщепляемым протеазой линкером. Активация зонда и захват груза зависит от локализованного протеолиза линкерной последовательности, которая соединяет полианионные и поликатионные домены, которая превращает зонд в присоединяемую форму. Указанный способ предусматривает детекцию пространственно локализованной ферментативной активности в живых тканях в результате накопления расщепляемого зонда. Ранее были описаны ACPP, которые целенаправленно воздействуют на матриксные металлопротеиназы (ММП) и эластазы в опухолях, и активацию тромбина при атеросклерозе и повреждении головного мозга.

**[65]** Логометрические активируемые проникающие пептиды (RACPP) представляют собой ACPP, которые дополнительно содержат фрагменты донора и акцептора флуоресценции, с целью обеспечения логометрического считывания данных зависящего от FRET излучения в случае отслеживания протеазной активности в реальном времени (Whitney, *et al.* (2013), “Ratiometric Activatable Cell-Penetrating Peptides Provide Rapid *In vivo* Readout of Thrombin Activation”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 325 –330), а также получения значительных преимуществ по сравнению с зондами с одной длиной волны излучения в случае визуализации *in vivo*. Например, FRET от Cy5 к Cy7 в пределах ACPP предусматривает значительное улучшение по сравнению с ACPP на основе изменения интенсивности или зондами для гашения флуоресценции в результате устранения необходимости отмывки с целью получения контраста в участке расщепления, а также устранения многих неферментативных факторов, которые приводят к нарушению

измерений интенсивности при полосах излучения с использованием одной длины волны. Другие преимущества включают в себя значительный спектроскопический сдвиг, который возникает при ферментативном расщеплении зонда, а также превращение диффундирующего субстрата в адгезивный продукт, который остается локализованным в участке расщепления с целью придания повышенного пространственного разрешения. Шпилькообразная структура удерживает Cy5 и Cy7 (или другие пары донор-акцептор) на расстоянии, которое обеспечивает эффективный FRET. Расщепление зонда приводит к значительному изменению (примерно в 40 раз в случае меченого Cy5/Cy7 RACPP при активации тромбина, описанной Whitney, *et al.* (2013)) при отношении излучения вне зависимости от последовательности субстрата или фермента, подлежащих определению.

**[66]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления RACPP (или логометрические зонды на основе SDM), используемые в способах визуализации, раскрываемых в настоящем изобретении, содержат молекулы формулы (I), имеющие структуру:



где

X представляет собой расщепляемый линкер, который расщепляется протеазой;

A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 кислых аминокислотных остатков;

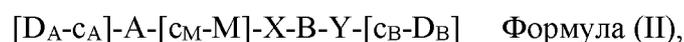
B представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 основных аминокислотных остатков;

каждое из C<sub>A</sub>, C<sub>B</sub> и C<sub>M</sub> независимо содержит 0-1 аминокислоту;

M представляет собой макромолекулу; и

D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub> представляют собой пару фрагментов акцептора и донора флуоресценции, которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции; и при этом [C<sub>M</sub>-M] связан с любым положением на A или X, [D<sub>A</sub>-C<sub>A</sub>] связан с любым аминокислотным остатком A и [C<sub>B</sub>-D<sub>B</sub>] связан с любым аминокислотным остатком B.

**[67]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления RACPP (или логометрические зонды на основе SDM), используемые в способах визуализации, раскрываемых в настоящем изобретении, содержат молекулы формулы (II), имеющие структуру:



где

X представляет собой расщепляемый линкер, который расщепляется протеазой;

Y представляет собой линкер;

A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 кислых аминокислотных остатков;

B представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 основных аминокислотных остатков;

каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит 0-1 аминокислоту;

M представляет собой макромолекулу; и

$D_A$  и  $D_B$  представляют собой пару фрагментов акцептора и донора флуоресценции, которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции; и при этом  $[s_M - M]$  связан с любым положением на A или X,  $[D_A - s_A]$  связан с любым аминокислотным остатком A и  $[s_B - D_B]$  связан с Y.

**[68] Участок A**

**[69]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 2 до 20 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок A содержит от приблизительно 2 до приблизительно 20 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок A содержит от приблизительно 5 до приблизительно 20 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет последовательность, содержащую от 5 до 9 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет последовательность, содержащую от 5 до 8 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет последовательность, содержащую от 5 до 7 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет последовательность, содержащую 5 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет последовательность, содержащую 6 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет последовательность, содержащую 7 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет последовательность, содержащую 8 кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет последовательность, содержащую 9 кислых аминокислот.

**[70]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок A содержит от приблизительно 2 до приблизительно 20 последовательных кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок A содержит от приблизительно 5 до приблизительно 20 последовательных кислых аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления A имеет





некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую 7 глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую 8 глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую 9 глутаматов.

[74] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок А содержит от приблизительно 2 до приблизительно 20 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок А содержит от приблизительно 5 до приблизительно 20 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 9 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 8 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую от 5 до 7 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую 5 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую 6 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую 7 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую 8 последовательных глутаматов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления А имеет последовательность, содержащую 9 последовательных глутаматов.

[75] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок А содержит 5 последовательных глутаматов (т.е., EEEEE или eeeee). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок А содержит 9 последовательных глутаматов (т.е., EEEEEEEEE или eeeeeeee).

[76] Кислый участок А может содержать аминокислоты, которые не являются кислыми. Кислый участок А может содержать другие фрагменты, такие как отрицательно заряженные фрагменты. В соответствии с вариантами осуществления молекулы для селективной доставки, раскрытой в данном документе, кислый участок А представляет собой отрицательно заряженный участок, предпочтительно имеющий от приблизительно 2 до приблизительно 20 отрицательных зарядов при физиологическом значении pH, который не содержит аминокислоту.

[77] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления количество отрицательного заряда в участке А является примерно таким же самым, как и количество положительного заряда в участке В. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления количество отрицательного заряда в участке А не является таким же самым, как и количество положительного заряда в участке В. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления повышенное поглощение тканью наблюдается в случае использования молекулы для селективной доставки, при этом количество отрицательного заряда в участке А не является таким же самым, как количество положительного заряда в участке В. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления повышенное растворение наблюдается в случае использования молекулы для селективной доставки, при этом количество отрицательного заряда в участке А не является таким же самым, как и количество положительного заряда в участке В. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления более быстрое поглощения тканью наблюдается в случае использования молекулы для селективной доставки, при этом количество отрицательного заряда в участке А не является таким же самым, как и количество положительного заряда в участке В. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления повышенное поглощение тканью наблюдается в случае использования молекулы для селективной доставки, при этом количество отрицательного заряда в участке А не является таким же самым, как и количество положительного заряда в участке В.

**[78]** Участок А представляет собой либо L-аминокислоты, либо D-аминокислоты. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения D-аминокислоты являются предпочтительными с целью сведения к минимуму иммуногенности и неспецифического расщепления фоновыми пептидазами или протеазами.

**[79]** Необходимо понимать, что участок А может содержать нестандартные аминокислоты, такие как, например, гидроксизин, десмозин, изодесмозин или другие нестандартные аминокислоты. Участок А может содержать модифицированные аминокислоты, в том числе посттрансляционно модифицированные аминокислоты, такие как, например, метилированные аминокислоты (например, метилгистидин, метилированные формы лизина и т.д.), ацетиловые аминокислоты, амидированные аминокислоты, формилированные аминокислоты, гидроксильные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты или другие модифицированные аминокислоты. Участок А может также содержать фрагменты пептидомиметиков, в том числе участки, связанные с помощью непептидных связей, и аминокислоты, связанные с помощью неаминокислотных участков или с ними.

**[80]** Молекулы для селективной доставки, раскрытые в данном документе, являются эффективными, если А находится на аминоконце или если А находится на карбоксиконце, т.е., допустима любая ориентация пептидных связей.





В содержит 8 аргининов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок В содержит 7 аргининов.

**[87]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок В содержит от приблизительно 5 до приблизительно 20 последовательных аргининов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок В содержит от приблизительно 5 до приблизительно 12 последовательных аргининов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок В содержит от приблизительно 7 до приблизительно 9 последовательных аргининов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок В содержит от приблизительно 7 до приблизительно 8 последовательных аргининов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок В содержит 9 последовательных аргининов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок В содержит 8 последовательных аргининов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидный участок В содержит 7 последовательных аргининов.

**[88]** Основной участок В может содержать аминокислоты, которые не являются основными. Основной участок В может содержать другие фрагменты, такие как положительно заряженные фрагменты. В соответствии с вариантами осуществления основной участок В представляет собой положительно заряженный участок, предпочтительно имеющий от приблизительно 5 до приблизительно 20 положительных зарядов при физиологическом значении pH, который не содержит аминокислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления количество отрицательного заряда в участке А является примерно таким же самым, как и количество положительного заряда в участке В. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления количество отрицательного заряда в участке А не является таким же самым, как и количество положительного заряда в участке В.

**[89]** Участок В представляет собой либо L-аминокислоты, либо D-аминокислоты. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения D-аминокислоты являются предпочтительными с целью сведения к минимуму иммуногенности и неспецифического расщепления фоновыми пептидазами или протеазами. Известно что поглощение клеткой олиго-D-аргининовых последовательностей является практически таким же или более высоким, чем поглощение олиго-L-аргининов.

**[90]** Необходимо понимать, что участок В может содержать нестандартные аминокислоты, такие как, например, гидроксизин, десмозин, изодесмозин или другие нестандартные аминокислоты. Участок В может содержать модифицированные

аминокислоты, в том числе посттрансляционно модифицированные аминокислоты, такие как, например, метилированные аминокислоты (например, метилгистидин, метилированные формы лизина и т.д.), ацетилированные аминокислоты, амидированные аминокислоты, формилированные аминокислоты, гидроксильные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты или другие модифицированные аминокислоты. Участок В может также содержать фрагменты пептидомиметиков, в том числе участки, связанные с помощью непептидных связей, и аминокислоты, связанные с помощью неаминокислотных участков или с ними.

**[91]** В соответствии с вариантами осуществления, в которых X представляет собой пептид, расщепляемый протеазой, предпочтительно связывать С-конец X с N-концом В, таким образом, чтобы новый аминокислотный конец, образованный в результате расщепления X, способствовал дополнительному положительному заряду, который способствует добавлению положительных зарядов, уже присутствующих в В.

**[92]** *Конъюгационная группа (с)*

**[93]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления груз (например, D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub>) и макромолекулярные носители (М) присоединены непрямо к А-Х-В.

**[94]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления груз (например, D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub>) и макромолекулярные носители (М) присоединены непрямо к А-Х-В с помощью конъюгационной группы (с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub>). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления груз (например, D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub>) и макромолекулярные носители (М) присоединены непрямо к А-Х-В с помощью реакционноспособной конъюгационной группы (с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub>). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления груз (например, D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub>) и макромолекулярные носители (М) присоединены непрямо к А-Х-В с помощью ортогонально реакционноспособной конъюгационной группы (с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub>). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо содержит аминокислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо содержит 0-10 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо содержит 1 аминокислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо содержит 2 аминокислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо содержит 3 аминокислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо содержит 4 аминокислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо содержит 5 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо содержит 6 аминокислот. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит 7 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит 8 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит 9 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит 10 аминокислот.

**[95]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит дериватизированную аминокислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления несколько грузов (D) присоединены к конъюгационной группе дериватизированной аминокислоты.

**[96]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгационная группа содержит лиганд рецептора.

**[97]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит встречающуюся в природе аминокислоту или не встречающуюся в природе аминокислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит D-аминокислоту, L-аминокислоту,  $\alpha$ -аминокислоту,  $\beta$ -аминокислоту или  $\gamma$ -аминокислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит любую аминокислоту, имеющую свободную тиоловую группу, любую аминокислоту, содержащую свободную аминогруппу, любую аминокислоту, имеющую N-концевую аминогруппу, и любую аминокислоту с боковой цепью, способной образовывать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит D-цистеин, D-глутамат, лизин и пара-4-ацетил-L-фенилаланин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_B$  содержит любую аминокислоту, имеющую свободную тиоловую группу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_B$  содержит D-цистеин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_A$  содержит любую аминокислоту, имеющую N-концевую аминогруппу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_A$  содержит D-глутамат. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_A$  содержит лизин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_M$  содержит любую аминокислоту с одной цепью, способной образовывать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_M$  содержит пара-4-ацетил-L-фенилаланин.

**[98]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо выбирают из встречающейся в природе аминокислоты или не встречающейся

в природе аминокислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо выбирают из D-аминокислоты, L-аминокислоты,  $\alpha$ -аминокислоты,  $\beta$ -аминокислоты или  $\gamma$ -аминокислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо выбирают из любой аминокислоты, имеющей свободную тиоловую группу, любой аминокислоты, содержащей свободную аминогруппу, любой аминокислоты, имеющей N-концевую аминогруппу, и любой аминокислоты с боковой цепью, способной образовывать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо выбирают из: D-цистеина, D-глутамата, лизина и пара-4-ацетил-L-фенилаланина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_B$  представляет собой любую аминокислоту, имеющую свободную тиоловую группу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_B$  представляет собой D-цистеин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_A$  представляет собой любую аминокислоту, имеющую N-концевую аминогруппу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_A$  представляет собой D-глутамат. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_A$  представляет собой лизин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_M$  представляет собой любую аминокислоту с одной цепью, способной образовывать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидроксиламиновой или гидразиновой группой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $s_M$  представляет собой пара-4-ацетил-L-фенилаланин.

**[99] *Визуализирующие средства (груз)***

**[100]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок груза (D) молекулы для селективной доставки содержит визуализирующее средство, например, флуорофор или краситель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления визуализирующее средство представляет собой флуоресцентный фрагмент. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления флуоресцентный фрагмент выбирают из флуоресцентного белка, флуоресцентного пептида, флуоресцентного красителя, флуоресцентного вещества или их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления визуализирующее средство содержит комбинацию флуоресцентных фрагментов (например,  $D_A$  и  $D_B$ ), присоединенных к одной и той же молекуле для селективной доставки.

**[101]** Все флуоресцентные фрагменты охвачены термином «флуоресцентный фрагмент». Конкретные примеры флуоресцентных фрагментов, приведенные в данном документе, являются иллюстративными и не предусматривают ограничение флуоресцентных

фрагментов для применения с целенаправленно воздействующими молекулами, раскрытыми в данном документе.

**[102]** Примеры флуоресцентных красителей включают в себя без ограничения ксантены (например, родамины, родолы и флуоресцеины, а также их производные); биманы; кумарины и их производные (например, кумарины умбеллиферона и аминометила); ароматические амины (например, дансил; скваратные красители); бензофураны; флуоресцентные цианины; индокарбоцианины; карбазолы; дицианометиленовые пираны; полиметин; оксабензантран; ксантен; пирилий; карбостил; перилен; акридон; хинакридон; рубрен; антрацен; коронен; фенантрецен; пирен; бутадиен; стильбен; порфирин; фталоцианин; хелатные комплексы лантанидных металлов; хелатные комплексы редкоземельных металлов; и производные таких красителей.

**[103]** Примеры флуоресцеиновых красителей включают в себя без ограничения 5-карбоксифлуоресцеин, флуоресцеин-5-изотиоцианат, флуоресцеин-6-изотиоцианат и 6-карбоксифлуоресцеин.

**[104]** Примеры родаминовых красителей включают в себя без ограничения тетраметилродамин-6-изотиоцианат, 5-карбокситетраметилродамин, 5-карбокситетраметилродамин, тетраметил- и тетраэтилродамин, дифенилметил- и дифенилдиэтилродамин, динафтилродамин, родамин 101 сульфонила хлорид (продаваемый под торговой маркой TEXAS RED®).

**[105]** Примеры цианиновых красителей включают в себя без ограничения Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, IR Dye680, Alexa Fluor 750, IR Dye800CW, ICG.

**[106]** Примеры флуоресцентных пептидов включают в себя GFP (зеленый флуоресцентный белок) или производные GFP (например, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalama1, ECFP, Cerulean, CyPet, YFP, Citrine, Venus, Ypet).

**[107]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления визуализирующее средство представляет собой флуорофор ближней инфракрасной области спектра в случае визуализации ближней инфракрасной области спектра (ближней ИК-области спектра), люциферазу (светлячка, бактериальную или кишечнорастворимую) или другую люминесцентную молекулу в случае биолюминесцентной визуализации, или заполненную перфторуглеродом везикулу в случае ультразвукового анализа.

**[108]** В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления РАССР или логометрические SDM по настоящему раскрытию метят парой донор-акцептор флуоресценции. Примеры подходящих пар донор-акцептор флуоресценции включают в себя без ограничения флуоресцеин/родамин, флуоресцеин/Cy5, родамин/Cy5, Cy5/Cy7, Cy5/IR Dye750, Cy5/IR Dye800, Cy5/ICG и т.д. Cy5 и Cy7 представляют собой один

пример предпочтительной пары донор-акцептор флуоресценции, поскольку длинные длины волн  $Cy5$  и  $Cy7$  являются идеальными для визуализации *in vivo*, при этом длины волн возбуждения и излучения должны составлять свыше 600 нм с целью избежания значительного поглощения эндогенных гемов. В случае пары донор-акцептор  $Cy5/Cy7$ , например, возбуждение светом в диапазоне длин волн, составляющем от приблизительно 610 нм до 630 нм (в случае возбуждения  $Cy5$ ), и получение излучения флуоресценции при от приблизительно 660 нм до 720 нм (в случае излучения  $Cy5$ ) и от приблизительно 760 нм до 830 нм (в случае излучения  $Cy7$ ) обеспечивает выполнение точных логометрических измерений, при этом предупреждается интерференция со стороны эндогенных гемов.

**[109] Макромолекулярные носители (M)**

**[110]** Термин «носитель» означает инертную молекулу, которая приводит к модулированию времени полужизни, растворимости или биораспределения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к модулированию времени полужизни молекулы для селективной доставки, раскрываемой в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к модулированию растворимости молекулы для селективной доставки, раскрываемой в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к модулированию биораспределения молекулы для селективной доставки, раскрываемой в данном документе.

**[111]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к снижению поглощения молекулы для селективной доставки нецелевыми клетками или тканями. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к снижению поглощения молекулы для селективной доставки в хрящевую ткань. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к снижению поглощения молекулы для селективной доставки в суставы по отношению к целевой ткани.

**[112]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к повышению поглощения молекулы для селективной доставки нецелевыми клетками или тканями. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к снижению поглощения молекулы для селективной доставки в печень по отношению к целевой ткани. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к снижению поглощения молекулы для селективной доставки в почки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к усилению поглощения в раковую ткань. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления

носитель приводит к усилению поглощения в лимфатические протоки и/или лимфатические узлы.

**[113]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к повышению времени полужизни в плазме крови в результате снижения клубочковой фильтрации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к модулированию времени полужизни в плазме крови в результате повышения или снижения метаболизма или протеазной деградации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к повышению опухолевого поглощения вследствие повышенной проницаемости и удержания (EPR) сосудистой сети опухоли. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель приводит к повышению растворимости в воде молекулы для селективной доставки.

**[114]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любая М независимо прямо или непрямо (например, с помощью *via* см) связывается с А, В или Х. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любая М независимо связывается с А на п-концевом полиглутамате. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любая М независимо связывается с А (или п-концевым полиглутаматом) с помощью ковалентной связи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любая М независимо связывается с В на с-концевом полиаргинине. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любая М независимо связывается с В (или с-концевым полиаргинином) с помощью ковалентной связи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любая М независимо прямо или непрямо связывается с линкерами между Х и А, Х и В, В и С/Н-концом или А и С/Н-концом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ковалентная связь представляет собой эфирную связь, тиоэфирную связь, аминную связь, амидную связь, оксимную связь, углерод-углеродную связь, углерод-азотную связь, углерод-кислородную связь или углерод-серную связь.

**[115]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления М выбирают из белка, синтетического или природного полимера или дендримера. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления М выбирают из декстрана, PEG полимера (например, PEG с молекулярной массой 5 кДа, PEG с молекулярной массой 12 кДа, PEG с молекулярной массой 20 кДа, PEG с молекулярной массой 30 кДа и PEG с молекулярной массой 40 кДа), альбумин или их комбинации.

**[116]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления М представляет собой PEG полимер. В некоторых случаях PEG представляет собой полидисперсное или монодисперсное соединение. В некоторых случаях полидисперсное вещество содержит

дисперсное распределение вещества различной молекулярной массы, характеризующееся средней массой (средневзвешенной) размера и дисперсности. В других случаях PEG представляет собой монодисперсное соединение, которое содержит один размер молекулы.

**[117]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулярная масса PEG составляет приблизительно 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10000, 12000, 20000, 35000, 40000, 50000, 60000 или 100000 Да.

**[0001]** В некоторых случаях М имеет молекулярную массу приблизительно 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10000, 12000, 20000, 35000, 40000, 50000, 60000 или 100000 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 200 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 300 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 400 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 500 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 600 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 700 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 800 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 900 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1000 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1100 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1200 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1300 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1400 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1450 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1500 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1600 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1700 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1800 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 1900 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 2000 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М составляет приблизительно 2100 Да. В некоторых случаях молекулярная масса М



[119] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления М представляет собой дискретный PEG, в котором дискретный PEG представляет собой полимерный PEG, содержащий более одного повторяющегося этиленоксидного звена. В некоторых случаях дискретный PEG (dPEG) содержит от 2 до 60, от 2 до 50 или от 2 до 48 повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 42, 48, 50 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 2 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 3 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 4 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 5 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 6 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 7 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 8 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 9 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 10 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 11 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 12 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 13 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 14 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 15 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 16 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 17 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 18 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 19 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 20 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 22 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 24 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит

приблизительно 26 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 28 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 30 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 35 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 40 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 42 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 48 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG содержит приблизительно 50 или больше повторяющихся этиленоксидных звеньев. В некоторых случаях dPEG синтезируют в виде соединения с одной молекулярной массой из чистого (например, приблизительно 95%, 98%, 99% или 99,5%) исходного вещества поэтапно. В некоторых случаях dPEG имеет определенную молекулярную массу, а не среднюю молекулярную массу. В некоторых случаях dPEG, описанный в данном документе, представляет собой dPEG от Quanta Biodesign, LMD.

**[120]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с альбумином. В определенных случаях альбумин исключают из клубочкового фильтрата при нормальных физиологических условиях. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула для селективной доставки содержит реакционноспособную группу, такую как малеимид, которая может образовывать ковалентный конъюгат с альбумином. Молекула для селективной доставки, содержащая альбумин, способствует повышенному накоплению расщепляемых молекул для селективной доставки в опухолях зависимым от расщепления образом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгаты альбумина характеризуются эффективными фармакокинетическими свойствами.

**[121]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с PEG полимером. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с PEG полимером с молекулярной массой 500 Да. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с PEG полимером с молекулярной массой 1 кДа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с PEG полимером с молекулярной массой 2 кДа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с PEG полимером с молекулярной массой 5 кДа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной

доставки конъюгируют с PEG полимером с молекулярной массой 10 кДа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с PEG полимером с молекулярной массой 12 кДа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с PEG полимером с молекулярной массой 20 кДа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгаты PEG с молекулярной массой 30 кДа характеризуются более длительным временем полужизни по сравнению со свободными пептидами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулы для селективной доставки конъюгируют с PEG полимером с молекулярной массой 20-40 кДа, который характеризуется печеночным или почечным клиренсом.

[122] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с декстраном. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с декстраном с молекулярной массой 70 кДа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгаты декстрана, которые представляют собой смесь молекулярных масс, сложно синтезировать и очистить воспроизводимым образом.

[123] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют со стрептавидином.

[124] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки конъюгируют с дендримером PAMAM пятого поколения.

[125] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления носитель кэппируют. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кэппирование носителя приводит к улучшению фармакокинетики и снижению цитотоксичности носителя в результате добавления гидрофильности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кэп выбирают из ацетила, сукцинила, 3-гидроксипропионила, 2-сульфобензоила, глицидила, PEG-2, PEG-4, PEG-8 и PEG-12.

[126] *Участок X (линкер)*

[127] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер, состоящий из одной или нескольких аминокислот, используют для соединения пептидной последовательности А (т.е., последовательности, сконструированной с целью ингибирования действия доставки пептида В) и пептидной последовательности В. Как правило, пептидный линкер не будет характеризоваться определенной биологической активностью, отличной от соединения молекул или сохранения некоторого минимального расстояния или другой пространственной связи между ними. В то же время входящие в

состав линкера аминокислоты могут быть выбраны с целью воздействия на некоторое свойство молекулы, такое как фолдинг, суммарный заряд или гидрофобность.

**[128]** В живых клетках интактная молекула для селективной доставки, раскрытая в данном документе, может быть неспособной проникать в клетку в результате присутствия участка А. Таким образом, строго внутриклеточный процесс расщепления X будет неэффективным для расщепления X в здоровых клетках, поскольку участок А, предупреждая поглощения в клетки, не будет эффективно расщепляться внутриклеточными ферментами в здоровых клетках, поскольку он не поглощается и не получает доступ к таким внутриклеточным ферментам. В то же время, если клетка является поврежденной или патологической (например, раковые клетки, гипоксические клетки, ишемические клетки, апоптотные клетки, некротические клетки), такие внутриклеточные ферменты вытекают из клетки и будет происходить расщепление А, способствуя вхождению участка В и/или груза в клетку, воздействуя на целевую доставку участка В и/или груза D в соседние клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется во внеклеточном пространстве.

**[129]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления тот факт, что капилляры часто пропускают жидкость возле опухолей и других травмированных участков, приводит к повышению способности молекул с высокой молекулярной массой (например, молекулярной массой приблизительно 30 кДа или больше) достигать интерстициального компартмента. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетки, которые не экспрессируют соответствующую протеазу, но которые располагаются вблизи экспрессирующих клеток, захватывают груз из молекулы для селективной доставки, поскольку расщепление линкера X в типичном случае является внеклеточным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое второстепенное целенаправленное воздействие является эффективным в лечении опухолей в связи с гетерогенностью клеточных фенотипов и необходимостью устранить как можно больший процент подозрительных клеток.

**[130]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X представляет собой расщепляемый линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X представляет собой линкер, который расщепляется протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X представляет собой линкер, который расщепляется внеклеточной протеазой.

**[131]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер является гибким. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер является жестким.

[132] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит линейную структуру. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит нелинейную структуру. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит разветвленную структуру. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит циклическую структуру.

[133] Линкеры включают в себя без ограничения углеродные линкеры с прямыми или разветвленными цепями, гетероциклические углеродные линкеры, пептидные линкеры или полиэфирные линкеры. Указанные линкеры необязательно имеют амидные связи, сульфгидрильные связи или гетерофункциональные связи.

[134] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет от приблизительно 5 до приблизительно 30 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 6 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 8 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 10 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 12 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 14 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 16 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 18 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 20 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 25 атомов в длину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X составляет приблизительно 30 атомов в длину.

[135] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер связывает пептидный участок А (т.е., пептидную последовательность, которая предупреждает поглощение клеткой) с пептидным участком В (т.е., последовательностью доставки) с помощью ковалентной связи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ковалентная связь представляет собой эфирную связь, тиоэфирную связь, аминную связь, амидную связь, оксимную связь, гидразоновую связь, углерод-углеродную связь, углерод-азотную связь, углерод-кислородную связь или углерод-серную связь.

[136] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X содержит пептидную связь. Пептидная связь содержит L-аминокислоты и/или D-аминокислоты. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения D-аминокислоты являются предпочтительными с целью сведения к минимуму иммуногенности и неспецифического

расщепления фоновыми пептидазами или протеазами. Известно что поглощение клеткой олиго-D-аргининовых последовательностей является практически таким же или более высоким, чем поглощение олиго-L-аргининов.

**[137]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X конструируют с целью расщепления в присутствии определенных условий или в определенной среде. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления линкер X расщепляется при физиологических условиях. Расщепление такого линкера X может, например, усиливаться или может нарушаться в результате определенных патологических сигналов или определенной среды, связанной с клетками, в которые доставка груза является необходимой. Конструирование линкера X с целью расщепления в результате определенных условий, таких как с помощью определенного фермента, обеспечивает целенаправленное воздействие поглощения клеткой в направлении определенного места положения, в котором такие условия получаются. Таким образом, одним важным путем, с помощью которого молекулы для селективной доставки обеспечивают определенное целенаправленное воздействие поглощения клеткой в направлении необходимых клеток, тканей или областей, является конструирование линкерного участка X, который расщепляется в результате наличия условий возле таких целевых клеток, тканей или областей.

**[138]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X представляет собой чувствительный к pH линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется в условиях основных значений pH. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется в условиях кислых значений pH. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется протеазой, матриксной металлопротеиназой или их комбинацией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется с помощью восстанавливающего средства.

**[139]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется с помощью MMP. Гидролитическую активность матриксных металлопротеиназ (MMP) наблюдали при инвазивной миграции метастатических опухолевых клеток. В определенных случаях MMP встречаются возле очагов воспаления. В определенных случаях MMP встречаются возле очагов инсульта (т.е., нарушения, характеризуемого повреждением головного мозга после снижения кровотока). Таким образом, поглощение молекул, характеризующихся свойствами по настоящему изобретению, способно направлять поглощение клеткой груза (по меньшей мере один фрагмент D) в отношении определенных клеток, тканей или областей, имеющих активные MMP во внеклеточной среде. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит

аминокислотные последовательности PLG-C(Me)-AG (SEQ ID NO: 1), PLGLAG (SEQ ID NO: 2), которые расщепляются металлопротеиназными ферментами MMP-2, MMP-9 или MMP-7 (MMP, вовлеченными в рак и воспаление).

**[140]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется протеолитическими ферментами или восстанавливающей средой, которая встречается возле раковых клеток. Такая среда или такие ферменты в типичном случае не встречаются возле нормальных клеток.

**[141]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется сериновыми протеазами, в том числе без ограничения тромбином и катепсинами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется катепсином K, катепсином S, катепсином D, катепсином E, катепсином W, катепсином F, катепсином A, катепсином C, катепсином H, катепсином Z или любыми их комбинациями. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется катепсином K и/или катепсином S.

**[142]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется в тканях, страдающих от гипоксии, или возле них. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления расщепление в гипоксических тканях или возле них способствует целенаправленному воздействию на раковые клетки и раковые ткани, области, пораженные инфарктом, и другие гипоксические области. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X содержит дисульфидную связь. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер, содержащий дисульфидную связь, предпочтительно расщепляется в гипоксических областях и, таким образом, целенаправленно воздействует на доставку груза к клеткам в такой области. Считается, что гипоксия приводит к тому, что раковые клетки становятся более устойчивыми к облучению и химиотерапии, а также инициации ангиогенеза. В гипоксической среде в присутствии, например, пропускающих жидкость или некротических клеток, свободные тиолы и другие восстанавливающие средства становятся доступными внеклеточно, в то время как O<sub>2</sub>, который в обычных условиях поддерживает окисление внеклеточной среды, по умолчанию исчерпывается. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления этот сдвиг окислительно-восстановительного баланса способствует ослаблению и расщеплению дисульфидной связи в пределах линкера X. Помимо дисульфидных связей, которые эффективно используют тиол-дисульфидное равновесие, связи, содержащие хиноны, которые распадаются при восстановлении до гидрохинонов, используются в линкере X, сконструированном с целью расщепления в гипоксической среде.

[143] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется в некротической среде. Некроз часто приводит к высвобождению ферментов или другого клеточного содержимого, которое может быть использовано для активации расщепления линкера X. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления расщепление X некротическими ферментами (например, кальпаинами) способствует тому, что груз поглощается патологическими клетками и соседними клетками, которые еще не полностью пропускают жидкость.

[144] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X представляет собой кислотолабильный линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X содержит ацеталевую или виниловую эфирную связь. Ацидоз наблюдается в очагах поврежденной или гипоксической ткани, вследствие сдвига Варбурга от окислительного фосфорилирования к анаэробному гликолизу и образованию молочной кислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ацидоз используется в качестве пускового сигнала поглощения груза в результате замещения некоторых из аргининов в пределах В гистидинами, которые только приобретают катионные свойства при значении pH, ниже 7.

[145] Необходимо понимать, что линкер, раскрываемый в данном документе, может содержать нестандартные аминокислоты, такие как, например, гидроксизин, десмозин, изодесмозин или другие нестандартные аминокислоты. Линкер, раскрываемый в данном документе, может содержать модифицированные аминокислоты, в том числе посттрансляционно модифицированные аминокислоты, такие как, например, метилированные аминокислоты (например, метилгистидин, метилированные формы лизина и т.д.), ацетилированные аминокислоты, амидированные аминокислоты, формилированные аминокислоты, гидроксильные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты или другие модифицированные аминокислоты. Линкер, раскрываемый в данном документе, может также содержать фрагменты пептидомиметиков, в том числе участки, связанные с помощью непептидных связей, и аминокислоты, связанные с помощью неаминокислотных участков или с ними.

[146] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: PLGLAG, PLG-C(me)-AG, RPLALWRS, ESPAYYTA, DPRSFL, PPRSFL, RLQLKL и RLQLK(Ac). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность PLGLAG. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность PLG-C(me)-AG. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную

последовательность PLGxAG, где x представляет собой любую аминокислоту (встречающуюся в природе или не встречающуюся в природе). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность RPLALWRS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность ESPAYYTA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность DPRSFL. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность PPRSFL. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность RLQLKL. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит аминокислотную последовательность RLQLK(Ac).

[147] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит пептид, выбранный из: PR(S/T)(L/I)(S/T), где буквы в скобках обозначают, что любая одна из указанных аминокислот находится в этом положении в последовательности); GGAANLVRGG; SGRIGFLRTA; SGRSA; GFLG; ALAL; FK; PIC(Et)F-F, при этом C(Et) обозначает S-этилцистеин (цистеин с этильной группой, присоединенной к тиолу) и «-» обозначает типичный сайт расщепления в указанной и последующих последовательностях); GGPRGLPG; HSSKLQ; LVLA-SSSFGY; GVSQNY-PIVG; GVVQA-SCRLA; f(Pip)R-S, где «f» обозначает D-фенилаланин, а «Pip» обозначает пиперидин-2-карбоновую кислоту (пипеколиновую кислоту, аналог пролина, имеющий шестичленное кольцо); DEVD; GWENDG; RPLALWRS или их комбинации.

[148] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется в условиях гипоксии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X содержит дисульфидную связь. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X содержит хинин.

[149] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X расщепляется в некротических условиях. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X содержит молекулу, расщепляемую кальпаином.

[150] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X содержит 6-аминогексаноил, 5-(амино)-3-оксапентаноил или их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления X содержит дисульфидную связь.

[151] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой алкил. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой гетероалкил.

**[152]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой алкилен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой алкенилен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой алкинилен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой гетероалкилен.

**[153]** «Алкильная» группа относится к алифатической углеводородной группе. Алкильный фрагмент может представлять собой насыщенный алкил или ненасыщенный алкил. В зависимости от структуры, алкильная группа может представлять собой монарадикал или дирадикал (т.е., алкиленовую группу).

**[154]** «Алкильный» фрагмент может иметь от 1 до 10 атомов углерода (во всех случаях, когда он появляется в данном документе, числовой диапазон, такой как «от 1 до 10» относится к каждому целому числу в определенном диапазоне; например, «от 1 до 10 атомов углерода» означает, что алкильная группа может состоять из 1 атома углерода, 2 атомов углерода, 3 атомов углерода и т.д., до и включая 10 атомов углерода, хотя настоящее определение также включает в себя возможность термина «алкил», в случае, если не определен числовой диапазон). Алкильная группа может также представлять собой «низший алкил», имеющий от 1 до 6 атомов углерода. Алкильная группа соединений, описанных в данном документе, может быть обозначена как «C1-C4 алкил» или с помощью аналогичных обозначений. Только в качестве примера «C1-C4 алкил» обозначает, что имеется от одного до четырех атомов углерода в алкильной цепи, т.е., алкильную цепь выбирают из: метила, этила, пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила. Типичные алкильные группы включают в себя без никоим образом ограничения метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, третичный бутил, пентил, гексил, этенил, пропенил, бутенил и т.п.

**[155]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит кольцевую структуру (например, арил). Используемый в данном документе термин «кольцо» относится к любой ковалентно замкнутой структуре. Кольца включают в себя, например, карбоциклы (например, арилы и циклоалкилы), гетероциклы (например, гетероарилы и неароматические гетероциклы), ароматические соединения (например, арилы и гетероарилы) и неароматические соединения (например, циклоалкилы и неароматические гетероциклы). Кольца могут быть необязательно замещенными. Кольца могут быть моноциклическими или полициклическими.

**[156]** Используемый в данном документе термин «арил» относится к ароматическому кольцу, в котором каждый из атомов, образующий кольцо, представляет собой атом углерода. Арильные кольца могут быть образованы пятью, шестью, семью, восемью,

девятью или более чем девятью атомами углерода. Арильные кольца могут быть необязательно замещенными. Примеры арильных групп включают в себя без ограничения фенил, нафтаденил, фенантренил, антраценил, флуоренил и инденил. В зависимости от структуры, арильная группа может представлять собой монарадикал или дирадикал (т.е., ариленовую группу).

**[157]** Термин «циклоалкил» относится к моноциклическому или полициклическому неароматическому радикалу, при этом каждый из атомов, образующих кольцо (т.е., скелетные атомы), представляет собой атом углерода. Циклоалкилы могут быть насыщенными или частично ненасыщенными. Циклоалкильные группы включают в себя группы, имеющие от 3 до 10 кольцевых атомов. Циклоалкилы включают в себя без ограничения циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил.

**[158]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кольцо представляет собой циклоалкан. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кольцо представляет собой циклоалкен.

**[159]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кольцо представляет собой ароматическое кольцо. Термин «ароматический» относится к плоскому кольцу, имеющему делокализованную  $\pi$ -электронную систему, содержащую  $4n + 2\pi$  электронов, где  $n$  представляет собой целое число. Ароматические кольца могут быть образованы из пяти, шести, семи, восьми, девяти или более чем девяти атомов углерода. Ароматические соединения могут быть необязательно замещенными. Термин «ароматический» включает в себя как арильные (например, фенил), так и гетероциклические арильные (либо «гетероарильные», либо «гетероароматические») группы (например, пиридин). Указанный термин включает в себя моноциклические или полициклические с сочлененными кольцами (т.е., кольцами, которые имеют общие прилегающие пары атомов углерода) группы.

**[160]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кольцо представляет собой гетероцикл. Термин «гетероцикл» относится к гетероароматическим и гетероциклическим группам, содержащим от одного до четырех гетероатомов, каждый из которых выбирают из O, S и N, при этом каждая гетероциклическая группа имеет от 4 до 10 атомов в своей кольцевой системе, и при условии, что кольцо указанной группы не содержит двух прилегающих атомов O или S. Неароматические гетероциклические группы включают в себя группы, имеющие только 3 атома в своей кольцевой системе, в то время как ароматические гетероциклические группы должны иметь по меньшей мере 5 атомов в своей кольцевой системе. Гетероциклические группы включают в себя

сочлененные с бензольными кольцами системы. Примером 3-членной гетероциклической группы является азиридирил. Примером 4-членной гетероциклической группы является азетидинил (происходящий из азетидина). Примером 5-членной гетероциклической группы является тиазолил. Примером 6-членной гетероциклической группы является пиридил и примером 10-членной гетероциклической группы является хинолинил. Примерами неароматических гетероциклических групп являются пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидротиопиранил, пиперидино, морфолино, тиоморфолино, тиоксанил, пиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, гомопиперидинил, оксепанил, тиепанил, оксазепинил, диазепинил, тиазепинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, индолинил, 2Н-пиранил, 4Н-пиранил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиразолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиранил, дигидротиенил, дигидрофуранил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[3.1.0]гексанил, 3-азабицикло[4.1.0]гептанил, 3Н-индолил и хинолизинил. Примерами ароматических гетероциклических групп являются пиридинил, имидазолил, пиримидинил, пиразолил, триазолил, пиразинил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, оксазолил, изотиазолил, пирролил, хинолинил, изохинолинил, индолил, бензимидазолил, бензофуранил, циннолинил, индазолил, индолизинил, фталазинил, пиридазинил, триазинил, изоиндолил, птеридинил, пуринил, оксадиазолил, тиадиазолил, фуразанил, бензофуразанил, бензотиофенил, бензотиазолил, бензоксазолил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридинил и фуропиридинил. Вышеуказанные группы могут быть С-соединенными или N-соединенными, в случаях, где это возможно. Например, группа, происходящая из пиррола, представляет собой пиррол-1-ил (N-соединенный) или пиррол-3-ил (С-соединенный). Кроме того, группа, происходящая из имидазола, представляет собой имидазол-1-ил или имидазол-3-ил (оба N-соединенные) или имидазол-2-ил, имидазол-4-ил или имидазол-5-ил (все С-соединенные). Гетероциклические группы включают в себя сочлененные с бензольными кольцами и кольцевые системы, замещенные одним или двумя оксо (=O) фрагментами, такими как пирролидин-2-он. В зависимости от структуры, гетероциклическая группа может представлять собой монарадикал или дирадикал (т.е., гетероцикленовую группу).

**[161]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кольцо является сочлененным. Термин «сочлененный» относится к структурам, в которых два или более колец имеют общие одну или несколько связей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кольцо представляет собой димер. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления кольцо представляет собой тример. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кольцо является замещенным.

**[162]** Термин «карбоциклический» или «карбоцикл» относится к кольцу, в котором каждый из атомов, образующих кольцо, представляет собой атом углерода. Карбоцикл включает в себя арил и циклоалкил. Указанный термин, таким образом, дифференцирует карбоцикл от гетероцикла («гетероциклический»), в котором каркас кольца содержит по меньшей мере один атом, который отличается от углерода (т.е., гетероатом). Гетероцикл включает в себя гетероарил и гетероциклоалкил. Карбоциклы и гетероциклы могут быть необязательно замещенными.

**[163]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X является замещенным. Термин «необязательно замещенный» или «замещенный» означает, что референтная группа может быть замещена одной или несколькими дополнительными группами, отдельно и независимо выбранными из C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, арила, гетероарила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> гетероалициклила, гидроксид, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, арилокси, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилтио, арилтио, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилсульфоксида, арилсульфоксида, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилсульфона, арилсульфона, циано, гало, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> ацила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> ацилокси, нитро, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> фторалкила и амино, в том числе C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкиламино, а также их защищенных производных. В качестве примера необязательными заместителями могут быть LsRs, где каждое Ls независимо выбирают из связи, -O-, -C(=O)-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)<sub>2</sub>-, -NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH-, S(=O)<sub>2</sub>NH-, -NHS(=O)<sub>2</sub>-, -OC(=O)NH-, -NHC(=O)O-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила)- или -(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила)-; а каждое Rs независимо выбирают из H, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила), (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила), гетероарила, арила и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> гетероалкила. Необязательно замещенные неароматические группы могут быть замещены одним или несколькими оксо (=O). Защитные группы, которые могут образовывать защитные производные вышеуказанных заместителей, известны специалистам в данной области техники.

**[164]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит нуль-линкер. В некоторых случаях нуль-линкер содержит ковалентную связь. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ковалентная связь представляет собой эфирную связь, тиоэфирную связь, аминную связь, амидную связь, оксимную связь, гидразоновую связь, углерод-углеродную связь, углерод-азотную связь, углерод-кислородную связь или углерод-серную связь.

**[165]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X дополнительно содержит бифункциональный линкер. В некоторых случаях бифункциональный линкер имеет одну функциональную группу, способную реагировать с группой на первой молекуле (например, молекулой для селективной доставки), и вторую функциональную

группу, способную реагировать с группой на второй молекуле (например, визуализирующим грузом). В некоторых случаях бифункциональный линкер представляет собой гомобифункциональный линкер или гетеробифункциональный линкер. В качестве альтернативы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления с целью получения функциональных групп осуществляют дериватизацию. Таким образом, также известны, например, процедуры для получения свободных сульфгидрильных групп на пептидах (см. патент США № 4659839). Линкер X может в качестве альтернативы содержать гетеробифункциональный кросслинкер, содержащий две или больше различных реакционноспособных групп, которые образуют гетероциклическое кольцо, которое может взаимодействовать с молекулой для селективной доставки. Например, гетеробифункциональный кросслинкер, такой как цистеиновый, может содержать аминную реакционноспособную группу и тиоловую реакционноспособную группу, которые могут реагировать с альдегидом на дериватизированной молекуле для селективной доставки. Дополнительные комбинации реакционноспособных групп, подходящих для гетеробифункциональных кросслинкеров, включают в себя, например, аминные и сульфгидрильные реакционноспособные группы; карбонильные и сульфгидрильные реакционноспособные группы; аминные и фотореакционноспособные группы; сульфгидрильные и фотореакционноспособные группы; карбонильные и фотореакционноспособные группы; карбоксилатные и фотореакционноспособные группы; и аргининовые и фотореакционноспособные группы.

**[166]** Иллюстративные гомобифункциональные линкеры включают в себя без ограничения реагент Ломанта (дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP)), 3'3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP)), дисукцинилмидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS), дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-DST), этиленгликобис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), дисукцинимидилглутарат (DSG), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (DSC), диметиладипимидат (DMA), диметилпимелимидат (DMP), диметилсуберимидат (DMS), диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат (DTBP), 1,4-ди-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо)бутан (DPDPB), бисмалеимидогексан (BMH), арилгалоид-содержащее соединение (DFDNB), такое как, например 1,5-дифтор-2,4-динитробензол или 1,3-дифтор-4,6-динитробензол, 4,4'-дифтор-3,3'-динитрофенилсульфон (DFDNPS), бис-[β-(4-азидосалициламидо)этил]дисульфид (BASED), формальдегид, глутаральдегид, 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир, адипиновой кислоты дигидразид, карбогидразид, ортолуидин, 3,3'-диметилбензидин, бензидин, α,α'-п-диаминодифенил, дийод-п-

ксиленсульфоновую кислоту, N,N'-этилен-бис(йодацетамид) или N,N'-гексаметилен-бис(йодацетамид).

[167] Иллюстративные гетеробифункциональные линкеры включают в себя без ограничения аминные реакционноспособные и сульфгидрильные реакционноспособные кросслинкеры, такие как N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (sPDP), длинноцепочечный N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (LC-sPDP), водорастворимый длинноцепочечный N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (сульфо-LC-sPDP), сукцинимидилоксикарбонил- $\alpha$ -метил- $\alpha$ -(2-пиридилдитио)толуол (sMPT), сульфосукцинимидил-6-[ $\alpha$ -метил- $\alpha$ -(2-пиридилдитио)толуамидо]гексаноат (сульфо-LC-sMPT), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sMCC), сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-sMCC), м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид сложный эфир (MBs), м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимид сложный эфир (сульфо-MBs), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат (sIAB), сульфосукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат (сульфо-sIAB), сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (sMPB), сульфосукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (сульфо-sMPB), N-( $\gamma$ -малеимидобутирилокси)сукцинимид сложный эфир (GMBs), N-( $\gamma$ -малеимидобутирилокси)сукцинимид сложный эфир (сульфо-GMBs), сукцинимидил-6-((йодацетил)амино)гексаноат (sIAX), сукцинимидил-6-[6-(((йодацетил)амино)гексаноил)амино]гексаноат (sIAXX), сукцинимидил 4-(((йодацетил)амино)метил)циклогексан-1-карбоксилат (sIAC), сукцинимидил 6-(((4-йодацетил)амино)метил)циклогексан-1-карбонил)амино)гексаноат (sIACX), п-нитрофенилйодацетат (NPIA), карбонильные реакционноспособные и сульфгидрильные реакционноспособные кросслинкеры, такие как 4-(4-N-малеимидофенил)масляной кислоты гидразид (MPBH), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилгидразин-8 (M2C2H), 3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид (PDPH), аминные реакционноспособные и фотореакционноспособные кросслинкеры, такие как N-гидроксисукцинимидил-4-азидосалицилловая кислота (NHs-AsA), N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидосалицилловая кислота (сульфо-NHs-AsA), сульфосукцинимидил-(4-азидосалициламидо)гексаноат (сульфо-NHs-LC-AsA), сульфосукцинимидил-2-( $\rho$ -азидосалициламидо)этил-1,3'-дитиопропионат (sAsD), N-гидроксисукцинимидил-4-азидобензоат (HsAB), N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат (сульфо-HsAB), N-сукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (sANPAH), сульфосукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (сульфо-sANPAH), N-5-азидо-2-нитробензоилсукцинимид (ANB-NOs), сульфосукцинимидил-2-(м-

азидо-о-нитробензамидо)-этил-1,3'-дитиопропионат (sAND), N-сукцинимидил-4(4-азидофенил)1,3'-дитиопропионат (sADP), N-сульфосукцинимидил(4-азидофенил)-1,3'-дитиопропионат (сульфо-sADP), сульфосукцинимидил 4-(p-азидофенил)бутират (сульфо-sAPB), сульфосукцинимидил-2-(7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамид)этил-1,3'-дитиопропионат (sAED), сульфосукцинимидил-7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетат (сульфо-sAMCA), p-нитрофенилдиазопируват (pNPDP), p-нитрофенил-2-диазо-3,3,3-трифторпирипропионат (PNP-DTP), сульфгидрильные реакционноспособные и фотореакционноспособные кросслинкеры, такие как 1-(p-азидосалициламидо)-4-(йодацетамидо)бутан (AsIB), N-[4-(p-азидосалициламидо)бутил]-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамид (APDP), бензофенон-4-йодацетамид, бензофенон-4-малеимидкарбонильные реакционноспособные и фотореакционноспособные кросслинкеры, такие как p-азидобензоилгидразид (ABH), карбоксилатные реакционноспособные и фотореакционноспособные кросслинкеры, такие как 4-(p-азидосалициламидо)бутиламин (AsBA) и аргининовые реакционноспособные и фотореакционноспособные линкеры, такие как p-азидофенилглиоксал (APG).

**[168]** В некоторых случаях линкер X дополнительно содержит реакционноспособную функциональную группу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления реакционноспособная функциональная группа приводит к конъюгации линкера X с грузом, описанным в данном документе. В некоторых случаях реакционноспособная функциональная группа содержит нуклеофильную группу, которая является реакционноспособной в отношении электрофильной группы. Иллюстративные электрофильные группы включают в себя карбонильные группы, такие как альдегид, кетон, карбоновая кислота, сложный эфир, амид, енон, ацилгалоид или кислый ангидрид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления реакционноспособная функциональная группа представляет собой альдегид. Иллюстративные функциональные группы включают в себя гидразид, оксим, аминок, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразин.

**[169]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит малеимидную группу, алкилгалоидную группу или йодацетамидную группу.

**[170]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер X содержит малеимидную группу. В некоторых случаях малеимидная группа также обозначается как малеимидный спейсер. В некоторых случаях малеимидная группа дополнительно включает в себя капроевую кислоту, образующую малеимидокапроил (mc). В некоторых случаях линкер содержит малеимидокапроил (mc). В некоторых случаях линкер представляет собой малеимидокапроил (mc). В других случаях малеимидная группа

содержит малеимидометильную группу, такую как сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sMCC) или сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфа-sMCC), описанные выше.

[171] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления малеимидная группа представляет собой самостабилизирующийся малеимид. В некоторых случаях самостабилизирующийся малеимид использует диаминопропионовую кислоту (DPR) для включения основной аминогруппы, прилегающей к малеимиду, с целью обеспечения внутримолекулярного катализа гидролиза тиосукцинимидного кольца, тем самым, предупреждая вступление малеимида в реакцию элиминации в результате обратной реакции Михаэля. В некоторых случаях самостабилизирующийся малеимид представляет собой малеимидную группу, описанную в Lyon, et al., «Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,” *Nat. Biotechnol.* 32(10):1059-1062 (2014). В некоторых случаях линкер содержит самостабилизирующийся малеимид. В некоторых случаях линкер представляет собой самостабилизирующийся малеимид.

[172] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула для селективной доставки, описанная в данном документе, содержит один линкер. Применение одного механизма для опосредования поглощения как визуализирующих, так и терапевтических грузов, является особенно ценным, поскольку визуализация с использованием нетоксичных следовых количеств может быть использована для исследования того, будет ли вероятным то, что последующая терапевтическая доза будет надлежащим образом концентрироваться в целевой ткани.

[173] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула для селективной доставки, описанная в данном документе, содержит множество линкеров. Если молекула для селективной доставки, описанная в данном документе, содержит множественные линкеры X, то отделение участка A от других участков молекулы требует расщепления всех связей X. Расщепление множественных линкеров X может быть одновременным или последовательным. Множественные линкеры X могут включать в себя связи X, имеющие различные специфичности, в результате чего отделение участка A от других участков молекулы требует, чтобы молекула испытывала воздействие более одного условия или среды (например, «сигнал» или «внеклеточный сигнал»). Расщепление многочисленных линкеров X, таким образом, выступает в качестве детектора комбинаций таких сигналов или внеклеточных сигналов. Например, молекула для селективной доставки может содержать два линкерных участка X<sub>a</sub> и X<sub>b</sub>, соединяющих основной участок B с кислым участком A. Как линкер X<sub>a</sub>, так и линкер X<sub>b</sub>

должны расщепляться перед тем, как кислый участок А отделяется от основного участка В, обеспечивая вхождение участка В и фрагмента груза С (при наличии) в клетку. Необходимо понимать, что линкерный участок может связываться либо с основным участком В, либо с фрагментом груза С независимо от другого линкера, который может присутствовать, и что, при необходимости, может быть включено более двух линкерных участков Х.

**[174]** Комбинации из двух или более линкеров Х могут быть использованы для дополнительного модулирования целенаправленного воздействия и доставки молекул в необходимые клетки, ткани или области. Комбинации сигналов или внеклеточных сигналов используются для расширения или сужения специфичности расщепления линкеров Х, при необходимости. Если множественные линкеры Х связываются параллельно, то специфичность расщепления сужается, поскольку каждый линкер Х должен расщепляться до того, как участок А может отделиться от оставшейся части молекулы. Если множественные линкеры Х связываются последовательно, то специфичность расщепления расширяется, поскольку расщепление на любом одном линкере Х способствует отделению участка А от оставшейся части молекулы. Например, с целью детекции либо протеазы, либо гипоксии (т.е., с целью расщепления Х в присутствии либо протеазы, либо гипоксии), линкер Х конструируют таким образом, чтобы расположить восприимчивые к протеазе и восприимчивые к восстановлению сайты в тандеме, в результате чего расщепление любого из них будет достаточным для того, чтобы способствовать отделению кислого участка А. В качестве альтернативы с целью детекции наличия как протеазы, так и гипоксии (т.е., с целью расщепления Х в присутствии как протеазы, так и гипоксии, но не в присутствии только одного в отдельности), линкер Х конструируют таким образом, чтобы расположить восприимчивый сайт протеазы между по меньшей мере одной парой цистеинов, которые связаны друг с другом с помощью дисульфидных связей. В этом случае с целью обеспечения отделения участка А требуется как расщепления протеазой, так и восстановление дисульфида.

**[175] Участок Y (линкер)**

**[176]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y представляет собой линкер, состоящий из одной или больше аминокислот, который используется для соединения груза (D) с оставшейся частью SDM. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y представляет собой линкер, состоящий из одной или нескольких аминокислот, который используется для соединения груза (D) с участком В. Как правило, пептидный линкер не будет характеризоваться определенной биологической

активностью, отличной от соединения молекул или сохранения некоторого минимального расстояния или другой пространственной связи между ними. В то же время входящие в состав линкера аминокислоты могут быть выбраны с целью воздействия на некоторое свойство молекулы, такое как фолдинг, суммарный заряд или гидрофобность.

[177] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y связывает участок груза D с пептидным участком B (т.е., последовательностью доставки) с помощью ковалентной связи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ковалентная связь представляет собой эфирную связь, тиоэфирную связь, аминную связь, амидную связь, оксимную связь, гидразоновую связь, углерод-углеродную связь, углерод-азотную связь, углерод-кислородную связь или углерод-серную связь.

[178] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y является гибким. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y является жестким. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит линейную структуру. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит нелинейную структуру. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит разветвленную структуру. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит циклическую структуру.

[179] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит пептидную связь. Пептидная связь содержит L-аминокислоты и/или D-аминокислоты. В соответствии с вариантами осуществления D-аминокислоты являются предпочтительными с целью сведения к минимуму иммуногенности и неспецифического расщепления фоновыми пептидазами или протеазами. Известно что поглощение клеткой олиго-D-аргининовых последовательностей является практически таким же или более высоким, чем поглощение олиго-L-аргининов.

[180] В некоторых вариантах осуществления линкер Y представляет собой нерасщепляемый линкер.

[181] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y конструируют с целью расщепления в присутствии определенных условий или в определенной среде. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y представляет собой линкер, который расщепляется внутриклеточной протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y представляет собой линкер, который расщепляется внутриклеточной протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y представляет собой линкер, который расщепляется лизосомальной протеазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внутриклеточная протеаза представляет собой цистеиновую протеазу. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления внутриклеточная протеаза представляет собой аспартиловую протеазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внутриклеточная протеаза представляет собой сериновую протеазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления цистеиновая протеаза представляет собой каспазу, катепсин, кальпаин, папаин или легумин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внутриклеточная протеаза представляет собой инициаторную каспазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внутриклеточная протеаза представляет собой эффекторную каспазу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y расщепляется протеазой, выбранной из катепсина В, катепсина L, катепсина Н, катепсина К, катепсина W, катепсина С, катепсина F, катепсина V, катепсина X, катепсина S, катепсина D, катепсина G, HCP-1, HCP-2, дипептидилпептидазы I, MEROPS C13, CED-3 пептидазы, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11; каспазы 12, каспазы 13 и каспазы 14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y расщепляется протеазой, выбранной из катепсина В, катепсина L, каспазы 3, каспазы 7, каспазы 8 и каспазы 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y расщепляется катепсином В и дипептидилкарбокисептидазой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер имеет лизиновый, цитруллиновый или аргининовый остаток в положении P1 и большой гидрофобный остаток в положении P1'.

**[182]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y представляет собой чувствительный к кислотному воздействию химический линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления чувствительный к кислотному воздействию химический линкер представляет собой гидразон или его производное. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит саморасщепляющийся спейсер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления саморасщепляющийся спейсер имеет достаточную длину, чтобы предупредить возникновение стерического препятствия между участком В SDM и терапевтическим грузом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y содержит п-аминобензиловоспиртовой (РАВОН) спейсер или его производное. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y содержит п-аминобензиловокарбонильный (РАВС) спейсер или его производное. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y содержит разветвленный бис(гидроксиметил)стиреновый (ВНМС) спейсер или его производное. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y содержит 2-аминоимидазол-5-метанольное производное или орто- или пара-аминобензилацетальный спейсер. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y содержит 2,6-бисгидроксиметил-п-крезоловые или гемитиоаминальные производные.

**[183]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y представляет собой бифункциональный линкер. В некоторых случаях бифункциональный линкер имеет одну функциональную группу, способную реагировать с группой на первой молекуле (например, молекулой для селективной доставки), и вторую функциональную группу, способную реагировать с группой на второй молекуле (например, визуализирующим грузом). В некоторых случаях бифункциональный линкер представляет собой гомобифункциональный линкер или гетеробифункциональный линкер. В качестве альтернативы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления с целью получения функциональных групп осуществляют дериватизацию. Таким образом, также известны, например, процедуры для получения свободных сульфгидрильных групп на пептидах (см. патент США № 4659839). Линкер может в качестве альтернативы содержать гетеробифункциональный кросслинкер, содержащий две или больше различных реакционноспособных групп, которые образуют гетероциклическое кольцо, которое может взаимодействовать с молекулой для селективной доставки. Например, гетеробифункциональный кросслинкер, такой как цистеиновый, может содержать аминную реакционноспособную группу и тиоловую реакционноспособную группу, которые могут реагировать с альдегидом на дериватизированной молекуле для селективной доставки. Дополнительные комбинации реакционноспособных групп, подходящих для гетеробифункциональных кросслинкеров, включают в себя, например, аминные и сульфгидрильные реакционноспособные группы; карбонильные и сульфгидрильные реакционноспособные группы; аминные и фотореакционноспособные группы; сульфгидрильные и фотореакционноспособные группы; карбонильные и фотореакционноспособные группы; карбоксилатные и фотореакционноспособные группы; и аргининовые и фотореакционноспособные группы.

**[184]** Иллюстративные гомобифункциональные линкеры включают в себя без ограничения реагент Ломанта (дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP)), 3'3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP)), дисукцинилмидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS), дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-DST), этиленгликобис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), дисукцинимидилглутарат (DSG), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (DSC), диметиладипимидат (DMA), диметилпимелимидат (DMP), диметилсуберимидат (DMS), диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат (DTBP), 1,4-ди-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо)бутан (DPDPB), бисмалеимидогексан (BMH), арилгалоид-

содержащее соединение (DFDNB), такое как, например 1,5-дифтор-2,4-динитробензол или 1,3-дифтор-4,6-динитробензол, 4,4'-дифтор-3,3'-динитрофенилсульфон (DFDNPS), бис-[β-(4-азидосалициламидо)этил]дисульфид (BASED), формальдегид, глутаральдегид, 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир, адипиновой кислоты дигидразид, карбогидразид, ортолуидин, 3,3'-диметилбензидин, бензидин, α,α'-п-диаминодифенил, дийод-п-ксиленсульфоновую кислоту, N,N'-этилен-бис(йодацетамид) или N,N'-гексаметилен-бис(йодацетамид).

**[185]** Иллюстративные гетеробифункциональные линкеры включают в себя без ограничения аминные реакционноспособные и сульфгидрильные реакционноспособные кросслинкеры, такие как N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (sPDP), длинноцепочечный N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (LC-sPDP), водорастворимый длинноцепочечный N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (сульфо-LC-sPDP), сукцинимидилоксикарбонил-α-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол (sMPT), сульфосукцинимидил-6-[α-метил-α-(2-пиридилдитио)толуамидо]гексаноат (сульфо-LC-sMPT), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sMCC), сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-sMCC), м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид сложный эфир (MBs), м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимид сложный эфир (сульфо-MBs), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат (sIAB), сульфосукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат (сульфо-sIAB), сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (sMPB), сульфосукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (сульфо-sMPB), N-(γ-малеимидобутирилокси)сукцинимид сложный эфир (GMBs), N-(γ-малеимидобутирилокси)сукцинимид сложный эфир (сульфо-GMBs), сукцинимидил-6-((йодацетил)амино)гексаноат (sIAX), сукцинимидил-6-[6-(((йодацетил)амино)гексаноил)амино]гексаноат (sIAXX), сукцинимидил 4-(((йодацетил)амино)метил)циклогексан-1-карбоксилат (sIAC), сукцинимидил 6-(((4-йодацетил)амино)метил)циклогексан-1-карбонил)амино)гексаноат (sIACX), п-нитрофенилйодацетат (NPIA), карбонильные реакционноспособные и сульфгидрильные реакционноспособные кросслинкеры, такие как 4-(4-N-малеимидофенил)масляной кислоты гидразид (MPBH), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилгидразин-8 (M2C2H), 3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид (PDPH), аминные реакционноспособные и фотореакционноспособные кросслинкеры, такие как N-гидроксисукцинимидил-4-азидосалицилловая кислота (NHs-AsA), N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидосалицилловая кислота (сульфо-NHs-AsA), сульфосукцинимидил-(4-азидосалициламидо)гексаноат (сульфо-NHs-LC-AsA),

сульфосукцинимидил-2-(*p*-азидосалициламидо)этил-1,3'-дитиопропионат (sAsD), N-гидроксисукцинимидил-4-азидобензоат (HsAB), N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат (сульфо-HsAB), N-сукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (sANPAH), сульфосукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (сульфо-sANPAH), N-5-азидо-2-нитробензоилсукцинимид (ANB-NOs), сульфосукцинимидил-2-(*m*-азидо-*o*-нитробензамидо)-этил-1,3'-дитиопропионат (sAND), N-сукцинимидил-4(4-азидофенил)1,3'-дитиопропионат (sADP), N-сульфосукцинимидил(4-азидофенил)-1,3'-дитиопропионат (сульфо-sADP), сульфосукцинимидил 4-(*p*-азидофенил)бутират (сульфо-sAPB), сульфосукцинимидил-2-(7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамид)этил-1,3'-дитиопропионат (sAED), сульфосукцинимидил-7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетат (сульфо-sAMCA), *p*-нитрофенилдиазопируват (*p*NPDP), *p*-нитрофенил-2-диазо-3,3,3-трифторпропионат (PNP-DTP), сульфгидрильные реакционноспособные и фотореакционноспособные кросслинкеры, такие как 1-(*p*-азидосалициламидо)-4-(йодацетамидо)бутан (AsIB), N-[4-(*p*-азидосалициламидо)бутил]-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамид (APDP), бензофенон-4-йодацетамид, бензофенон-4-малеимидкарбонильные реакционноспособные и фотореакционноспособные кросслинкеры, такие как *p*-азидобензоилгидразид (ABH), карбоксилатные реакционноспособные и фотореакционноспособные кросслинкеры, такие как 4-(*p*-азидосалициламидо)бутиламин (AsBA) и аргининовые реакционноспособные и фотореакционноспособные линкеры, такие как *p*-азидофенилглиоксал (APG).

**[186]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит малеимидную группу. В некоторых случаях малеимидная группа также обозначается как малеимидный спейсер. В некоторых случаях малеимидная группа дополнительно включает в себя капроевую кислоту, образующую малеимидокапроил (mc). В некоторых случаях линкер содержит малеимидокапроил (mc). В некоторых случаях линкер представляет собой малеимидокапроил (mc). В других случаях малеимидная группа содержит малеимидометильную группу, такую как сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (sMCC) или сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфа-sMCC), описанные выше.

**[187]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления малеимидная группа представляет собой самостабилизирующийся малеимид. В некоторых случаях самостабилизирующийся малеимид использует диаминопропионовую кислоту (DPR) для включения основной аминогруппы, прилегающей к малеимиду, с целью обеспечения внутримолекулярного катализа гидролиза тиосукцинимидного кольца, тем самым, предупреждая вступление малеимида в реакцию элиминации в результате обратной

реакции Михаэля. В некоторых случаях самостабилизирующийся малеимид представляет собой малеимидную группу, описанную в Lyon, et al., «Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,” Nat. Biotechnol. 32(10):1059-1062 (2014). В некоторых случаях линкер содержит самостабилизирующийся малеимид. В некоторых случаях линкер представляет собой самостабилизирующийся малеимид.

**[188]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит лизосомально расщепляемый пептид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит лизосомально расщепляемый дипептид Phe-Arg. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит лизосомально расщепляемый дипептид Phe-Lys. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит лизосомально расщепляемый дипептид Val-Cit (l-цитруллин). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит лизосомально расщепляемый тетрапептид Gly-Phe-Leu-Gly. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит лизосомально расщепляемый тетрапептид Ala-Leu-Ala-Leu.

**[189]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер Y содержит лизосомально расщепляемый пептид и саморасщепляющийся спейсер.

**[190]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y представляет собой чувствительный к pH линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y расщепляется в условиях кислых значений pH. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Y расщепляется в условиях кислых значений pH лизосомы.

**[191]** Необходимо понимать, что линкер Y, раскрываемый в данном документе, может содержать нестандартные аминокислоты, такие как, например, гидроксизин, десмозин, изодесмозин или другие нестандартные аминокислоты. Линкер, раскрываемый в данном документе, может содержать модифицированные аминокислоты, в том числе посттрансляционно модифицированные аминокислоты, такие как, например, метилированные аминокислоты (например, метилгистидин, метилированные формы лизина и т.д.), ацетилированные аминокислоты, амидированные аминокислоты, формилированные аминокислоты, гидроксильные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты или другие модифицированные аминокислоты. Линкер, раскрываемый в данном документе, может также содержать фрагменты пептидомиметиков, в том числе участки, связанные с помощью непептидных связей, и аминокислоты, связанные с помощью неаминокислотных участков или с ними.

**[192]** *Дополнительные модификации*

[193] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулы для селективной доставки по настоящему раскрытию необязательно конъюгируют с высокомолекулярными молекулами, которые приводят к повышению мультивалентности и avidности мечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления высокомолекулярные молекулы представляют собой водорастворимые полимеры. Примеры подходящих водорастворимых полимеров включают в себя без ограничения пептиды, сахараиды, поли(винилы), поли(эферы), поли(амины), поли(карбоновые кислоты) и т.п. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления водорастворимый полимер представляет собой декстран, полиэтиленгликоль (PEG), полиоксиалкилен, полисиаловую кислоту, крахмал или гидроксиптилкрахмал. Любой подходящий способ используется для конъюгации пептидов с водорастворимыми полимерами (см. Hermanson G., *Bioconjugate Techniques* 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, Inc. 2008).

**[194] *Иллюстративные молекулы для селективной доставки для логотрической визуализации***

[195] На **Фиг. 1** показана структура одного неограничивающего примера молекулы для селективной доставки для применения в раскрываемых логотрических способах визуализации флуоресценции (т.е., SDM-25 или AVB-620). SDM-25 используется в способах визуализации флуоресценции с целью доставки пары фрагментов донора и акцептора флуоресценции (т.е., визуализирующих средств), которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции (например, Cy5 и Cy7) в отношении ткани, представляющей интерес, при этом способ предусматривает (а) приведение в контакт ткани, представляющей интерес, с SDM-25 (например, введение SDM-25 индивидууму внутривенно), и (b) визуализацию по меньшей мере одного из визуализирующих средств.

[196] На **Фиг. 2B** продемонстрирован сдвиг спектра излучения флуоресценции в случае SDM-25, меченой парой донор-акцептор Cy5/Cy7 при расщеплении линкера, который удерживает донор и акцептор в непосредственной близости. В случае интактного зонда перенос энергии на основе FRET, поглощенной донорской молекулой Cy5 при возбуждении светом 620 нм к акцепторной молекуле Cy7 приводит к выраженному излучению флуоресценции при примерно 780 нм. При расщеплении разделение этих двух флуорофоров приводит к устранению переноса энергии на основе FRET, способствуя снижению излучения флуоресценции Cy7 при 780 нм и повышению излучения флуоресценции Cy5 при 670 нм.

[197] На **Фиг. 3A-Фиг. 3C** представлены примеры данных, иллюстрирующие различные скорости расщепления, наблюдаемые в случае SDM-25 (AVB-620) в опухолевой ткани

рака молочной железы и нормальной ткани, и кривая зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) в случае применения SDM-25 при детекции раковой ткани молочной железы человека на основе логометрической визуализации флуоресценции. **Фиг. 3А:** Скорость расщепления SDM-25 (нМ, расщепляемых в минуту) в 25 парных гомогенатах ткани пациентов с раком молочной железы человека. Показаны положительная в отношении рака опухолевая ткань (ромбы красного цвета) и отрицательная в отношении рака прилегающая ткань (треугольники синего цвета). Парные образцы соединены с помощью линий. Парный t-критерий предусматривал  $P < 0,0001$  в случае значимой разницы между опухолью и нормой. **Фиг. 3В:** Диаграмма рассеяния тех же самых данных с учетом среднего  $\pm$  95% доверительный интервал. На **Фиг. 3С** показана кривая ROC в случае детекции скорости расщепления SDM-25 опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью.

**[198]** Как указано на **Фиг. 3А-Фиг. 3В** при инкубации гомогенатов нормальной ткани молочной железы человека и раковой ткани молочной железы человека с меченой Cy5/Cy7 SDM-25 было обнаружено, что ферментативная активность и расщепление SDM-25 является значимо более высоким в раковой ткани молочной железы человека по сравнению с нормальной тканью молочной железы человека.

**[199]** На **Фиг. 4А-Фиг. 4В** представлены примеры данных, иллюстрирующих применение SDM-25 для количественной оценки активности MMP в гомогенатах незлокачественной ткани молочной железы и гомогенатах опухоли. **Фиг. 4А:** гомогенаты из трех иллюстративных образцов рака молочной железы человека и парной нормальной ткани, выбранные от 25 пациентов, для которых данные представлены на **Фиг. 3А-Фиг. 3С**, анализировали в отношении 10% желатиновой зимограммы. Рекомбинантные активные MMP2 и MMP9 показаны в качестве стандартов (2 нг на полосу). **Фиг. 4В:** Количественная оценка с помощью ELISA шести MMP в пяти иллюстративных образцах рака молочной железы человека (красный цвет) и парной нормальной ткани (синий цвет), в том числе трех пар, показанных на **Фиг. 4А**. Планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения. Н.о. = не определено.

**[200]** В некоторых случаях инфузия биологического образца меченой Cy5/Cy7 SDM-25 (или другим логометрическим индикатором) способствует дифференциации областей, характеризующихся биологической активностью, представляющей интерес, и областей, которые не характеризуются высокими отношения контраста изображения. Например, инфузия биологического образца меченой Cy5/Cy7 SDM-25 (или другим логометрическим индикатором) может приводить к отношению контраста изображения отношения флуоресценции или изображения интенсивности флуоресценции, составляющему по

меньшей мере 1,25:1, 1,5:1, 1,75:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 20:1 или более, между областями, характеризующимися протеазной активностью, коррелирующей с раком, и областями, которые не характеризуются такой активностью.

**[201] Способы применения**

**[202]** Как указано выше, раскрываемые логометрические флуоресцентные индикаторы и способы визуализации могут быть использованы для детекции и/или визуализации областей в пределах биологического образца, которые характеризуются биологической активностью, представляющей интерес. Примеры «биологического образца» включают в себя без ограничения образцы культивируемых клеток, первичные образцы тканей (например, образцы тканей, в которых внеклеточный матрикс был переварен или растворен с целью высвобождения отдельных клеток в суспензию), образцы крови или их фракции, образцы тканей *ex vivo* (например, образцы биоптатов или вырезанные хирургические образцы), образцы тканей *in vivo* (например, опухолевая ткань или пограничная ткань, выведенная во время хирургической процедуры) и т.п. Биологические образцы могут быть получены из любого из множества организмов, например, прокариотов, эукариотов, грибов, растений, животных или людей. В некоторых случаях биологические образцы представляют собой образцы пациента. Примеры «биологической активности» включают в себя без ограничения изменения концентрации ионов или активности транспорта (например, накопление или высвобождение ионов  $Ca^{2+}$ , или изменения локального значения pH), изменения трансмембранного потенциала возбудимых клеток, областей повышенной протеазной активности (например, внеклеточной протеазной активности), изменения других биохимических или физиологических процессов, которые отслеживаются с помощью логометрических флуоресцентных индикаторов, или любую их комбинацию. В некоторых случаях биологическая активность, подлежащая детекции и визуализации, коррелирует с различными патологическими состояниями, например, артритом, атеросклерозом, раком, раком молочной железы, предраком, злокачественной тканью, коагуляцией (свертыванием крови), воспалением или любой их комбинацией.

**[203]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрываемые логометрические флуоресцентные индикаторы используют для детекции и диагностики рака в образцах ткани *ex vivo* (например, образцах биоптатов или вырезанных хирургических образцах).

**[204]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрываемые флуоресцентные индикаторы и способы визуализации используют для визуализации ткани, представляющей интерес, у индивидуума, нуждающегося в этом (например,

пациента). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления логометрические способы визуализации предусматривают: (а) введение логометрического флуоресцентного индикатора, например, логометрического АСРР, такого как SDM-25, меченого парой донор-акцептор  $Cu5/Cu7$ , индивидууму, и (б) визуализацию по меньшей мере одной из флуоресцентных молекул.

**[205]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка логометрического флуоресцентного индикатора в клетку или ткань позволяет медицинскому работнику визуализировать/отображать конкретную ткань (например, раковую ткань). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в клетку или ткань позволяет медицинскому работнику удалить (или хирургически вырезать) ткань, представляющую интерес (например, раковую ткань). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в клетку или ткань позволяет медицинскому работнику удалить (или хирургически вырезать) ткань, представляющую интерес (например, раковую ткань) при уменьшении хирургических краев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в клетку или ткань позволяет медицинскому работнику удалить (или хирургически вырезать) опухолевую/раковую ткань и снижает вероятность того, что некоторая часть из опухолевой/раковой ткани не будет удалена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в клетку или ткань позволяет медицинскому работнику максимально уменьшить массу опухолевой/раковой ткани. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в раковую ткань молочной железы снижает вероятность излишних операций и повторных операций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления статус границ рака определяют интраоперационно.

**[206]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в клетку или ткань позволяет медицинскому работнику более точно брать образец (например, биопсию (например, эксцизионную биопсию, инсцизионную биопсию, аспирационную биопсию или игольчатую биопсию)) ткани, представляющей интерес (например, раковой ткани). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в клетку или ткань позволяет медицинскому работнику визуализировать/отображать определенную ткань (например, раковую ткань) в пределах вырезанной ткани, содержащей здоровую ткань. Обеспечение идентификации целевой ткани (например,

раковой ткани) может направлять патолога в отношении того, как вырезать образец ткани с целью патологической оценки и снизить вероятность того, что патолог пропустит пораженную ткань (например, раковую ткань), а также взять образец здоровой ткани, которая приводит к ложно-отрицательному результату. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ткань (например, раковая ткань), удаленная после применения соединения формулы (I) или соединения формулы (II), используется для получения среза или микроскопического препарата для патологического исследования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раковая ткань, удаленная после применения соединения формулы (I) или соединения формулы (II), используется для получения среза или микроскопического препарата для патологического исследования, которые используются для диагностики ткани как злокачественной или доброкачественной.

**[207]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в раковую ткань молочной железы позволяет медицинскому работнику точно стадировать рак, позволяя принять решения о медицинском лечении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в раковую ткань позволяет медицинскому работнику наблюдать размер опухоли (раковой ткани) или распространение (например метастатические поражения) раковой ткани. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленная доставка визуализирующего средства в клетку или ткань позволяет медицинскому работнику разрабатывать эффективный режим лечения.

**[208]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула для селективной доставки в соответствии с формулой (I), содержащая визуализирующее средство (например, молекула для селективной доставки, меченая парой донора-акцептора флуоресценции), используется при направленном хирургическом вмешательстве. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки предпочтительно локализуют в направлении раковых или других патологических тканей с повышенной регуляцией протеазной активности (например, тканей, подвергающихся воспалительному ответу). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки в соответствии с формулой (I), содержащую визуализирующее средство, используют при направленном хирургическом вмешательстве с целью удаления раковой ткани, например, колоректального рака. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления направленное хирургическое вмешательство, использующее молекулу для селективной доставки, позволяет хирургу вырезать как можно меньше здоровой (т.е., нераковой) ткани.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления направленное хирургическое вмешательство, использующее молекулу для селективной доставки, позволяет хирургу визуализировать и вырезать больше раковой ткани, чем хирург был бы способен вырезать без наличия молекулы для селективной доставки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления хирургическое вмешательство представляет собой направленное флуоресценцией хирургическое вмешательство.

**[209]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула для селективной доставки в соответствии с формулой (II), содержащая визуализирующее средство (например, молекула для селективной доставки, меченая парой донора-акцептора флуоресценции), используется при направленном хирургическом вмешательстве. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки предпочтительно локализуют в направлении раковых или других патологических тканей с повышенной регуляцией протеазной активности (например, тканей, подвергающихся воспалительному ответу). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулу для селективной доставки в соответствии с формулой (II), содержащую визуализирующее средство, используют при направленном хирургическом вмешательстве с целью удаления раковой ткани, например, колоректального рака. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления направленное хирургическое вмешательство, использующее молекулу для селективной доставки, позволяет хирургу вырезать как можно меньше здоровой (т.е., нераковой) ткани. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления направленное хирургическое вмешательство, использующее молекулу для селективной доставки, позволяет хирургу визуализировать и вырезать больше раковой ткани, чем хирург был бы способен вырезать без наличия молекулы для селективной доставки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления хирургическое вмешательство представляет собой направленное флуоресценцией хирургическое вмешательство.

**[210]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ткань, представляющая интерес, представляет собой: раковую ткань молочной железы, раковую ткань толстого кишечника, ткань плоскоклеточной карциномы, раковую ткань предстательной железы, ткань меланомы, ткань саркомы, раковую ткань щитовидной железы, колоректальную раковую ткань, раковую ткань кожи, раковую ткань яичника, раковую ткань лимфатических узлов, раковую ткань шейки матки, раковую ткань легких, раковую ткань поджелудочной железы, раковую ткань головы и шеи или раковую ткань пищевода. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ткань, представляющая интерес, представляет собой раковую ткань молочной железы. В некоторых случаях ткань,

представляющая интерес, представляет собой раковую ткань толстого кишечника. В некоторых случаях ткань, представляющая интерес, представляет собой раковую ткань легких. В некоторых случаях ткань, представляющая интерес, представляет собой раковую ткань предстательной железы.

**[211]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой СПИД-ассоциированные разновидности рака (например, СПИД-ассоциированную лимфому), рак анального канала, базально-клеточную карциному, рак желчного протока (например, внепеченочный), рак мочевого пузыря, рак кости, (остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому), рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстого кишечника, колоректальный рак, рак эндометрия (например, рак матки), эпендиому, рак пищевода, рак глаза (например, интраокулярную меланому и ретинобластому), рак желудка, эмбрионально-клеточный рак (например, экстракраниальный, внегонадный, яичника), рак головы и шеи, лейкоз, рак губы и ротовой полости, рак печени, рак легких (например, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого), рак яичников, рак поджелудочной железы, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, рак почек, саркому, рак кожи, рак тонкого кишечника, плоскоклеточный рак, рак яичек, рак горла, рак щитовидной железы, рак уретры и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (PTLD).

**[212]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых случаях рак молочной железы включает в себя инвазивный протоковый рак (IDC), инвазивную дольковую карциному (ILC), протоковую карциному *in situ* (DCIS), воспалительный рак молочной железы, дольковую карциному *in situ* (LCIS), рак молочной железы мужчин, молекулярные подтипы рака молочной железы, рак соска молочной железы Педжета, филоидные опухоли молочной железы и метастатический рак молочной железы. В некоторых случаях IDC дополнительно подразделяют на тубулярную карциному молочной железы, медуллярную карциному молочной железы, слизистую карциному молочной железы, папиллярную карциному молочной железы и крибриформную карциному молочной железы. В некоторых случаях молекулярные подтипы рака молочной железы включают в себя внутрипротоковый А, внутрипротоковый В, трижды негативный/базально-подобный, обогащенный HER2 рак молочной железы или обычный рак молочной железы.

**[213]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой лимфоидный рак (например, лимфому).

**[214]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой

В-клеточный рак. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой разновидности В-клеточного рака из предшественников (например, В-лимфобластный лейкоз/лимфому из предшественников) и разновидности периферического В-клеточного рака (например, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/пролимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (мелкоклеточную (SL) NHL), лимфоплазмацитоидную лимфому/иммуноцитому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из клеток центра фолликула, фолликулярную лимфому (например, цитологические степени: I (мелкоклеточную), II (смешанную мелко- и крупноклеточную), III (крупноклеточную) и/или подтип: диффузного и главным образом мелкоклеточного типа), неходжкинскую лимфому низкой степени дифференцировки/фолликулярную неходжкинскую лимфому (NHL), NHL промежуточной степени дифференцировки/фолликулярную NHL, В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (например, экстранодальную (например, MALT-типа +/- моноцитoidных В-клеток) и/или нодальную (например, +/- моноцитoidных В-клеток)), лимфому маргинальной зоны селезенки (например, +/- ворсинчатые лимфоциты), волосатоклеточный лейкоз, плазмацитому/миелому плазматических клеток (например, миелому и множественную миелому), диффузную В-крупноклеточную лимфому (например, первичную медиастинальную (тимическую) В-клеточную лимфому), диффузную NHL промежуточной степени дифференцировки, лимфому Беркитта, В-клеточную лимфому высокой степени дифференцировки, Беркитт-подобную иммунобластную NHL высокой степени дифференцировки, лимфобластную NHL высокой степени дифференцировки, мелкоклеточную NHL с нерассеченными ядрами высокой степени дифференцировки, массивную NHL, СПИД-ассоциированную лимфому и макроглобулинемию Вальденстрема).

**[215]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой Т-клеточный и/или предполагаемый НК-клеточный рак. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой Т-клеточный рак из предшественников (Т-лимфобластную лимфому/лейкоз из предшественников) и периферические Т-клеточные и НК-клеточные разновидности рака (например, Т-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/пролимфоцитарный лейкоз и лейкоз больших гранулярных лимфоцитов (LGL) (например, Т-клеточного типа и/или НК-клеточного типа), кожную Т-клеточную лимфому (например, фунгоидный микоз/синдром Сезари), первичные Т-клеточные лимфомы, не уточненной этиологии (например, цитологические категории (например, со средним размером клеток, смешанные со средним и крупным размером клеток), крупноклеточную лимфоэпителиальноклеточную

γδ Т-клеточную лимфому печени и селезенки и Т-клеточную лимфому подкожного панникулита), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AILD), ангиоцентрическую лимфому, Т-клеточную лимфому кишечника (например, +/- энтеропатического типа), Т-клеточную лимфому/лейкоз взрослых (ATL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL) (например, CD30+, Т- и нуль-клеточного типов), анапластическую крупноклеточную лимфому и ходжкинского типа).

**[216]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой болезнь Ходжкина.

**[217]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой лейкоз. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз I типа, хронический миелогенный и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз и острый миелоцитарный лейкоз (например, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный, и эритролейкоз).

**[218]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой опухоль жидких тканей или плазмацитому. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой экстрамедуллярную плазмацитому, солитарную миелому и множественную миелому. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления плазмацитомы представляет собой множественную миелому.

**[219]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой рак легких.

**[220]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы представляет собой аденокарциному. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы представляет собой саркому, нейроэндокринную опухоль, мелкоклеточный рак, протоковый рак или лимфому. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы представляет собой рак предстательной железы стадии А (рак не может пальпироваться во время ректального исследования). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы представляет собой рак предстательной железы стадии В (т.е., опухоль включает больше ткани в пределах предстательной железы, она может пальпироваться во время ректального исследования или ее обнаруживают при биопсии, которую выполняют в связи с высоким уровнем PSA). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы

представляет собой рак предстательной железы стадии С (т.е., рак распространился за пределы предстательной железы в близлежащие ткани). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы представляет собой рак предстательной железы стадии D. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы представляет собой андрогеннезависимый рак предстательной железы (AIPC). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы представляет собой андрогензависимый рак предстательной железы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы является рефрактерным к гормональной терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы является по сути рефрактерным к гормональной терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы является рефрактерным к химиотерапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический рак предстательной железы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления индивидум представляет собой человека, который имеет ген, генетическую мутацию или полиморфизм, ассоциированные с раком предстательной железы (например, RNASEL/HPC1, ELAC2/HPC2, SR-A/MSR1, CHEK2, BRCA2, PON1, OGG1, MIC-1, TLR4 и PTEN) или имеет одну или несколько дополнительных копий гена, ассоциированного с раком предстательной железы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы является HER2 положительным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак предстательной железы является HER2 отрицательным.

**[221]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак метастазировал и характеризуется циркулирующими опухолевыми клетками.

**[222]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ткань, представляющая интерес, представляет собой ткань с повышенной регуляцией протеазной активности (например, ткань, подвергающуюся воспалительному ответу).

**[223]** *Фармацевтические композиции*

**[224]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в данном документе раскрыты фармацевтические композиции, содержащие любую из SDM, раскрываемых в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция, содержащая SDM, содержит SDM любой из формулы I или формулы II и фармацевтически приемлемый носитель.

**[225]** Фармацевтические композиции в данном документе составляют с помощью одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, в том числе наполнителей и

вспомогательных средств, которые облегчают обработку активных средств в препаратах, которые используются фармацевтически. Соответствующий состав зависит от выбранного пути введения. Краткое описание фармацевтических композиций встречается, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins, 1999).

**[226]** В соответствии с определенными вариантами осуществления фармацевтическая композиция, раскрываемая в данном документе, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый(приемлемые) разбавитель(разбавители), наполнитель(наполнители) или носитель(носители). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция содержит другие медицинские или фармацевтические средства, носители, вспомогательные вещества, такие как консерванты, стабилизаторы, увлажняющие или эмульгирующие средства, усилители растворения, соли для регуляции осмотического давления и/или буферы. Помимо этого, фармацевтические композиции также содержат другие терапевтически ценные вещества.

**[227]** В соответствии с определенными вариантами осуществления фармацевтическую композицию, раскрываемую в данном документе, вводят субъекту с помощью любого подходящего пути введения, в том числе без ограничения парентерального (внутривенного, подкожного, интраперитонеального, внутримышечного, внутрисосудистого, интратекального, интравитреального, инфузионного или локального) введения.

**[228]** Составы, подходящие для внутримышечных, подкожных, перитуморальных или внутривенных инъекций включают в себя физиологически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, а также стерильные порошки для разведения в стерильные растворы или дисперсии. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или основ включают в себя воду, этанол, полиолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин, кремофор и т.п.), их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Подходящая текучесть поддерживается, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, в результате поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Составы, подходящие для подкожных

инъекций, также содержат необязательные вспомогательные вещества, такие как консерванты, увлажняющие, эмульгирующие и диспергирующие средства.

**[229]** В случае внутривенных инъекций активное средство необязательно составляют в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буферный раствор.

**[230]** Инъекции для парентерального введения необязательно включают в себя болюсную инъекцию и непрерывную инфузию. Составы для инъекций необязательно представлены в единичной лекарственной форме, например, в ампулах или многодозных контейнерах, с добавлением консерванта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтические композиции, раскрываемые в данном документе, находятся в подходящей форме для парентеральной инъекции, такой как стерильные суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных основах, и содержат вспомогательные средства, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Фармацевтические составы для парентерального введения включают в себя водные растворы активного средства в водорастворимой форме. Помимо этого суспензии необязательно готовят в виде подходящих масляных инъекционных суспензий.

**[231]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, находится в единичных лекарственных формах, подходящих для однократного введения точных доз. В единичной лекарственной форме составы разделены на единичные дозы, содержащие подходящие количества активного средства, раскрываемого в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления единичная доза находится в форме упаковки, содержащей дискретные количества состава. Неограничивающие примеры упаковывают в таблетки или капсулы, а также порошки во флаконах или ампулах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления водные суспензионные композиции упаковывают в одноразовые не поддающиеся повторной герметизации контейнеры. В качестве альтернативы используют многоразовые поддающиеся повторной герметизации контейнеры, в случае которых в типичном случае является включение консерванта в композицию. Только в качестве примера составы для парентеральной инъекции представлены в единичной лекарственной форме, которые включают в себя без ограничения ампулы или многодозовые контейнеры, с добавлением консерванта.

**[232]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления количественно вводимой SDM варьирует в зависимости от факторов, таких как определенное вещество, информация (например, масса) о субъекте, путь введения и продолжительность времени, в

течение которого соединение требует визуализации. Иллюстративные дозы включают в себя без ограничения 0,5 мг, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 15 мг, 18 мг, 20 мг, 25 мг или 30 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 1 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 2 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 4 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 6 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 8 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 10 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 12 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 15 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 20 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 25 мг. В некоторых случаях доза SDM, вводимая субъекту, составляет 30 мг.

**[233]** В некоторых случаях SDM вводят от приблизительно 30 минут до приблизительно 24 часов до хирургического вмешательства. В некоторых случаях SDM вводят от приблизительно 1 часа до приблизительно 22 часа, от приблизительно 1 часа до приблизительно 20 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 22 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 20 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 18 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 16 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 14 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 12 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 10 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 8 часов, от приблизительно 4 часов до приблизительно 18 часов, от приблизительно 4 часов до приблизительно 16 часов, от приблизительно 4 часов до приблизительно 12 часов, от приблизительно 4 часов до приблизительно 8 часов, от приблизительно 6 часов до приблизительно 20 часов, от приблизительно 6 часов до приблизительно 18 часов, от приблизительно 6 часов до приблизительно 12 часов, от приблизительно 8 часов до приблизительно 18 часов или от приблизительно 8 часов до приблизительно 12 часов до хирургического вмешательства. В некоторых случаях SDM вводят за приблизительно 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа или 24 часа до хирургического вмешательства.

**[234]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления SDM вводят субъекту с помощью инфузии. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 20 минут, 30 минут, 40 минут, 50 минут, 1 час, 1,5 часа, 2 часа, 2,5 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов или дольше. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 20 минут. В некоторых случаях продолжительность

инфузии составляет приблизительно 30 минут. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 40 минут. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 50 минут. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 1 час. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 50 минут. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 1,5 час. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 50 минут. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 2 часа. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 50 минут. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 4 часа. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 50 минут. В некоторых случаях продолжительность инфузии составляет приблизительно 6 часа.

**[235] Системы для детекции и визуализации флуоресценции**

**[236]** Любое из множества инструментов для детекции флуоресценции и систем визуализации может быть использовано с визуализирующими средствами, например, логометрическими флуоресцентными индикаторами, в способах визуализации по настоящему раскрытию. Например, в исследованиях *in vitro* стандартные спектрофотометры могут быть использованы для осуществления клеточных анализов. В случае визуализации образцов ткани *ex vivo* могут быть использованы эпифлуоресцентный микроскоп, оснащенный подходящим набором фильтров возбуждения и излучения и одной или несколькими камерами CCD. В случае областей применения визуализации *in vivo* могут быть использованы более современные системы визуализации. В специализированных областях применения визуализации *in vivo*, например, колоноскопии, может быть использован модифицированный эндоскоп, который позволяет получать изображения флуоресценции при двух (или более) длинах волн излучения.

**[237]** Как правило, указанные системы детекции и визуализации флуоресценции будут содержать: (i) один или несколько источников возбуждающего света, (ii) наборы фильтров возбуждения и излучения (или другие компоненты для коррекции настроек длин волн и полосы пропускания); (iii) один или несколько детекторов, и (iv) другие оптические компоненты для манипуляции пути световых лучей по мере их прохождения через оптическую систему. В некоторых случаях системы детекции и визуализации флуоресценции дополнительно содержат один или несколько процессоров, компонентов компьютерных запоминающих устройств (устройств памяти), программную операционную систему, инструментальное контрольное программное обеспечение

(например, программное обеспечения для получения изображений) и/или программное обеспечение для обработки и отображения (например, программное обеспечение для обработки и отображения изображений).

**[238]** На Фиг. 5 схематически изображен один неограничивающий пример системы логометрической визуализации флуоресценции, в которой используется оптический компонент распределителя изображений (например, дихроичный рефлектор) с целью визуализации излучения флуоресценции при двух различных длинах волн на двух различных камерах. Возбуждающий свет, предусматриваемый, например, кольцевым светильником, окружающим объектив микроскопа, используется для освещения образца ткани при определенной длине волны возбуждения. Излученную флуоресценцию собирают с помощью оптической системы визуализации, направленной на компонент распределителя изображений в двухкомпонентных изображениях в соответствии с предельным значением длины волны излучения распределителя изображений, и отдельно визуализируют на чипы датчиков изображений двух различных камер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанные два изображения получают одновременно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанные два изображения получают последовательно.

**[239]** Любой из множества световых источников, известных специалистам в данной области техники, может быть использован в качестве источника возбуждающего света, в том числе без ограничения дуговые лампы, галогенные лампы с вольфрамовой нитью накаливания, лазеры (например, аргонные ионные лазеры, гелий-неоновые (HeNe) лазеры и т.д.), диодные лазеры, светоизлучающие диоды (LED), источники света и т.д., или их любая комбинация. В некоторых случаях система детекции или визуализации флуоресценции содержит по меньшей мере один источник света, по меньшей мере два источника света, по меньшей мере три источника света, по меньшей мере четыре источника света, по меньшей мере пять источников света или т.п.

**[240]** Наборы фильтров возбуждения и излучения содержит ряд оптических фильтров, известных специалистам в данной области техники, в том числе без ограничения фильтры из оптического стекла (например, оптические фильтры компании Шотт), длинноволновые пропускающие фильтры, коротковолновые пропускающие фильтры, интерференционные фильтры, дихроичные рефлекторы, запирающие фильтры и т.п., или их любую комбинацию. В некоторых случаях длины волн возбуждения и/или излучения (или полосу пропускания) устанавливают и/или корректируют с помощью изменения одного или нескольких оптических фильтров в оптическом пути системы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления длины волн возбуждения и/или излучения (и

полосу пропускания) устанавливают и/или корректируют с помощью других компонентов, таких как дифракционные решетки, монохроматоры, акустооптические модуляторы, настраиваемые жидкокристаллические фильтры и т.п.

**[241]** В некоторых случаях настройки длин волн возбуждения и излучения для системы детекции и визуализации флуоресценции независимо корректируют и они находятся в диапазоне от приблизительно 350 нм до приблизительно 900 нм. В некоторых случаях длины волн возбуждения и излучения устанавливают при приблизительно 350 нм, 375 нм, 400 нм, 425 нм, 450 нм, 475 нм, 500 нм, 525 нм, 550 нм, 575 нм, 600 нм, 625 нм, 650 нм, 675 нм, 700 нм, 725 нм, 750 нм, 775 нм, 800 нм, 825 нм, 850 нм, 875 нм или 900 нм. Специалистам в данной области техники будет понятно, что длины волн возбуждения или излучения могут быть установлены на любое значение в пределах указанного диапазона, например, приблизительно 620 нм.

**[242]** В некоторых случаях ширину полос возбуждающего и излучаемого света независимо корректируют и определяют в виде определенной длины волны возбуждения и излучения  $\pm 2$  нм,  $\pm 5$  нм,  $\pm 10$  нм,  $\pm 20$  нм,  $\pm 40$  нм,  $\pm 80$  нм или больше. Специалистам в данной области техники будет понятно, что ширина полос возбуждения или излучения могут быть установлены на любое значение в пределах указанного диапазона, например, приблизительно  $\pm 55$  нм.

**[243]** Может быть использован любой из множества детекторов и датчиков изображений, известных специалисту в данной области техники, в том числе без ограничения фотодиоды, лавинные фотодиоды, фотодиодные матрицы, фотоумножители, датчики изображений или камеры CCD или CMOS и т.п., или их любая комбинация. В некоторых случаях система детекции или визуализации флуоресценции содержит по меньшей мере один детектор, по меньшей мере два детектора (например, для одновременного получения изображений флуоресценции при двух различных длинах волн излучения), по меньшей мере три детектора, по меньшей мере четыре детектора, по меньшей мере пять детекторов и т.п. В некоторых оптических схемах систему детекции или визуализации флуоресценции конфигурируют с целью получения изображений интенсивности флуоресценции при двух (или больше) различных длинах волн последовательно, например, с помощью изменения фильтра излучения флуоресценции между этапами получения изображений. В некоторых оптических схемах систему детекции или визуализации флуоресценции конфигурируют с целью получения изображений интенсивности флуоресценции при двух (или больше) различных длинах волн излучения одновременно, например, с помощью включения подходящих дихроичных рефлекторов в

оптическом пути излучаемого света и использования другого детектора для каждой длины волны излучения.

**[244]** Примеры других оптических компонентов, которые могут быть использованы в системах детекции и визуализации флуоресценции, включают в себя без ограничения линзы или системы линз, призмы, разделяющие лучи, зеркала, оптические волокна, дифракционные оптические элементы для коррекции хроматической аберрации и т.д. Эти компоненты конфигурируют, наряду с источниками света, фильтрами возбуждения и излучения (или другими компонентами для коррекции настроек длины волны и полосы пропускания), а также детекторами, в любой из ряда оптических конфигураций, известных специалистам в данной области техники.

**[245]** *Алгоритмы обработки изображений*

**[246]** В данном документе также раскрыты алгоритмы обработки изображений для применения с логометрическими способами визуализации изображений с целью повышения точности детекции и визуализации областей биологической активности в пределах визуализируемых биологических образцов. Раскрываемые в данном документе алгоритмы получения и отображения изображений отношения флуоресценции и областей, представляющих интерес (ROI), позволяют выполнять автоматизированную, полуавтоматизированную или ручную идентификацию ROI, соответствующей областям в пределах биологического образца, которые характеризуются специфической биологической активностью или структурой, представляющими интерес. В некоторых примерах ROI получают на основе изображений отношения флуоресценции. В некоторых примерах ROI получают на основе комбинации изображений отношения флуоресценции и/или изображений интенсивности флуоресценции.

**[247]** На **Фиг. 6** представлена схематическая иллюстрация системы визуализации флуоресценции, содержащая как компоненты аппаратного обеспечения, так и компоненты программного обеспечения. Как описано выше, в некоторых случаях компоненты аппаратного обеспечения системы содержат аппаратное обеспечение для получения изображений (например, источники света, фильтры возбуждения и излучения или эквиваленты, и детекторы, описанные выше), а также один или несколько процессоров, компоненты компьютерных запоминающих устройств (устройств памяти), компоненты отображения изображений, другие инструментальные контрольные модули (например, температурные контроллеры) и/или аппаратуру передачи данных. В некоторых случаях компоненты программного обеспечения системы содержат операционную систему, в пределах которой выполняются программные инструкции для одного или нескольких модулей программного обеспечения для получения изображений, обработки изображений

и/или отображения изображений, а также другие необязательные инструментальные контрольные модули программного обеспечения и модули передачи данных.

**[248]** Как отмечено выше, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрываемых логометрических способов визуализации флуоресценции один или несколько алгоритмов обработки изображений, которые кодируются набором инструкций модуля программного обеспечения для обработки изображений, используются для обеспечения выполнения автоматизированной, полуавтоматизированной или ручной идентификации ROI в пределах изображений, подлежащих анализу, которые соответствуют областям в пределах биологического образца, которые характеризуются специфической биологической активностью или структурой, представляющими интерес.

**[249]** На Фиг. 7 продемонстрирован алгоритм обработки изображений, используемый для детекции областей, представляющих интерес (ROI), которые характеризуются высокими значениями отношения флуоресценции и/или интенсивности флуоресценции в пределах изображения отношения флуоресценции и/или соответствующих изображений интенсивности флуоресценции. Изображения интенсивности флуоресценции при двух различных длинах волн излучения (интенсивность 1 и интенсивность 2) используют для расчета изображения отношения флуоресценции. В некоторых случаях изображения интенсивности подвергают вычитанию из фоновых значений и/или нормализуют на время экспозиции, используемое для получения изображений до расчета указанного отношения. В случае каждого из изображений отношения флуоресценции и интенсивности флуоресценции пороговые значения отношения или интенсивности используют с целью создания изображения маски (т.е., соответствующего файла двоичного изображения, в котором каждый пиксель, для которого исходное изображение характеризовалось значением отношения или интенсивности, равным или меньшим порогу, принимали за значение 0, и в котором каждый пиксель, для которого исходное изображение характеризовалось значением отношения или интенсивности, большим порога, принимали за значение 1). ROI выявляют в результате выполнения логической операции AND с целью комбинирования трех изображений маски. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полученные ROI необязательно оценивают для того, чтобы убедиться, что они соответствуют требованию минимального размера (т.е., с целью устранения однопиксельного шума или других артефактов детекции для того, чтобы убедиться в том, что они имеют биологическую значимость). Минимальная настройка ROI связана с оптическим разрешением системы визуализации, и ее выбирают таким образом, чтобы она превышала разрешение системы визуализации с целью избежания идентификации ложных результатов. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления алгоритм выполняют в полностью автоматизированном режиме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления его выполняют в полуавтоматизированном режиме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления его выполняют в ручном режиме. В некоторых случаях измерение среднего значения отношения флуоресценции и/или интенсивности флуоресценции в пределах ROI приводит к получению качественной характеристики биологической активности. В некоторых случаях измерение среднего значения отношения флуоресценции и/или интенсивности флуоресценции в пределах ROI приводит к получению количественной характеристики биологической активности.

**[250]** На Фиг. 10 изображен алгоритм обработки изображений, используемый для (i) идентификации областей, представляющих интерес (ROI), которые характеризуются высокими значениями отношения флуоресценции и/или интенсивности флуоресценции в пределах изображения интенсивности флуоресценции и/или соответствующих изображений интенсивности флуоресценции, и (ii) получения положительного или отрицательного прогноза биологической активности, определяемой с помощью логометрического флуоресцентного индикатора, используемого при получении изображений. Изображения интенсивности флуоресценции при двух различных длинах волн излучения (F1 и F2) используют для расчета изображения отношения флуоресценции. В некоторых случаях изображения интенсивности подвергают вычитанию из фоновых значений и/или нормализуют на время экспозиции, используемое для получения изображений до расчета указанного отношения. В некоторых случаях изображение отношения флуоресценции используют для детекции ROI. В некоторых случаях изображение отношения флуоресценции и одного из двух изображений интенсивности флуоресценции используют для детекции ROI. В некоторых случаях изображение отношения флуоресценции и обоих изображений интенсивности флуоресценции используют для детекции ROI. В случае каждого из выбранных изображений отношения флуоресценции и/или интенсивности флуоресценции величину(величины) пороговых значений отношения и/или интенсивности используют с целью создания изображения маски (т.е., соответствующего файла двоичного изображения, в котором каждый пиксель, для которого исходное изображение характеризовалось значением отношения или интенсивности, равным или меньшим порогу, принимали за значение 0, и в котором каждый пиксель, для которого исходное изображение характеризовалось значением отношения или интенсивности, большим порога, принимали за значение 1). В случаях, если используют как изображение отношения флуоресценции, так и по меньшей мере одно изображение интенсивности

флуоресценции, ROI выявляют в результате выполнения логической операции AND с целью комбинации двух или нескольких изображений маски. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полученные ROI необязательно оценивают для того, чтобы убедиться, что они соответствуют требованию минимального размера (т.е., с целью устранения однопиксельного шума или других артефактов детекции для того, чтобы убедиться в том, что они имеют биологическую значимость). Минимальная настройка ROI связана с оптическим разрешением системы визуализации, и ее выбирают таким образом, чтобы она превышала разрешение системы визуализации с целью избежания идентификации ложных результатов. Наличие подтвержденной ROI используют для получения положительного прогноза определенной биологической активности в пределах биологического образца, подлежащего изучению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритм выполняют в полностью автоматизированном режиме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления его выполняют в полуавтоматизированном режиме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления его выполняют в ручном режиме. В некоторых случаях измерение среднего значения отношения флуоресценции и/или интенсивностей флуоресценции в пределах ROI приводит к получению качественной характеристики биологической активности. В некоторых случаях измерение среднего значения отношения флуоресценции и/или интенсивностей флуоресценции в пределах ROI приводит к получению количественной характеристики биологической активности.

**[251] На Фиг. 11** продемонстрирован алгоритм обработки изображений, в котором выбранную пользователем ROI используют для получения положительного или отрицательного прогноза биологической активности, определяемой с помощью логометрического флуоресцентного индикатора, используемого при получении изображений. Изображения интенсивности флуоресценции при двух различных длинах волн излучения (F1 и F2) используют для расчета изображения отношения флуоресценции. В некоторых случаях изображения интенсивности подвергают вычитанию из фоновых значений и/или нормализуют на время экспозиции, используемое для получения изображений до расчета указанного отношения. В некоторых случаях изображение отношения флуоресценции используют для идентификации выбранной пользователем ROI. В некоторых случаях изображение отношения флуоресценции и одного из двух изображений интенсивности флуоресценции используют для идентификации выбранной пользователем ROI. В некоторых случаях изображение отношения флуоресценции и обоих изображений интенсивности флуоресценции используют для идентификации выбранной пользователем ROI. В случае каждого из

изображений отношения флуоресценции и/или интенсивности флуоресценции, для которых идентифицированы выбранные пользователем ROI, средние значения отношения и/или значения интенсивности в пределах выбранной пользователем ROI, рассчитывают и сравнивают с порогом(порогами) отношения и/или интенсивности флуоресценции с целью изображения маски (т.е., соответствующего файла двоичного изображения, в котором каждый пиксель, для которого исходное изображение характеризовалось значением отношения или интенсивности, равным или меньшим порогу, принимали за значение 0, и в котором каждый пиксель, для которого исходное изображение характеризовалось значением отношения или интенсивности, большим порога, принимали за значение 1). В случае, когда создают два или более изображения маски, то изображения маски затем комбинируют в результате выполнения логической операции AND с целью идентификации таких ROI, для которых были превышены пороговые значения. В некоторых случаях полученные ROI необязательно оценивают для того, чтобы убедиться, что они соответствуют требованию минимального размера (т.е., с целью устранения однопиксельного шума или других артефактов детекции для того, чтобы убедиться в том, что они имеют биологическую значимость). Минимальная настройка ROI связана с оптическим разрешением системы визуализации, и ее выбирают таким образом, чтобы она превышала разрешение системы визуализации с целью избежания идентификации ложных результатов. Наличие подтвержденной ROI используют для получения положительного прогноза определенной биологической активности в пределах биологического образца, подлежащего изучению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритм выполняют в полностью автоматизированном режиме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления его выполняют в полуавтоматизированном режиме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления его выполняют в ручном режиме. В некоторых случаях измерение среднего значения отношения флуоресценции и/или интенсивностей флуоресценции в пределах ROI приводит к получению качественной характеристики биологической активности. В некоторых случаях измерение среднего значения отношения флуоресценции и/или интенсивностей флуоресценции в пределах ROI приводит к получению количественной характеристики биологической активности.

**[252] На Фиг. 12** изображен один неограничивающий пример алгоритма обработки изображений, используемый для детекции наиболее точной комбинации порогов отношения и/или интенсивности флуоресценции с целью определения наличия биологической активности (например, повышенной внеклеточной ферментативной активности, коррелируемой с раком) в биологических образцах, которые были

инфузированы логометрическим флуоресцентным индикатором. Изображения интенсивности флуоресценции при двух различных длинах волн излучения используют с целью расчета изображения отношения флуоресценции для каждого из множества биологических образцов, т.е., образцов ткани, которые были инфузирваны логометрическим флуоресцентным индикатором. В некоторых случаях изображения интенсивности подвергают вычитанию из фоновых значений и/или нормализуют на время экспозиции, используемое для получения изображений до расчета указанного отношения. Исходное значение получают для первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции, порога отношения флуоресценции или их любой комбинации; и для каждого из биологических образцов повторяют этапы: i) обработки изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или их любую комбинацию с помощью алгоритма анализа изображений (например, алгоритма, продемонстрированного на **Фиг. 7**, **Фиг. 10** или **Фиг. 11**), где алгоритм анализа изображений использует порог отношения флуоресценции, первый порог интенсивности флуоресценции, второй порог интенсивности флуоресценции или их любую комбинацию с целью создания изображений маски изображения отношения флуоресценции и изображения(изображений) интенсивности флуоресценции, осуществляет логическую операцию AND в отношении изображений маски, если были созданы две или более изображений маски, необязательно проверяет то, что любые выявляемые области, представляющие интерес, которые характеризуются значением отношения или интенсивности флуоресценции, которое превышает определенный(определенные) порог(пороги) отношения или интенсивности флуоресценции, являются большими, чем определенный минимальный размер, и обеспечивает классификацию биологического образца как положительного или отрицательного в отношении определенной биологической активности (например, рака); ii) сравнения классификации, предусмотренной алгоритмом анализа изображений, с результатом лабораторного исследования при патологии, в случае биологического образца с целью определения того, является ли классификация истинно-положительной, ложно-отрицательной, истинно-отрицательной или ложно-положительной; и iii) хранения истинно-положительного, ложно-отрицательного, истинно-отрицательного или ложно-положительного результата. Указанные этапы затем повторяют с использованием возрастающего значения первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или порога отношения флуоресценции, при этом другие пороги поддерживают фиксированными до тех пор, пока все из биологических образцов не классифицируют как

отрицательные с помощью алгоритма обработки изображений. На кривых зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) откладывают клиническую чувствительность (или частоту «истинно-положительных результатов») в зависимости от  $(1 - \text{клиническая специфичность})$  (или «частоты ложно-отрицательных результатов»), и их используют стандартным образом с целью определения чувствительности и специфичности диагностических исследований. Кривую зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) рассчитывают с помощью сохраненных результатов классификации для каждой совокупности пороговых значений отношения и интенсивности флуоресценции; и площадь под кривой ROC сравнивают для каждой совокупности пороговых значений отношения и интенсивности флуоресценции с целью определения оптимальной настройки в случае значений порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или их любой комбинации.

**[253]** Один порог (т.е., порог отношения флуоресценции или порог интенсивности флуоресценции) варьирует, в то время как другой(другие) поддерживается(поддерживаются) фиксированным(фиксированными) с целью получения наиболее точного порога на основе сравнения данных визуализации с данными лабораторного исследования при патологии (или другими независимыми определениями биологической активности) для совокупности биологических образцов. Кривую зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) получают с помощью сравнения прогнозов на основе анализа изображений при различных порогах отношения и/или интенсивности флуоресценции, например, с результатами лабораторного исследования при патологии.

**[254]** В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритм оптимизации порогов выполняют в полностью автоматизированном режиме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления его выполняют в полуавтоматизированном режиме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления его выполняют в ручном режиме.

**[255]** Алгоритмы, описанные в данном документе, используют отдельно или в комбинации, с целью повышения клинической (или неклинической) чувствительности (или «частоты истинно-положительных результатов»), специфичности (или «частоты истинно-отрицательных результатов»), а также суммарной прогностической точности раскрываемых логометрических способов визуализации в случае детекции биологических активностей, представляющих интерес, с помощью логометрических флуоресцентных индикаторов. В некоторых случаях чувствительность составляет по меньшей мере 20%,

по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%. В некоторых случаях специфичность составляет по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%. Специалистам в данной области техники будет понятно, что каждое из чувствительности и специфичности отдельно может иметь любое значение в пределах указанных диапазонов, например, чувствительность может составлять 92%, а специфичность может составлять 94%. В некоторых случаях чувствительность и/или специфичность зависит от типа биологической активности (или коррелируемого патологического состояния), подлежащей выявлению. Например, чувствительность и/или специфичность могут варьировать в зависимости от определенного типа рака, который подлежит выявлению.

**[256]** В примерах, описанных ниже, алгоритмы обработки изображений, раскрываемые в данном документе, были внедрены с помощью находящегося в открытом доступе программного обеспечения ImageJ, разработанного Национальными институтами здоровья, однако, как будет понятно специалистам в данной области техники, они могут быть также внедрены с помощью любых из множества других языков программирования (например, в том числе без ограничения C, C++, Java, Fortran, Lua, Visual Basic и т.п.) и пакетов программного обеспечения (например, в том числе без ограничения Cell Profiler, Icy, LabVIEW, MatLab (Mathworks, Натик, Массачусетс), и т.п.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления алгоритмы обработки изображений, раскрываемые в данном документе, могут потенциально быть внедрены с помощью пользовательского закодированного программного обеспечения, которое облегчает выполнение алгоритмов, при этом они выполняются быстрее, используют меньше компьютерной памяти, выполняются на недорогих процессорах и т.д.

**[257]** *Компьютерные системы*

**[258]** Один или несколько процессоров используют для внедрения способов обработки изображений и алгоритмов, раскрываемых в данном документе. Один или несколько процессоров могут содержать аппаратный процессор, такой как центральный блок обработки информации (CPU), графический блок обработки информации (GPU), многоцелевой блок обработки информации или компьютерную платформу. Один или несколько процессоров могут состоять из множества подходящих интегральных схем, микропроцессоров, логических устройств и т.п. Несмотря на то, что настоящее раскрытие описано с ссылкой на процессор, другие типы интегральных схем и логических

устройств также могут быть применимы. Процессор может иметь любую подходящую производительность для обработки данных. Например, процессор может выполнять операции по обработке 512 бит, 256 бит, 128 бит, 64 бита, 32 бита или 16 бит данных. Один или несколько процессоров могут представлять собой одноядерные или многоядерные процессоры, или множество процессоров, сконфигурированных для параллельной обработки.

**[259]** Один или несколько процессоров или сама система визуализации флуоресценции могут представлять собой часть более крупной компьютерной системы и/или могут быть функционально связанными с компьютерной сетью («сетью») с помощью интерфейса связи для облегчения передачи и совместного использования данных изображений и результатов прогноза. Сеть может представлять собой локальную вычислительную сеть, интранет и/или экстранет, интранет и/или экстранет, которые находятся в связи с интернетом, или интернет. В некоторых случаях сеть представляет собой телекоммуникационную сеть и/или сеть данных. Сеть может содержать один или несколько компьютерных серверов, которые в некоторых случаях обеспечивают распределенные вычисления, такие как вычисления в облаке. В некоторых случаях сеть с помощью компьютерной системы может предусматривать одноуровневую сеть, которая может обеспечивать связь устройств с компьютерной системой, с целью выступления в роли клиента или сервера.

**[260]** Компьютерная система также может содержать память или расположения в памяти (например, оперативное запоминающее устройство, постоянное запоминающее устройство, флэш-память), электронные устройства хранения (например, жесткие диски), интерфейсы связи (например, сетевые адаптеры) для связи с одной или несколькими другими системами, и периферические устройства, такие как кэш, другая память, адаптеры хранения данных и/или адаптеры электронных дисплеев. Память, устройства хранения, интерфейсы и периферические устройства могут находиться в связи с одним или несколькими процессорами, например, CPU, с помощью коммуникационной шины, например, которая находится на материнской плате. Устройство(устройства) хранения может(могут) представлять собой устройство(устройства) хранения (или репозитории данных) для хранения данных.

**[261]** Один или несколько процессоров, например, CPU, выполняют последовательность машинно-распознаваемых инструкций, которые заложены в программе (или программном обеспечении). Инструкции хранятся в расположении в памяти. Инструкции направлены на CPU, которые впоследствии программируют или иным образом конфигурируют CPU с целью внедрения способов по настоящему раскрытию. Примеры операций, выполняемых

с помощью CPU, включают в себя выбор данных, дешифровку данных, выполнение и обратную запись данных. CPU может представлять собой часть схемы, такой как интегральная схема. Один или несколько других компонентов системы могут быть включены в схему. В некоторых случаях схема представляет собой специализированную интегральную схему (ASIC).

**[262]** Устройство хранения хранит файлы, такие как драйверы, библиотеки и сохраненные программы. Устройство хранения хранит пользовательские данные, например, определенные пользователем предпочтения и определенные пользователем программы. В некоторых случаях компьютерная система может содержать один или несколько дополнительных устройств хранения данных, которые являются внешними по отношению к компьютерной системе, например расположенными на удаленном сервере, который находится в связи с компьютерной системой с помощью интранета или интернета.

**[263]** Некоторые аспекты способов обработки изображений, предусмотренные в данном документе, такие как раскрываемые алгоритмы обработки изображений, внедряют с помощью кода, выполняемого машиной (например, процессором), хранящимся в электронном расположении хранения компьютерной системы, такой как, например, в блоке памяти или электронного хранения. Код, выполняемый машиной или распознаваемый машиной, предусмотрен в форме программного обеспечения. Во время использования код выполняется одной или несколькими процессорами. В некоторых случаях код извлекается из устройства хранения и хранится в памяти для легкого доступа со стороны одного или нескольких процессов. В некоторых ситуациях электронное устройство хранения исключают и инструкции, выполняемый машиной, хранятся в памяти. Код может быть заранее скомпилирован и сконфигурирован для применения с помощью машины, имеющей один или несколько процессоров, адаптированных для выполнения кода, или может быть скомпилирован во время работы. Код может поставляться с языком программирования, который выбирают для обеспечения выполнения кода в предварительно скомпилированном или скомпилированном по ходу режиме.

**[264]** Различные аспекты указанной технологии могут рассматривать в качестве «продуктов» или «готовых изделий», в типичном случае в форме кода, выполняемого машиной (или процессором), и ассоциированных данных, которые хранятся в типе машинно-распознаваемой среды. Код, выполняемый машиной, хранится в электронном устройстве хранения, таком как память (например, постоянное запоминающее устройство, оперативное запоминающее устройство, флэш-память) или на жестком диске. Носители

для типов «хранения» включают в себя любое или все из материальной памяти компьютеров, процессоров или т.п., или их ассоциированных модулей, таких как различные чипы полупроводниковых запоминающих устройств, ленточные накопители, дисковые накопители и т.п., которые могут предусматривать долговременное хранение информации в любое время для программного обеспечения, которое кодирует способы обработки изображений и алгоритмы, раскрываемые в данном документе.

**[265]** Все или часть из компьютерного кода может иногда быть связано с помощью интернета или различных других телекоммуникационных сетей. Такие коммуникации, например, позволяют загружать программное обеспечение с одного компьютера или процессора на другой, например, с сервера управления или хост-компьютера на компьютерную платформу сервера приложений. Таким образом, другие типы носителей, которые используют для передачи инструкций, кодируемых программным обеспечением, включают в себя оптические, электрические и электромагнитные волны, такие как волны, используемые в физических интерфейсах между локальными устройствами, с помощью проводниковых и оптических наземных сетей, и с помощью различных атмосферных связей. Физические элементы, которые переносят такие волны, такие как проводниковые или беспроводниковые связи, оптические связи или т.п., также считаются носителями, которые передают инструкции, кодируемые программным обеспечением, для осуществления способов, раскрываемых в данном документе. Используемые в данном документе, до тех пор, пока не ограничены долговременными, материальными носителями для «хранения», термины, такие как «носитель, распознаваемый» компьютером или машиной, относятся к любому носителю, который участвует в предоставлении инструкций процессору для выполнения.

**[266]** Компьютерная система в типичном случае содержит электронный дисплей или может находиться в связи с ним, с целью получения, например, изображений, полученных с помощью устройства визуализации. Дисплей в типичном случае также способен предусматривать интерфейс пользователя. Примеры UI включают в себя без ограничения графические интерфейсы пользователя (GUI), интерфейсы пользователя на основе веб-технологий и т.п.

### **Примеры**

**[267]** Данные примеры предусмотрены только для иллюстративных целей и не предполагают ограничивать объем формулы изобретения, предусмотренной в данном документе.

### **Примеры 1 – Логометрическая визуализация у людей**

**[268]** *Схема исследования.* Логометрическую визуализацию выполняли как часть фазы 1 открытого исследования с повышением дозы у женщин с первичным нерекуррентным раком молочной железы, подлежащих хирургическому вмешательству. Исследование включало 5 когорт доз для фазы повышения дозы с использованием схемы повышения когорты 3 + 3 при дозе 1 мг, с последующим использованием 6-й дополнительной когорты на основе характеристик флуоресценции и данных безопасности, наблюдаемых в каждой из групп дозы. В дополнительной когорте сравнивали характеристики флуоресценции в различное время введения SDM-25 (AVB-620) до хирургического вмешательства и визуализации. Пациенты получали инфузию SDM-25 за 2-20 часов до выполнения лампэктомии/мастэктомии и процедур биопсии сторожевых узлов/подмышечной диссекции. Анализ изображений выполняли в отношении изображений, полученных из образцов хирургического поля, а также хирургических образцов после вырезания, которые включали в себя выведенную первичную опухоль. Гистопатологические отчеты получали с целью установления корреляции результатов визуализации с гистопатологическими данными. SDM-25 вводили с помощью внутривенной (IV) инфузии, с последующей промывкой физиологическим раствором. Субъекты, включенные в когорты 1-4, получали интраперитонеальные (IP) инъекции за 12-20 часов до хирургической процедуры (предшествующий день). Субъекты в группе повышения дозы получали SDM-25 либо за 2-12 часов (тот же самый день), либо за 12-20 часов (предшествующий день) до хирургической процедуры.

**[269]** *Получение изображений.* Систему визуализации предоставляли со стороны спонсора исследования и использовали трехкамерную систему, которая одновременно фиксирует три пространственно регистрируемых изображения. Первой была цветная камера, а две другие камеры использовали для визуализации флуоресценции. Система визуализации отражает четыре изображения в реальном времени: цветное светлопольное изображение, изображение флуоресценции с использованием красителя Cy5, изображение флуоресценции с использованием красителя Cy7 и изображения отношения Cy5/Cy7, полученное на основе двух изображений флуоресценции. Фоновые изображения (при отключении возбуждающего света) получали до визуализации образцов. Время экспозиции изображений варьировало в зависимости от дозы и его корректировали таким образом, чтобы заполнить динамический диапазон датчиков камеры. Изображения *in vivo* получали из исходного хирургического поля, резуидальной части опухоли и подмышечного содержимого. После хирургического вырезания получали ряд изображений первичной опухоли, пограничных образцов и всех лимфатических узлов с под несколькими углами.

[270] *Анализ изображений.* Сохраненные изображения вырезанной ткани анализировали после хирургического вмешательства. Изображения с использованием Cy5 и Cy7 подвергали вычитанию из фоновых значений и использовали для получения изображений отношения Cy5/Cy7. Области опухоли (т.е., области, представляющие интерес (ROI)) идентифицировали в виде областей, характеризующихся высокими отношениями флуоресценции. ROI изображали таким образом, что анализировали только область изображения, содержащую ткань, представляющую интерес. С целью количественной оценки и сравнения в когортах показания интенсивности флуоресценции нормализовали на продолжительность экспозиции. Экспозицию, скорректированную на значения интенсивности флуоресценции, из ROI использовали для получения конечного изображения отношения ROI.

[271] ROI получали автоматически на основе определяемых пользователем порогов, показанных на **Фиг. 7**. В качестве альтернативы пользователи вручную выбирают ROI на основе отношения флуоресценции и/или интенсивностей Cy5/Cy7.

[272] *Гистопатологический анализ образцов тканей человека.* Гистопатологические отделения в различных исследовательских центрах исследовали хирургически вырезанную ткань в соответствии с протоколами местных отделений. Собирали данные в отношении размеров, степени опухоли, статуса узлов, в том числе гистологическую классификацию (например, инвазивный протоковый, инвазивный дольковый, дольковая карцинома и т.д.), а также в отношении статуса эстрогеновых рецепторов (ER), прогестероновых рецепторов (PR) и рецепторов HER2. Визуализацию и гистопатологическую корреляцию выполняли с использованием сопоставления данных из конечного гистопатологического отчета с результатами, полученными на основе анализа изображений, описанного выше.

[273] *Результаты.* Флуоресценция интенсивности как Cy5, так и Cy7 возрастала по мере повышения дозы SDM-25 как в вырезанной ткани после лампэктомии, так и в лимфатических узлах, как показано на **Фиг. 8А-Фиг. 8В**. **Фиг. 8А:** образцы после первичной лампэктомии; график средних интенсивностей Cy5 и Cy7 в случае вырезанной ткани первичного образца в зависимости от дозы. Значения получали на основе вырезанного образца. **Фиг. 8В:** группы отрицательных лимфатических узлов; график средних интенсивностей Cy5 и Cy7 в случае отрицательных лимфатических узлов для каждой когорты в исследовании. Значения получали на основе вырезанного образца. Планки погрешностей обозначают стандартные отклонения. При использовании только данных отношения флуоресценции данные отношения флуоресценции в случае

злокачественной первичной опухоли значительно отличались от таковых в случае прилегающей ткани, как в тот же день, так и за день до введения SDM-25 (Фиг. 9).

### **Пример 2 – Способы диагностики на основе порогов флуоресценции**

[274] Прогнозы на основе анализа изображений областей, в которых мог возникнуть рак, проводили с помощью отбора областей, в которых отношения флуоресценции  $Cy5/Cy7$  и интенсивность  $Cy5$  были высокими в случае изображений первичных образцов, полученных, как описано в Примере 1. Автоматизированные прогнозы на основе применения порогов отношения  $Cy5/Cy7$  и/или порогов интенсивности  $Cy5$  в комбинации с определением минимального размера в случае области выше порогового значения, получали с помощью находящейся в открытом доступе компьютерной программы ImageJ, разработанной Национальными институтами здоровья. В способе, изображенном на Фиг. 10, использовали анализ изображений с целью получения ROI. В качестве альтернативы выбранные пользователем ROI могли быть использованы для получения прогнозов на основе флуоресценции  $Cy5/Cy7$  и/или интенсивности  $Cy5$ , как показано на Фиг. 11. Для определенных порогов отношения  $Cy5/Cy7$  и/или интенсивности  $Cy5$  выполняли прогноз положительного или отрицательного результата. На Фиг. 11 показана технологическая схема, на которой представлен способ получения ROI на основе изображений отношения флуоресценции и отдельных изображений интенсивности флуоресценции. В указанном способе создавали маски изображений на основе порога отношения флуоресценции и/или комбинации порога отношения флуоресценции и отдельных порогов интенсивности флуоресценции. Затем комбинированное применение масок изображений использовали для получения ROI.

### **Пример 3 – Повышение диагностических характеристик с использованием как значений отношения флуоресценции, так и значений интенсивности флуоресценции**

[275] *Анализ кривой ROC.* Анализ кривой зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) использовали для определения оптимальных порогов отношения флуоресценции  $Cy5/Cy7$ , отдельных порогов интенсивности флуоресценции и комбинированных порогов интенсивности флуоресценции и отношения флуоресценции с целью повышения точности прогноза. На кривых ROC откладывали клиническую чувствительность (или частоту «истинно-положительных результатов») в зависимости от (1 – клиническая специфичность) (или «частоты ложно-отрицательных результатов»), и их использовали стандартным образом с целью определения клинической чувствительности и специфичности диагностического исследования. Кривые ROC получали с помощью прогнозов анализа изображений, описанных выше, в которых визуализированные образцы тканей исследовали в отношении положительного или

отрицательного результата в отношении рака, как показано на технологической схеме на **Фиг. 12**.

[276] *Образцы первичной опухоли.* Кривые ROC получали в результате сравнения прогнозов на основе анализа изображений изображений первичных образцов с помощью выбранных пользователем ROI с золотым стандартом результатов исследования при патологии, которые включали в себя оценки патологом срезов тканей, окрашенных гематоксилином и эозином (H&E), как показано на **Фиг. 11** и **FIG. 12**. Отношение  $Cy5/Cy7$  и интенсивность  $Cy5$  в ROI сравнивали при различных порогах с целью получения прогнозов при патологии. Кривые ROC получали на основе прогнозов патологии на основе порогов в случае комбинированного высокого отношения флуоресценции и площади высокой интенсивности (предположительно, являющихся положительными, прогноз либо истинно-положительный, либо ложно-отрицательный) и сниженного отношения  $Cy5/Cy7$  и прилегающей площади сниженной интенсивности  $Cy5$  первичного образца (предположительно, являющихся отрицательными, прогноз либо ложно-отрицательный, либо истинно-положительный). Указанные предположения соответствовали лабораторным исследованиям при патологии. Результаты изображены на **Фиг. 13А-Фиг. 13С**, на которых показано, что при наиболее высокой точности прогноза (максимальная «площадь под кривой» (AUC) в случае кривой ROC) использовали как отношение флуоресценции  $Cy5/Cy7$ , так и интенсивность  $Cy5$  (**Фиг. 13С**). **Фиг. 13А:** Кривая ROC, рассчитанная с помощью варьирования порога отношения флуоресценции. Данные изображений в случае всего времени введения (т.е., тот же самый день, предшествующий день) анализировали совместно. Площадь под кривой (AUC) = 0,86. **Фиг. 13В:** Кривая ROC, рассчитанная с помощью варьирования порога отношения флуоресценции, в то время как порог интенсивности флуоресценции поддерживали фиксированным при значении  $I = 80$ ; AUC = 0,98. Исходные 8-битовые изображения интенсивности увеличивали до 16-битового изображения с целью нормализации интенсивности до экспозиции 500 мс. **Фиг. 13С:** Кривая ROC, рассчитанная с помощью варьирования порога интенсивности флуоресценции, в то время как порог отношения флуоресценции поддерживали фиксированным при значении  $R = 60$  (на основе шкалы данных 8-битного изображения от 0 до 255); AUC = 0,99. В данном случае максимальную точность достигали с помощью комбинации отношения флуоресценции и порогов интенсивности.

[277] *Примеры лимфатических узлов.* Кривые ROC, изображенные на **Фиг. 14А-Фиг. 14В** в случае образцов лимфатических узлов, получали с помощью способов анализа изображений, продемонстрированных на **Фиг. 7**, **Фиг 10** и **Фиг. 12**, с целью прогноза

того, была ли ткань положительной или отрицательной в отношении определенного порога. **Фиг. 14А:** Кривая ROC, рассчитанная с помощью варьирования порога отношения флуоресценции; порог интенсивности флуоресценции устанавливали при  $I \geq 10$ ;  $AUC = 0,83$ . **Фиг. 14В:** Кривая ROC, рассчитанная с помощью варьирования порога отношения флуоресценции; порог интенсивности флуоресценции устанавливали при  $I \geq 60$ ;  $AUC = 0,95$ . В данном случае максимальную точность достигали с помощью комбинации отношения флуоресценции и порогов интенсивности.

**[278]** Кривые ROC также получали на уровне отдельного пациента. Кривые ROC в случае отдельного пациента изображены на **Фиг. 15А-Фиг. 15С**, и их получали с помощью технологических схем способа анализа изображений, изображенных на **Фиг. 7**, **Фиг. 10** и **Фиг. 12**, с целью прогноза того, была ли ткань положительной или отрицательной в отношении определенного порога. Образцы тканей *ex vivo*, которые визуализировали, включали в себя первичный образец, лимфатические узлы и пограничные области. **Фиг. 15А:** Кривая ROC порога отношения флуоресценции в случае отдельного пациента (порог интенсивности флуоресценции, принятый за  $I \geq 5$ ),  $AUC = 0,85$ . **Фиг. 15В:** Кривая ROC порога интенсивности флуоресценции (порог отношения флуоресценции, принятый за  $R \geq 5$ ),  $AUC = 0,83$ . **Фиг. 15С:** Комбинированное отношение флуоресценции и кривая ROC интенсивности флуоресценции в случае отдельного пациента; порог отношения флуоресценции повышали, в то время как порог интенсивности флуоресценции поддерживали фиксированным при  $I = 85$ ,  $AUC = 1,00$ . В данном случае максимальную точность снова достигали с помощью комбинации отношения флуоресценции и порогов интенсивности.

**[279] Клиническое исследование.** Пациентам вводили дозу 8 мг SDM-25 за день до операции (DBD). Методология визуализации и анализа основана на способе, описанном выше.

**[280] Примеры поверхностей после лампэктомии и пограничные области на основе клинического исследования.** Кривые ROC получали для вырезанных после лампэктомии поверхностей и образцов пограничных областей, полученных из хирургической полости с помощью способов анализа изображений, продемонстрированных на **Фиг. 7**, **10** и **12** с целью прогноза того, была ли ткань положительной или отрицательной в отношении определенного порога. Все данные образцов и поверхностей коррелировали с результатами гистопатологического исследования. Результаты площади под кривой ROC ( $AUC$ ), которые представляют собой показатель точности, представлены в Табл. 1 ниже.

Способ	Поверхности DBD (% AUC ROC)	Области DBD (% AUC ROC)
Отношение + интенсивность	63	67
Интенсивность	54	57
Отношение	57	57

[281] В обоих из указанных образцов ткани, изображенных в Табл. 1, максимальных диагностических характеристик или точности достигали с помощью комбинации порогов отношения и интенсивности.

**Пример 4 - Изображения, отображающие прогнозируемую связанную с раком активность при раке молочной железы человека, вырезанном от пациентов, которым вводили SDM-25**

[282] Целью данного способа было визуальное определение наличия рака интра- или периперационным путем. Иллюстративные изображения на основе исследования изображены на **Фиг. 16**. Области изображений, в которых отношение  $Cy5/Cy7$  и интенсивность  $Cy5$  были выше определенных пороговых величин, определяли с помощью способов, описанных выше, и представлены зеленым цветом. Другое значение порога отношения  $Cy5/Cy7$  использовали для изображений, полученных в тот же самый день, что и инфузия, чем то, которое использовали в случае изображений, полученных через день после инфузии. Как значения порогов отношения, так и значения порогов интенсивности были основаны на 8-битовом отображении изображений значений пикселей от 0 до 255, полученных на основе камеры. Значения порога интенсивности  $Cy5$  можно было вводить без смещения задвижки порога  $Cy5$  в программном обеспечении дисплея. Значения порогов отношения (8-битовые) переводили в процент ( $100 \times (\text{порог}/255)$ ) и вводили в результате смещения задвижки, меченой фоновым значением, в визуализаторе программного обеспечения. Значения пороговых значений интенсивности  $Cy5$  не корректировали на различия в экспозиции или интенсивности.

**Пример 5 - Изображения, отображающие прогнозируемую связанную с раком активность в первичных образцах после лампэктомии, вырезанных от пациентов, которым вводили SDM-25**

[283] *Примеры положительных границ поверхности после лампэктомии.* Иллюстративные изображения показаны на **Фиг. 19А-Фиг. 19В** поверхностей удаленных хирургическим путем первичных образцов после лампэктомии, изображенные вследствие

патологии положительными в отношении карциномы. Области изображений, в которых отношение  $Cy5/Cy7$  и интенсивность  $Cy5$  были выше определенных пороговых величин, определяли с помощью программного обеспечения ImageJ и способов, описанных выше, и снова представлены светло-серым цветом. Стрелка указывает на область выше порога, которая соответствует поверхности раздела, которая отражает рак в результате патологии. В указанном примере значения порога интенсивности  $Cy5$  корректировали на экспозицию с помощью программного обеспечения ImageJ.

**[284]** На **Фиг. 19А** и **Фиг. 19В** представлены примеры границ поверхности изображений образцов от пациентов, которым вводили дозу SDM-25 в количестве 8 мг, при этом визуализацию выполняли через день после инфузии. Область светло-серого цвета обозначает порог отношения флуоресценции  $Cy5/Cy7$  R 170 и порог интенсивности  $Cy5$   $I \geq 50$ . Стрелка указывает на область выше порога, которая соответствует поверхности раздела, которая отражает рак в результате патологии. Пороговые значения определяли с помощью описанных способов.

#### **Пример 6 – Логометрическая визуализация в мышинной модели рака молочной железы**

**[285]** *Мышиная модель in vivo.* Мышиную модель опухоли уха с метастазами в лимфатический сосуд и шейный лимфатический узел, используемую для оценки визуализирующего средства, разрабатывали на основе модификации способа, описанного в случае модели меланомы (Hoshida, *et al.* (2006), “Imaging Steps of Lymphatic Metastasis Reveals That Vascular Endothelial Growth Factor-C Increases Metastasis by Increasing Delivery of Cancer Cells to Lymph Nodes: Therapeutic Implications”, *Cancer Res.* 66:8065-75). Метастатические опухолевые клетки 4T1 из ATCC (CRL-2539™) выращивали и суспендировали в DPBS/Matrigel™ (объем 1:1) и затем инъецировали подкожно ( $4 \times 10^5$  опухолевых клеток/50 мл/мышь) в самок мышей BALB/c в области ушной раковины правого уха выше хряща ушной раковины в условиях кетамин-кселазиновой анестезии. Рост опухоли уха сопровождался метастазированием в шейные лимфатические узлы в результате миграции раковых клеток в лимфатические узлы. SDM-25 исследовали с использованием мышей, несущих опухоль уха, через 17-20 дней (опухолевая модель 4T1) после имплантации клеток ушной опухоли. Мышей, несущих опухоль, отбирали случайным образом, удерживая с помощью вращательного хвостового инъектора (Braintree Scientific, Inc., Массачусетс) и вводили внутривенно (хвостовая вена) раствор SDM-25 (60 мкМ SDM-25; 100 мкл/~20 грамм на мышь, т.е, 1,8 мг/кг массы тела). После введения каждую мышь, несущую опухоль, возвращали в предназначенную ей клетку и содержали в контролируемых условиях среды (пища и вода *ad libitum*) до исследования. В

общей сложности 30 мышей, несущих опухоль 4T1, исследовали через 3 ч (N = 9) и 6 ч (N = 21) после введения SDM-25.

**[286]** *Процедуры визуализации и аппаратное обеспечение.* Первичную опухоль и шейные лимфатические узлы визуализировали *in vivo* у мышей, несущих опухоль уха, терминально анестезированных смесью кетамина HCl/ксилазина HCl (100 мг/кг кетамина - 10 мг/кг ксилазина), вводимой интраперитонеально. Каждую мышь подвергали тупой диссекции ипсилатеральных (на стороне опухоли уха) и контралатеральных лимфатических узлов. После хирургического вмешательства шесть основных видимых поверхностных шейных лимфатических узлов (в том числе как ипсилатеральных, так и контралатеральных узлов) идентифицировали, увлажняли физиологическим раствором (0,9% раствор хлорида натрия для промывания, Фармакопоя США, В. Braun Medical Inc., Ирвайн, Калифорния) и визуализировали с помощью различных систем, в том числе: флуоресцентного стереомикроскопа SZX10 (Olympus Optical, CO, Ltd, Токио, Япония), соединенного с системой программного обеспечения HCImage для получения изображения от Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, K.K., Systems Division, Shizuoka-Pref, Япония); и пользовательской системой визуализации Navitar (Navitar Inc, Рочестер, Нью-Йорк), связанной интерфейсом с компьютерной программой Spot 5.0 для получения изображений, SPOT™ Imaging Solutions, Стерлинг Хайтс, Мичиган). Все из вышеупомянутых систем визуализации оснащали источником света LED, излучающим при ~630 +/- 20 нм с целью возбуждения флуорофора Cy5, и двумя фильтрами излучения для отдельного получения изображений интенсивности Cy5 и Cy7 одного и того же поля зрения.

**[287]** *Диагностический анализ изображений флуоресценции.* Шейные лимфатические узлы визуализировали и анализировали после введения SDM-25 в мышей, несущих опухоль. В случае каждой мыши, несущей опухоль, изображения флуоресценции Cy5 и Cy7, содержащие как ипсилатеральные, так и контралатеральные шейные лимфатические узлы, получали и использовали для получения изображений отношения флуоресценции Cy5/Cy7. Изображения отношения получали в результате деления изображения Cy5 на изображение Cy7 с помощью программы для обработки изображений ImageJ. В некоторых случаях взвешенное в отношении интенсивности псевдоцветное изображение отношения комбинировали с изображением отраженного света, для целей отображения. Эллиптическую или полигональную область, представляющую интерес (ROI), изображали для каждого лимфатического узла и измеряли отдельные усредненные интенсивности флуоресценции в ROI. Если отношение было однородным в исследуемом лимфатическом узле, то весь лимфатический узел использовали для ROI. Если имела место «горячая

точка», обозначенная в виде четко определенной области более высокого отношения флуоресценции (которая должна быть составлять >5% области лимфатического узла) на визуализированном шейном лимфатическом узле, то для анализа выбирали меньшую горячую точку ROI. Средние отношения флуоресценции  $Cy5/Cy7$  рассчитывали из каждой ROI.

**[288]** Для отображения изображений флуоресценции скорректированное на экспозицию изображение флуоресценции длины волны  $Cy5$ , делили на скорректированное на экспозицию изображение длины волны  $Cy7$ , визуализированной и умноженное на 15, для того, что бы значения изображения отношения заполняли 8-битовый динамический диапазон и находились между 0 и 255, как показано ниже. Затем использовали таблицу соответствия со значениями RGB, определенными для каждого уровня интенсивности, с целью псевдоокрашивания изображения отношения. Псевдоцветные изображения отношения масштабировали в отношении интенсивности флуоресценции в результате умножения псевдоцветного изображения либо на изображение флуоресценции длины волны  $Cy5$ , либо на изображение флуоресценции длины волны  $Cy7$ , приводя к получению изображений, на которых оттенок или цвет представляет отношение, а яркость представляет интенсивность флуоресценции.

Значение изображения отношения дисплея =  $15 * (ICy5/TCy5)/(ICy7/TCy7)$ ,

где:

$ICy5$  = интенсивность изображения флуоресценции длины волны  $Cy5$

$ICy7$  = интенсивность изображения флуоресценции длины волны  $Cy7$

$TCy5$  = время экспозиции  $Cy5$

$TCy7$  = время экспозиции  $Cy7$

**[289]** Сравнение рассчитанного отношения излучения флуоресценции и патологического статуса лимфатического узла (наличие/отсутствие раковых клеток), определенного исходя из анализа H&E окрашенных срезов шейных лимфатических узлов, использовали для оценки клинической чувствительности и специфичности. Кривые зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC), на которых отложена доля истинно-положительных результатов (частота истинно-положительных результатов) в зависимости от доли ложно-положительных результатов (частоты ложно-положительных результатов), затем конструировали для определения клинической чувствительности и специфичности SDM-25. В случае анализа кривой ROC данные разделяли на бинарную классификацию положительных результатов и отрицательных результатов, на основе значения порога для отношения излучения флуоресценции.

**[290]** Истинно-положительные результаты, ложно-положительные результаты, истинно-отрицательные результаты и ложно-отрицательные результаты определяли с помощью сравнения прогноза на основе данных отношения излучения флуоресценции и пороговых значений на основе визуализированных шейных сторожевых лимфатических узлов при наличии (положительные) или отсутствии (отрицательные) раковых клеток определенных патологом с использованием окрашенных Н&Е срезов тканей визуализированных шейных лимфатических узлов.

**[291]** Пороговое значение постепенно корректировали от низких до высоких значений с целью получения полной кривой ROC (1, 1) или всех положительных результатов до (0, 0) или всех отрицательных результатов. На практике кривую ROC получали в результате сортировки данных и с использованием пороговых значений, немного выше фактических значений для каждого исследуемого лимфатического узла. Таблицу Excel с использованием булевой логики применяли для расчета истинно-положительных результатов, ложно-отрицательных результатов, истинно-отрицательных результатов и ложно-положительных результатов для каждой точки в кривой ROC. Чувствительность рассчитывали в виде частоты истинно-положительных результатов, в то время как специфичность рассчитывали в виде единицы минус частота ложно-положительных результатов.

**[292]** *Гистопатологический анализ.* После визуализации каждую мышь терминально анестезировали, а шейные лимфатические узлы извлекали и фиксировали в 10% растворе забуференного формалина. Терминально анестезированную мышь незамедлительно подвергали эутаназии с помощью внутрисердечной передозировки кетамин-ксилазином. После фиксации в формалине в течение ночи шейные лимфатические узлы обрабатывали с помощью гистологического анализа для определения корреляции флуоресценция/рак. Парафиновые срезы (5 мкм) шейных сторожевых лимфатических узлов получали и обрабатывали с помощью стандартного окрашивания гематоксилином и эозином (Н&Е), выполняемого Zyagen (Сан-Диего, Калифорния) и HistoTox Labs, Inc. (Боулдер, Колорадо). Патогистологическое хирургическое определение, которое представляло собой классическое определение наличия/отсутствия метастатических раковых клеток в тканях шейных лимфатических узлов, проводили с участием сертифицированного патологоанатома в VA San Diego Health Care System (Сан-Диего, Калифорния). Окрашенные Н&Е срезы шейных лимфатических узлов исследовали слепым путем с помощью микроскопа Nikon Eclipse (Tochigi Nikon Precision Co., Ltd., Tochigi, Япония). Наличие или отсутствие метастатических раковых клеток в срезах Н&Е определяли в результате применения стандартных гистопатологических критериев.

**Пример 7 – Диагностическая визуализация *in vivo* в мышинной модели метастазирования в лимфатические узлы**

[293] Для оценки способности SDM-25 активироваться *in vivo* и визуализировать рак молочной железы в лимфатических узлах использовали рак молочной железы мышей в моделях лимфатических узлов. Схема протокола эксперимента изображена на **Фиг. 17А-Фиг. 17D**. Раковые клетки имплантировали в уши иммунокомпетентных мышей и через ~2 недели они метастазировали в шейные лимфатические узлы (**Фиг. 17А**). Вводили SDM-25 и через 3-6 ч мышей анестезировали, а шейные лимфатические узлы вырезали хирургическим путем и визуализировали (**Фиг. 17В-FIG. 17С**). В конечном итоге визуализированные лимфатические узлы удаляли, обрабатывали для определения патологии с использованием H&E и сравнивали результаты визуализации и патогистологического анализа (**Фиг. 17D**). В первой модели 30 самкам мышей BALB/c, несущих метастатические опухоли молочной железы 4T1 на ушной раковине уха, вводили внутривенно в хвостовую вену инъекцию SDM-25 (6 нмоль). Дозу для визуализации устанавливали исходя из исследований по определению оптимальной дозы от 2 до 24 нмоль/мышь. Доза 6 нмоль приводила к максимальной разнице отношения флуоресценции Cy5/Cy7 между злокачественными и незлокачественными лимфатическими узлами, при этом все еще приводя к образованию приемлемого отношения сигнал-фон интенсивности флуоресценции как в изображениях Cy5, так и в изображениях Cy7. Предхирургическую визуализацию флуоресценции дорсального переднего вида мыши и хирургически вырезанных лимфатических узлов выполняли через 3-6 ч. Предхирургические изображения демонстрировали первичную опухоль, имплантируемую в каждое ухо. Иллюстративное черно-белое изображение с наличием и без наличия наложенных изображений отношения флуоресценции показано на **Фиг. 18А**. Изображения демонстрировали, что подтвержденная при патогистологическом анализе первичная опухоль характеризовалась высоким отношением и интенсивностью флуоресценции Cy5/Cy7 по сравнению с оставшейся частью подвергнутого экспозиции организма. После хирургического вмешательства изображения отношения флуоресценции 60 лимфатических узлов анализировали и сравнивали с результатами золотого стандарта патогистологического исследования с использованием H&E с целью определения точности визуализации, результаты показаны на **Фиг. 18В**. Диагностическая чувствительность и специфичность составляли 96% и 100% соответственно с использованием порогов отношения, составляющих 6,7-7,4, которые приводили к максимальной суммарной точности 98%. Иллюстративное изображение от одной мыши показано на **Фиг. 18С**.

[294] Кинетика и стабильность разницы отношения флуоресценции  $Cy5/Cy7$  между не являющимися раковыми и метастатическими лимфатическими узлами оценивали через 1-48 ч после введения SDM-25. Результаты изображены на **Фиг. 18D**. Значимую разницу отношения флуоресценции наблюдали через 1 ч ( $p < 0,02$ , t-критерий), в то время как максимальную разницу наблюдали через 3-6 ч и она была стабильной до 24 ч. Указанное пригодное временное окно является гораздо большим, чем время полужизни SDM-25 в плазме крови у мышей, составляющее 0,24 ч. Через 48 ч разница отношения все еще оставалась значимой ( $p < 0,01$ , t-критерий), однако снижалась главным образом в результате повышения отношения  $Cy5/Cy7$  в невовлеченных лимфатических узлах. Данный результат существенно отличается от результата, полученного в случае логотметрических АСРР  $g9e9$ , которые, по-видимому, характеризуются максимальным контрастом через 2 часа и не указывают на разницу между злокачественной и незлокачественной тканью через 24 часа.

[295] Несмотря на то, что предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны в данном документе, для специалистов в данной области техники будет очевидным, что такие варианты осуществления предусмотрены только с целью примера. Многочисленные вариации, изменения и замены будут появляться для специалистов в данной области техники без отклонения от настоящего изобретения. Необходимо понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в данном документе, могут быть использованы в любой комбинации при практическом осуществлении настоящего изобретения. Предполагается, что последующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и то, что способы и структуры в пределах объема настоящей формулы изобретения и ее эквивалентов будут охвачены ей.

## **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ детекции областей биологической активности в биологическом образце, при этом способ включает:

- a) приведение в контакт биологического образца с логометрическим флуоресцентным индикатором биологической активности;
- b) получение первого изображения интенсивности флуоресценции биологического образца при первой длине волны излучения и второго изображения интенсивности флуоресценции при второй длине волны излучения;
- c) комбинирование первого изображения флуоресценции и второго изображения флуоресценции с целью создания изображения отношения флуоресценции;
- d) обработку изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с помощью алгоритма анализа изображений с целью детекции областей биологической активности, при этом алгоритм анализа изображений:
  - i) использует порог отношения флуоресценции, первый порог интенсивности флуоресценции, второй порог интенсивности флуоресценции или любую их комбинацию для создания изображения маски изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации,
  - ii) осуществляет логическую операцию AND в отношении двух или более изображений, выбранных из группы, состоящей из изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции и изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции, если два или больше изображений маски были созданы на этапе (i), и
  - iii) обеспечивает классификацию биологического образца либо как положительного либо как отрицательного в отношении биологической активности, при этом классификация основана на детекции области, представляющей интерес, в пределах изображения интенсивности флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции,

второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, которая была использована на этапе (i), которая характеризуется значением отношения флуоресценции или значением интенсивности флуоресценции, которое превышает значение порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой и комбинации, которая была использована на этапе (i), и

iv) необязательно хранит результат классификации в памяти компьютера.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий отображение области, представляющей интерес, в пределах изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации.
3. Способ по п. 1, где биологический образец представляет собой биологический образец *in vitro* или биологический образец *in vivo*.
4. Способ по п. 3, где биологический образец представляет собой клеточный образец, образец ткани *ex vivo* или образец ткани *in vivo*.
5. Способ по п. 1, где биологическая активность, подлежащая выявлению, коррелирует с заболеванием.
6. Способ по п. 5, где заболевание представляет собой артрит, атеросклероз, рак, предрак или воспаление.
7. Способ по п. 6, где рак представляет собой рак молочной железы.
8. Способ по п. 1, где биологическая активность, подлежащая выявлению, коррелирует со злокачественной тканью или коагуляцией (свертыванием крови).
9. Способ по п. 1, где этапы (b)-(e) повторяют два или больше раз через определенные интервалы времени с целью получения серии первых изображений интенсивности флуоресценции, вторых изображений интенсивности флуоресценции и изображений отношения флуоресценции для контроля изменения биологической активности с течением времени.
10. Способ по п. 2, где отображение области, представляющей интерес, предоставляется в реальном времени.

11. Способ по п. 10, где отображение области, представляющей интерес, используется хирургом в интраоперационных условиях с целью направления хирургической процедуры.
12. Способ по п. 10, где первое изображение интенсивности флуоресценции и второе изображение интенсивности флуоресценции получают с помощью эндоскопа, а отображение области, представляющей интерес, используют с целью направления расположения эндоскопа.
13. Способ по п. 1, где логометрический флуоресцентный индикатор содержит фрагмент донора флуоресценции и фрагмент акцептора флуоресценции, которые разделены расщепляемым линкером.
14. Способ по п. 13, где фрагмент донора флуоресценции и фрагмент акцептора флуоресценции представляют собой  $Cy5$  и  $Cy7$  соответственно.
15. Способ по п. 13, где расщепляемый фрагмент содержит пептидную связь, которая расщепляется протеазой.
16. Способ по п. 15, где протеаза представляет собой металлопротеазу, сериновую протеазу, треониновую протеазу или цистеиновую протеазу.
17. Способ по п. 1, где логометрический флуоресцентный индикатор содержит молекулу формулы (I):



где

X представляет собой расщепляемый линкер, который расщепляется протеазой,

A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 кислых аминокислотных остатков,

B представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 основных аминокислотных остатков,

каждое из  $C_A$ ,  $C_B$  и  $C_M$  независимо содержит от 0 до 1 аминокислотного остатка,

M представляет собой макромолекулу, и

$D_A$  и  $D_B$  представляют собой пару фрагментов акцептора и донора флуоресценции, которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции с одного на другой; и при этом  $[C_M - M]$  связан с любым положением на A или X,

[D<sub>A</sub>-с<sub>A</sub>] связан с любым аминокислотным остатком А и [с<sub>B</sub>-D<sub>B</sub>] связан с любым аминокислотным остатком В.

18. Способ по п. 17, где А представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 9 кислых аминокислотных остатков.
19. Способ по п. 17, где В представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 7 до 9 основных аминокислотных остатков.
20. Способ по п. 17, где А представляет собой пептидную последовательность, содержащую 5 или 9 последовательных глутаматных остатков, а В представляет собой пептидную последовательность, содержащую 8 или 9 последовательных аргининовых остатков.
21. Способ по п. 17, где каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо выбирают из D-аминокислоты, L-аминокислоты, α-аминокислоты, γ-аминокислоты или γ-аминокислоты.
22. Способ по п. 17, где каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо выбирают из любой аминокислоты, имеющей свободную тиоловую группу, любой аминокислоты, имеющей N-концевую аминогруппу, и любой аминокислоты с боковой цепью, способной образовывать оксимовую или гидразоновую связь при реакции с гидросиламиновой или гидразиновой группой.
23. Способ по п. 17, где каждое из с<sub>A</sub>, с<sub>B</sub> и с<sub>M</sub> независимо выбирают из D-цистеина, D-глутамата, лизина и пара-4-ацетил-L-фенилаланина.
24. Способ по п. 17, где X содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: PLGLAG, PLG-C(me)-AG, RPLALWRS, ESPAYYTA, DPRSFL, PPRSFL, RLQLKL и RLQLK(Ac)L.
25. Способ по п. 17, где X расщепляется металлопротеазой, сериновой протеазой, треониновой протеазой или цистеиновой протеазой.
26. Способ по п. 17, где D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub> представляют собой Cy5 и Cy7.
27. Способ по п. 17, где D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub> представляют собой Cy5 и IR Dye750.
28. Способ по п. 17, где D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub> представляют собой Cy5 и IR Dye800.
29. Способ по п. 17, где D<sub>A</sub> и D<sub>B</sub> представляют собой Cy5 и ICG.
30. Способ по п. 17, где молекула формулы (I) представляет собой SDM-25.
31. Способ по п. 30, где только порог отношения флуоресценции используют для создания файла маски.

32. Способ по п. 1, где первое и второе изображения интенсивности флуоресценции нормализуют на время экспозиции изображения перед созданием изображения отношения флуоресценции.

33. Способ по п. 1, где среднее отношение флуоресценции или среднее значение интенсивности флуоресценции в пределах области, представляющей интерес, предоставляет качественную или количественную характеристику биологической активности в области, представляющей интерес.

34. Способ по п. 1, где алгоритм обработки изображений дополнительно предусматривает проверку того, что выявляемая область, представляющая интерес, является большей, чем определенный минимальный размер.

35. Способ автоматизированной оптимизации порогов отношения флуоресценции и интенсивности флуоресценции, используемых с целью детекции областей биологической активности в логометрических изображениях флуоресценции биологических образцов, при этом способ включает:

- a) предоставление множества биологических образцов;
- b) приведение в контакт каждого из биологических образцов с логометрическим флуоресцентным индикатором биологической активности;
- c) получение первого изображения интенсивности флуоресценции при первой длине волны излучения и второго изображения интенсивности излучения при второй длине волны излучения для каждого из биологических образцов;
- d) комбинирование первого изображения флуоресценции и второго изображения флуоресценции с целью создания изображения отношения флуоресценции для каждого из биологических образцов;
- e) предоставление исходного значения для первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции, отношения отношения флуоресценции или любой их комбинации; и
- f) для каждого из биологических образцов:
  - i) обработку изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с помощью алгоритма анализа изображений, при этом алгоритм анализа изображений:

использует порог отношения флуоресценции, первый порог интенсивности флуоресценции, второй порог интенсивности флуоресценции или любую их комбинацию для создания изображения маски изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации,

осуществляет логическую операцию AND в отношении двух или более изображений, выбранных из группы, состоящей из изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции и изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции, если два или больше изображения маски были созданы в предыдущем этапе,

необязательно проверяет то, что выявляемая область, представляющая интерес, в пределах изображения отношения флуоресценции, первого изображения интенсивности флуоресценции, второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации является большей, чем определенный минимальный размер, при этом выявляемая область, представляющая интерес, представляет собой область, которая характеризуется значением отношения флуоресценции или интенсивности флуоресценции, которое превышает значение порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, и

обеспечивает классификацию биологического образца как положительного в отношении биологической активности, если область, представляющая интерес, была выявлена, или обеспечивает классификацию биологического образца как отрицательного в отношении биологической активности, если область, представляющая интерес, не была выявлена;

ii) сравнение классификации, предусмотренной алгоритмом анализа изображений с результатом лабораторного исследования при патологии в случае биологического образца с целью определения является ли

классификация истинно-положительной, ложно-отрицательной, истинно-отрицательной или ложно-положительной;

iii) хранение истинно-положительного, ложно-отрицательного, истинно-отрицательного или ложно-положительного результата классификации в памяти компьютера; и

g) повторение этапа (f) с:

i) постепенно возрастающим значением первого порога интенсивности флуоресценции, при этом второй порог интенсивности флуоресценции и порог отношения флуоресценции поддерживают фиксированными до тех пор, пока все из биологических образцов не классифицируют как отрицательные с помощью алгоритма обработки изображений, или

ii) постепенно возрастающим значением второго порога интенсивности флуоресценции, при этом первый порог интенсивности флуоресценции и порог отношения флуоресценции поддерживают фиксированными до тех пор, пока все из биологических образцов не классифицируют как отрицательные с помощью алгоритма обработки изображений, или

iii) постепенно возрастающим значением отношения флуоресценции, при этом первый порог интенсивности флуоресценции и второй порог интенсивности флуоресценции поддерживают фиксированными до тех пор, пока все из биологических образцов не классифицируют как отрицательные с помощью алгоритма обработки изображений;

h) расчет кривой зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) с помощью сохраненных результатов классификации для каждой совокупности значений порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции и второго порога интенсивности флуоресценции; и

i) сравнение площади под кривой ROC для каждой совокупности значений порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции и второго порога интенсивности флуоресценции с целью оптимальных условий для порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации.

36. Способ по п. 35, где биологический образец представляет собой клеточный образец, образец ткани *ex vivo* или образец ткани *in vivo*.

37. Способ по п. 35, где биологическая активность, подлежащая выявлению, коррелирует с заболеванием.
38. Способ по п. 37, где заболевание представляет собой артрит, атеросклероз, рак, предрак или воспаление.
39. Способ по п. 35, где биологическая активность, подлежащая выявлению, коррелирует со злокачественной тканью или коагуляцией (свертыванием крови).
40. Способ по п. 38, где рак представляет собой рак молочной железы.
41. Способ по п. 35, где логометрический флуоресцентный индикатор содержит фрагмент донора флуоресценции и фрагмент акцептора флуоресценции, которые разделены расщепляемым линкером.
42. Способ по п. 41, где фрагмент донора флуоресценции и фрагмент акцептора флуоресценции представляют собой Cy5 и Cy7 соответственно.
43. Способ по п. 41, где расщепляемый фрагмент содержит пептидную связь, которая расщепляется протеазой.
44. Способ по п. 43, где протеаза представляет собой металлопротеазу, сериновую протеазу, треониновую протеазу или цистеиновую протеазу.
45. Способ по п. 35, где логометрический флуоресцентный индикатор представляет собой SDM-25, меченый Cy5 и Cy7.
46. Способ выполнения диагностического исследования на наличие рака на основе логометрической визуализации флуоресценции, при этом способ включает:
- a) приведение в контакт биологического образца с логометрическим флуоресцентным индикатором;
  - b) облучение биологического образца возбуждающим светом первой длины волны возбуждения;
  - c) получение первого изображения интенсивности флуоресценции биологического образца при первой длине волны излучения;
  - d) последовательное или одновременное получение второго изображения интенсивности флуоресценции биологического образца при второй длине волны излучения; и
  - e) обеспечение компьютерной обработки изображения с целью комбинирования первого изображения интенсивности флуоресценции и второго изображения

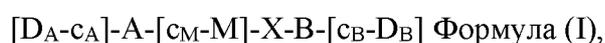
интенсивности флуоресценции для создания изображения отношения флуоресценции, при этом используется алгоритм обработки изображений для детекции или отображения области, представляющей интерес, в пределах изображения отношения флуоресценции, которое коррелирует с относящейся к раку биологической активностью.

47. Способ по п. 46, где первое изображение интенсивности флуоресценции и второе изображение интенсивности флуоресценции нормализуют на время экспозиции изображения перед созданием изображения отношения флуоресценции.

48. Способ по п. 46, где алгоритм обработки изображений включает использование порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с целью детекции области, представляющей интерес, которая коррелирует с относящейся к раку биологической активностью.

49. Способ по п. 48, где алгоритм обработки изображений дополнительно включает: (i) применение порога отношения флуоресценции, первого порога интенсивности флуоресценции, второго порога интенсивности флуоресценции или любой их комбинации с целью создания изображения маски изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, (ii) осуществление логической операции AND в отношении изображения маски изображения отношения флуоресценции, изображения маски первого изображения интенсивности флуоресценции, изображения маски второго изображения интенсивности флуоресценции или любой их комбинации, если два или больше изображения маски были созданы на этапе (i), и (iii) необязательно проверку того, что область, представляющая интерес, является большей, чем определенный минимальный размер, и (iv) обеспечение классификации биологического образца как положительного в отношении связанной с раком активности, если область, представляющая интерес, была выявлена, или классификацию биологического образца как отрицательного в отношении связанной с раком активности, если область, представляющая интерес, не была выявлена.

50. Способ по п. 46, где логометрический флуоресцентный индикатор представляет собой молекулу формулы (I):



где

X представляет собой расщепляемый линкер, который расщепляется протеазой,

A представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 кислых аминокислотных остатков,

B представляет собой пептид с последовательностью, содержащей от 5 до 20 основных аминокислотных остатков,

каждое из  $s_A$ ,  $s_B$  и  $s_M$  независимо содержит от 0 до 1 аминокислотного остатка,

M представляет собой макромолекулу, и

$D_A$  и  $D_B$  представляют собой пару фрагментов акцептора и донора флуоресценции, которые способны подвергаться резонансному переносу энергии флуоресценции с одного на другой; и при этом  $[s_M - M]$  связан с любым положением на A или X,  $[D_A - s_A]$  связан с любым аминокислотным остатком A и  $[s_B - D_B]$  связан с любым аминокислотным остатком B.

51. Способ по п. 50, где логотметрический флуоресцентный индикатор представляет собой SDM-25, меченый  $Cy5$  и  $Cy7$ .

52. Способ по п. 46, где связанная с раком биологическая активность ассоциирована с меланомой, немеланомным раком кожи, раком легких, раком молочной железы, раком предстательной железы, колоректальным раком, раком поджелудочной железы, раком печени, раком яичников, раком шейки матки, раком головы и шеи, раком лимфатических узлов, раком щитовидной железы, глиомой, раком желудочно-кишечного тракта или саркомой.

53. Способ по п. 46, где пациента инфузируют логотметрическим флуоресцентным индикатором и способ используется для детекции рака молочной железы в образцах, полученных после хирургического вмешательства.

54. Способ по п. 46, где клиническая чувствительность диагностики рака составляет более 70%.

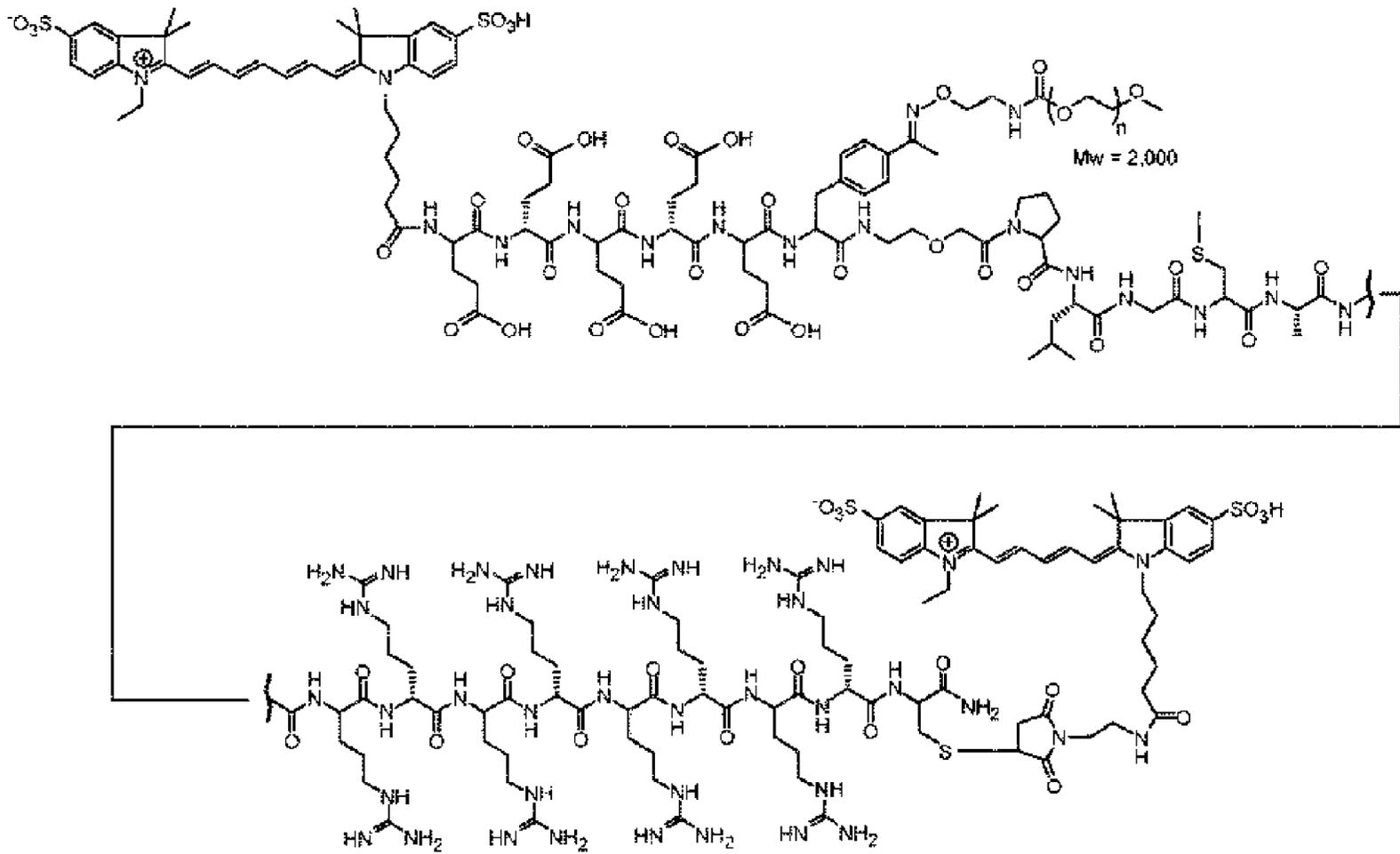
55. Способ по п. 46, где клиническая специфичность диагностики рака составляет более 70%.

56. Способ по п. 46, где пациента инфузируют логотметрическим флуоресцентным индикатором и способ используют интраоперационно с целью направления хирургической процедуры.

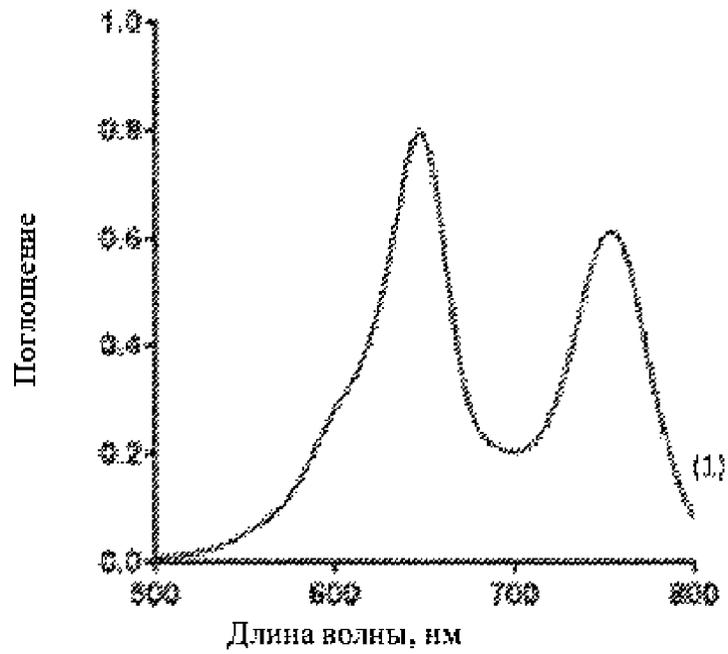
57. Способ по п. 46, где способ обеспечивает результат исследования, который используется врачом или медицинским работником для постановки диагноза или принятия решения о лечении.

58. Способ по п. 46, где результат исследования передается из места, где способ осуществляется, в местонахождение врача или медицинского работника.

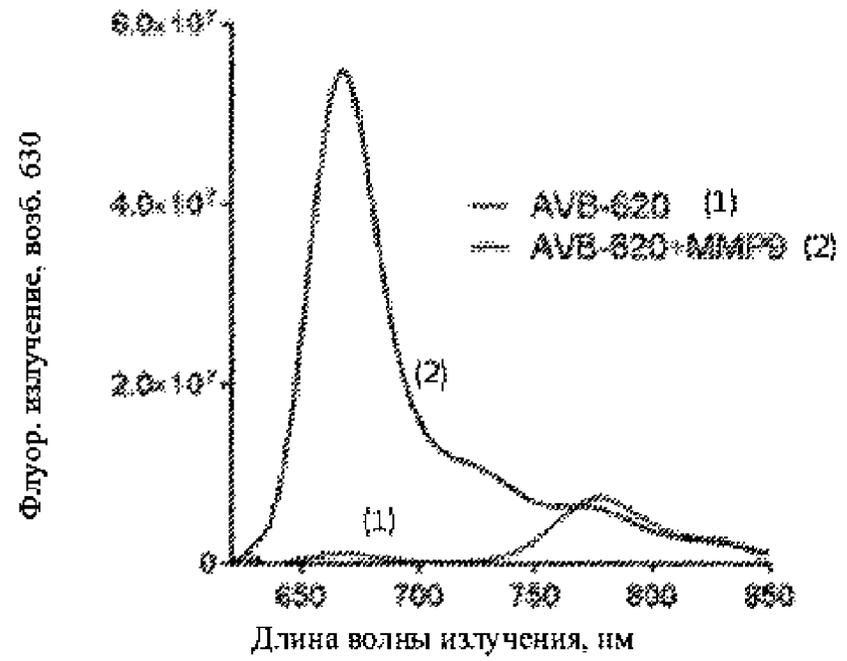
59. Способ по любому из предыдущих пунктов, где статус границы рака определяют интраоперационно.



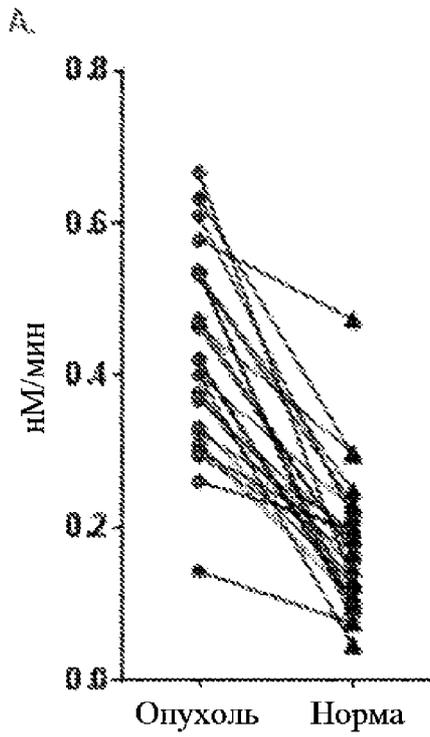
ФИГ. 1



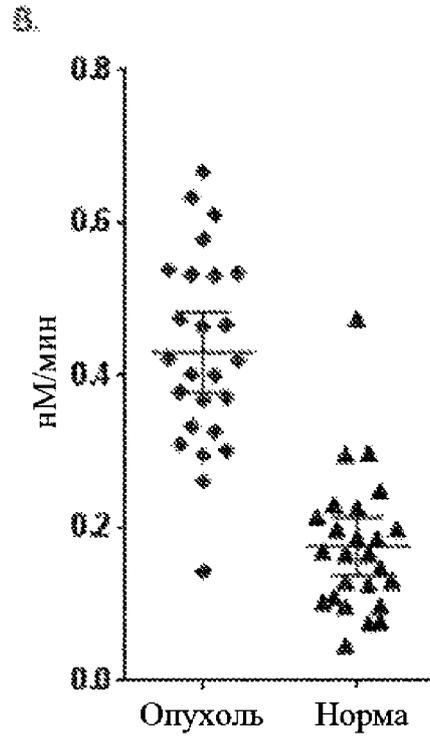
ФИГ. 2А



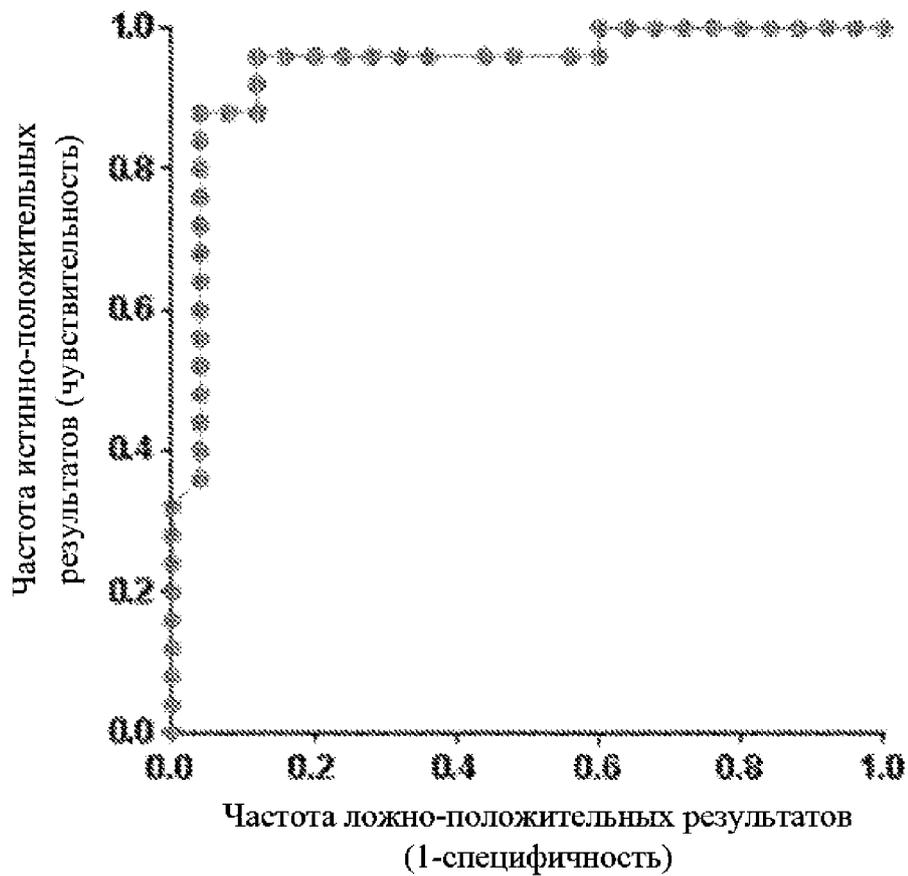
ФИГ. 2В



ФИГ. 3А

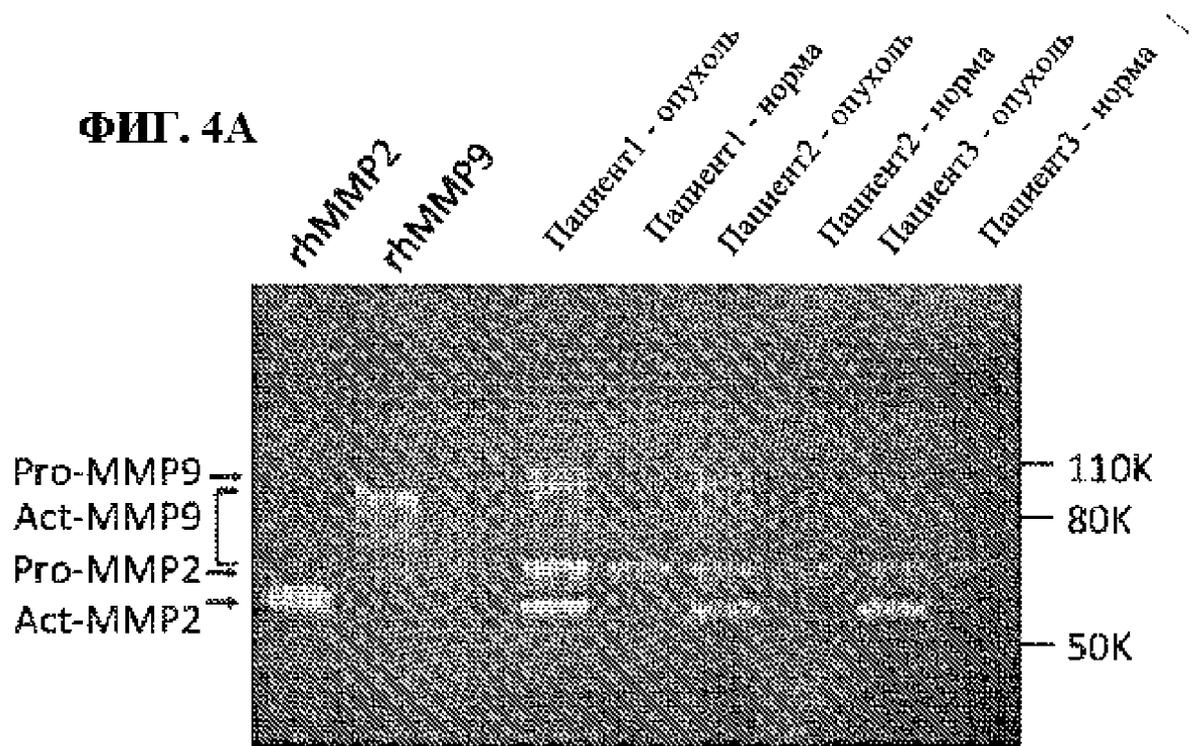


ФИГ. 3В

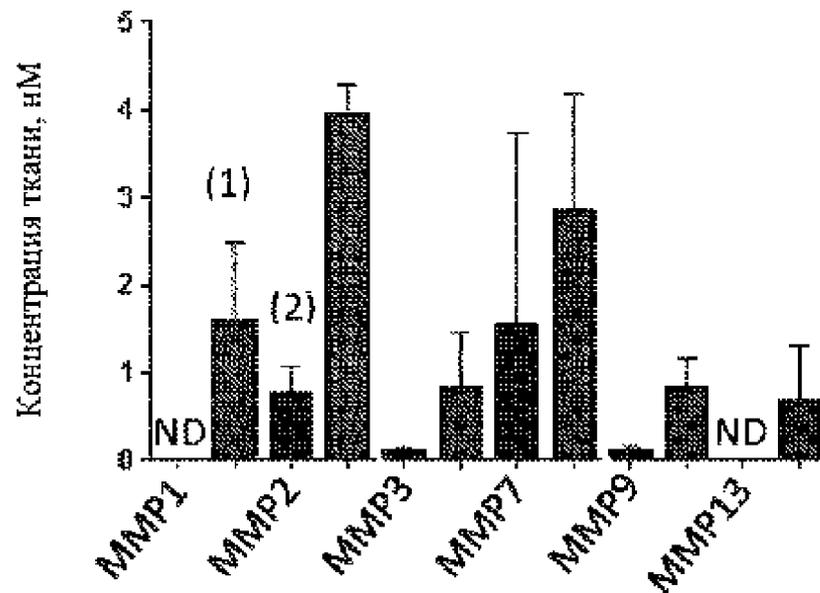


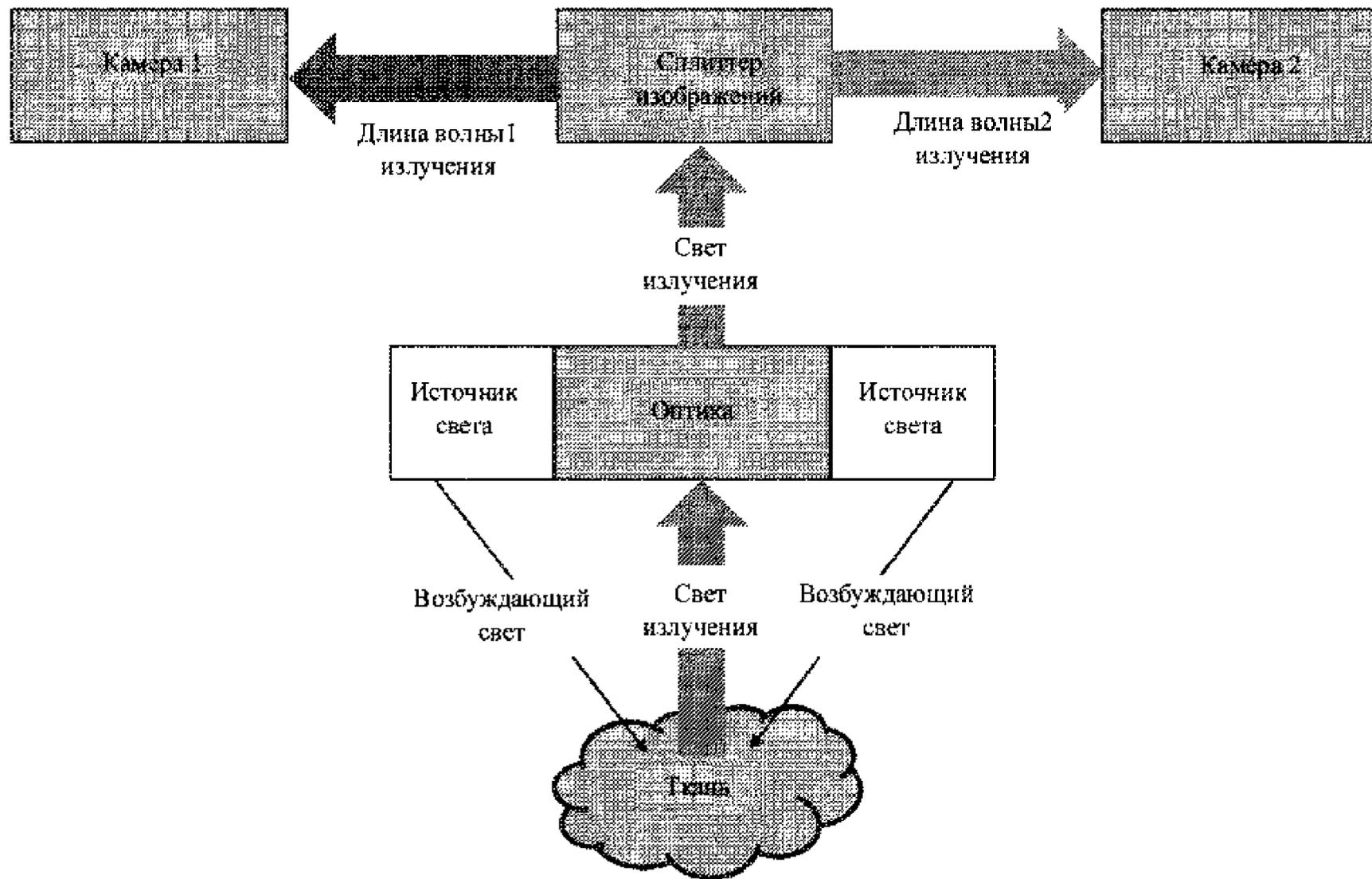
ФИГ. 3С

ФИГ. 4А



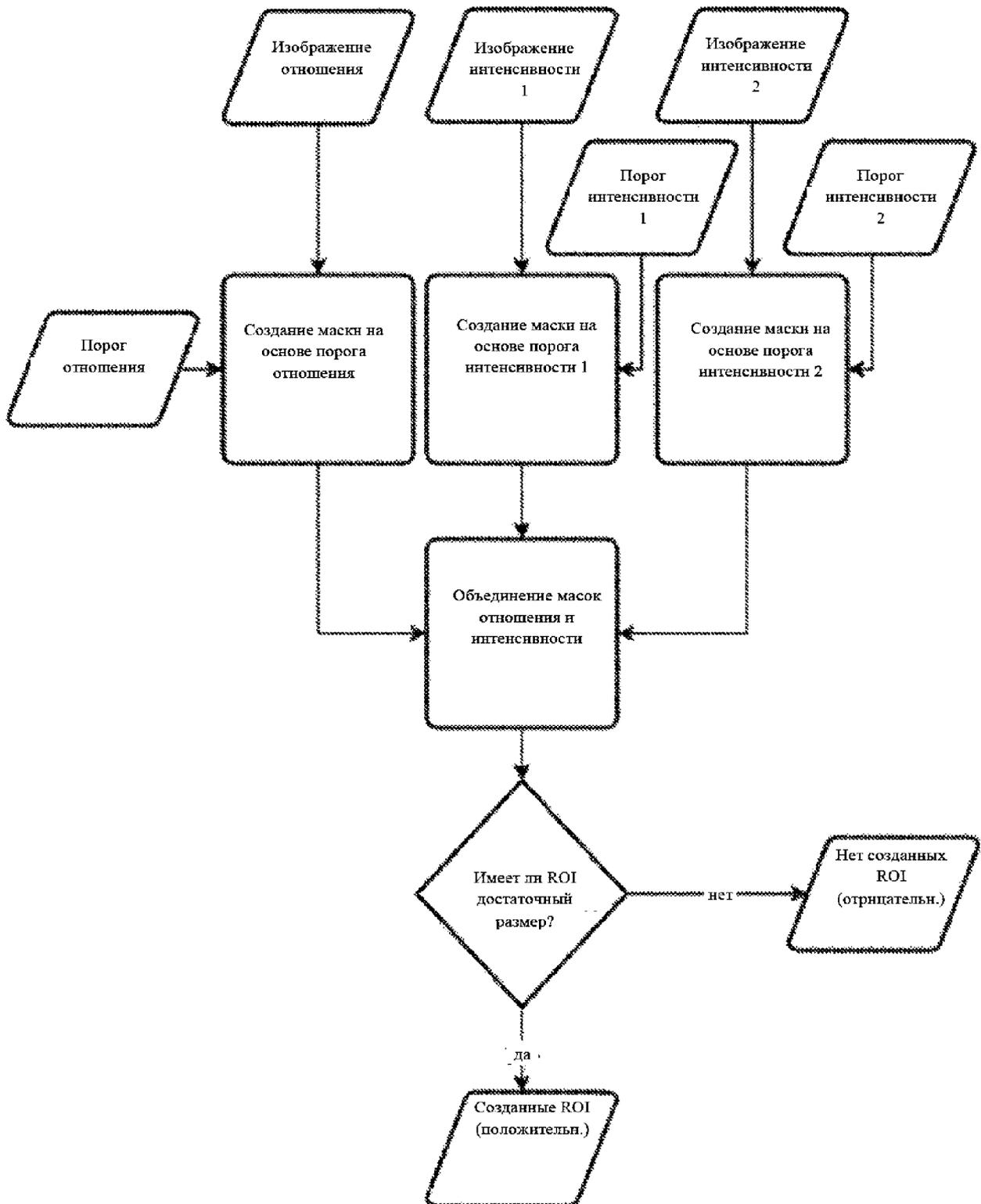
ФИГ. 4В





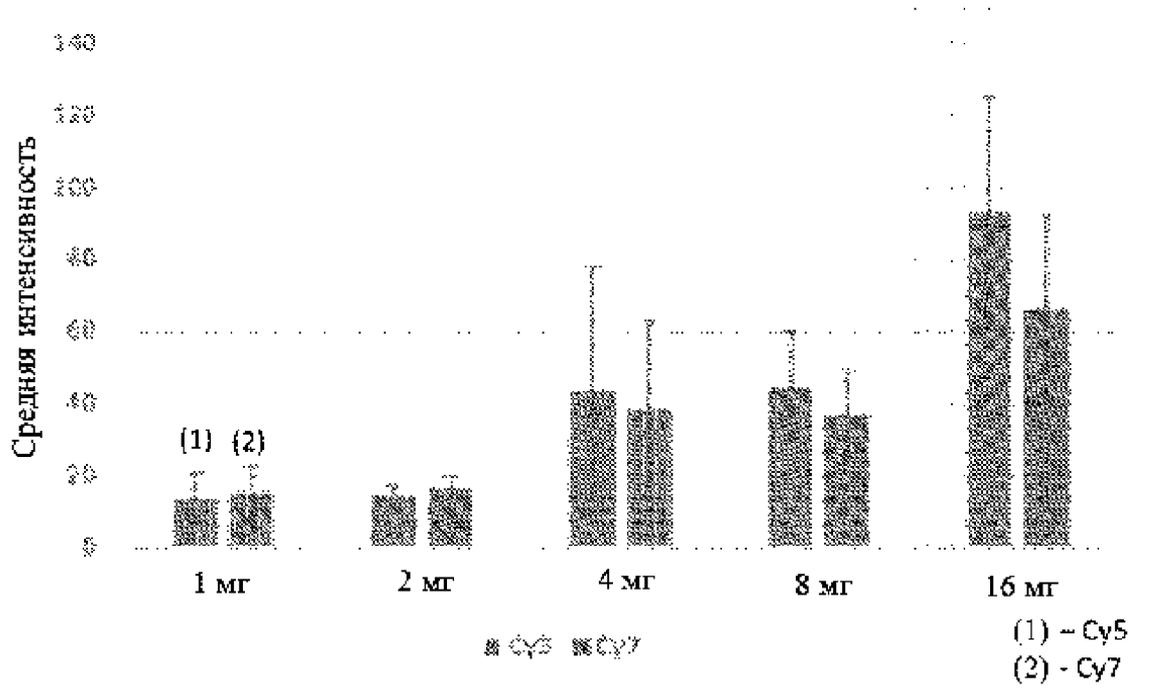
ФИГ. 5

**ФИГ. 6**

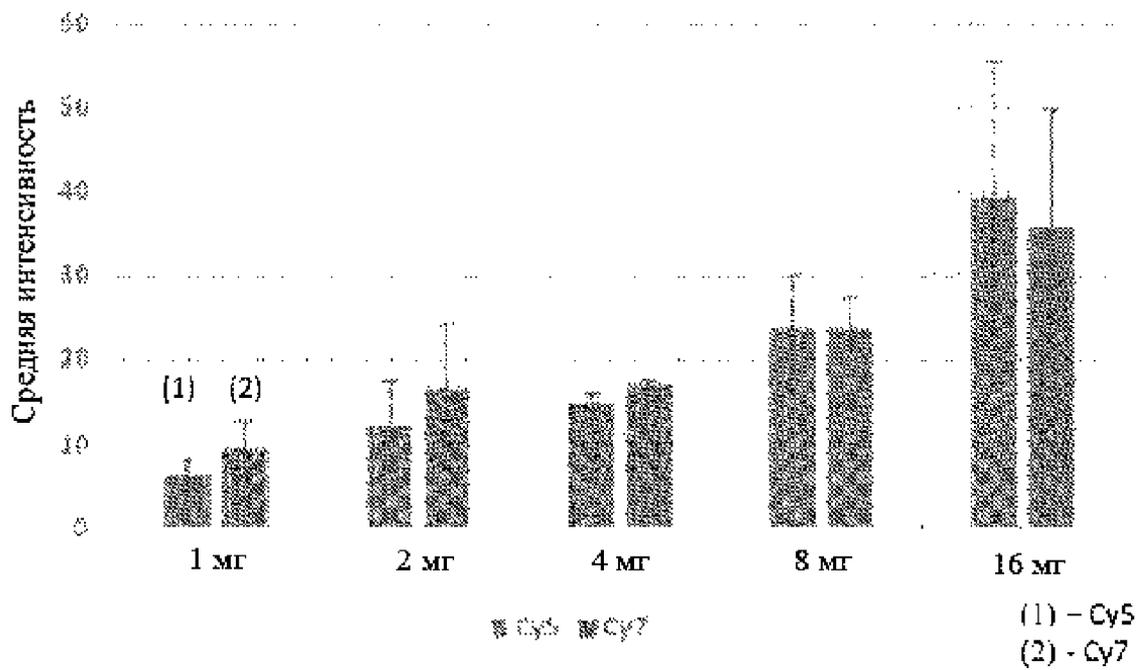


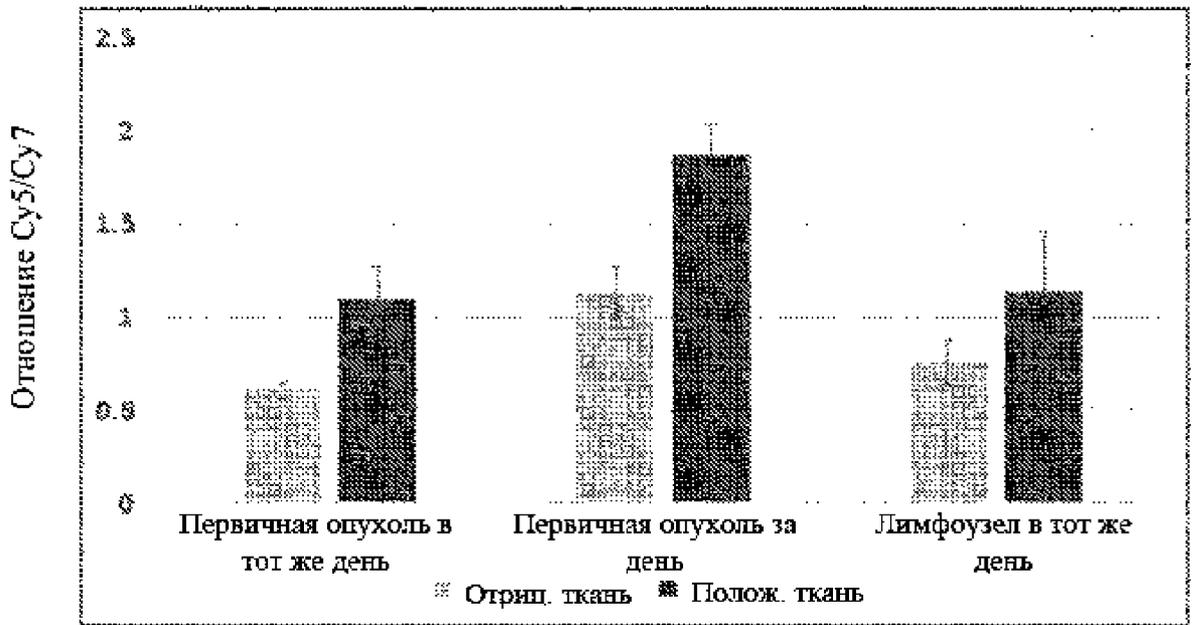
ФИГ. 7

ФИГ. 8А

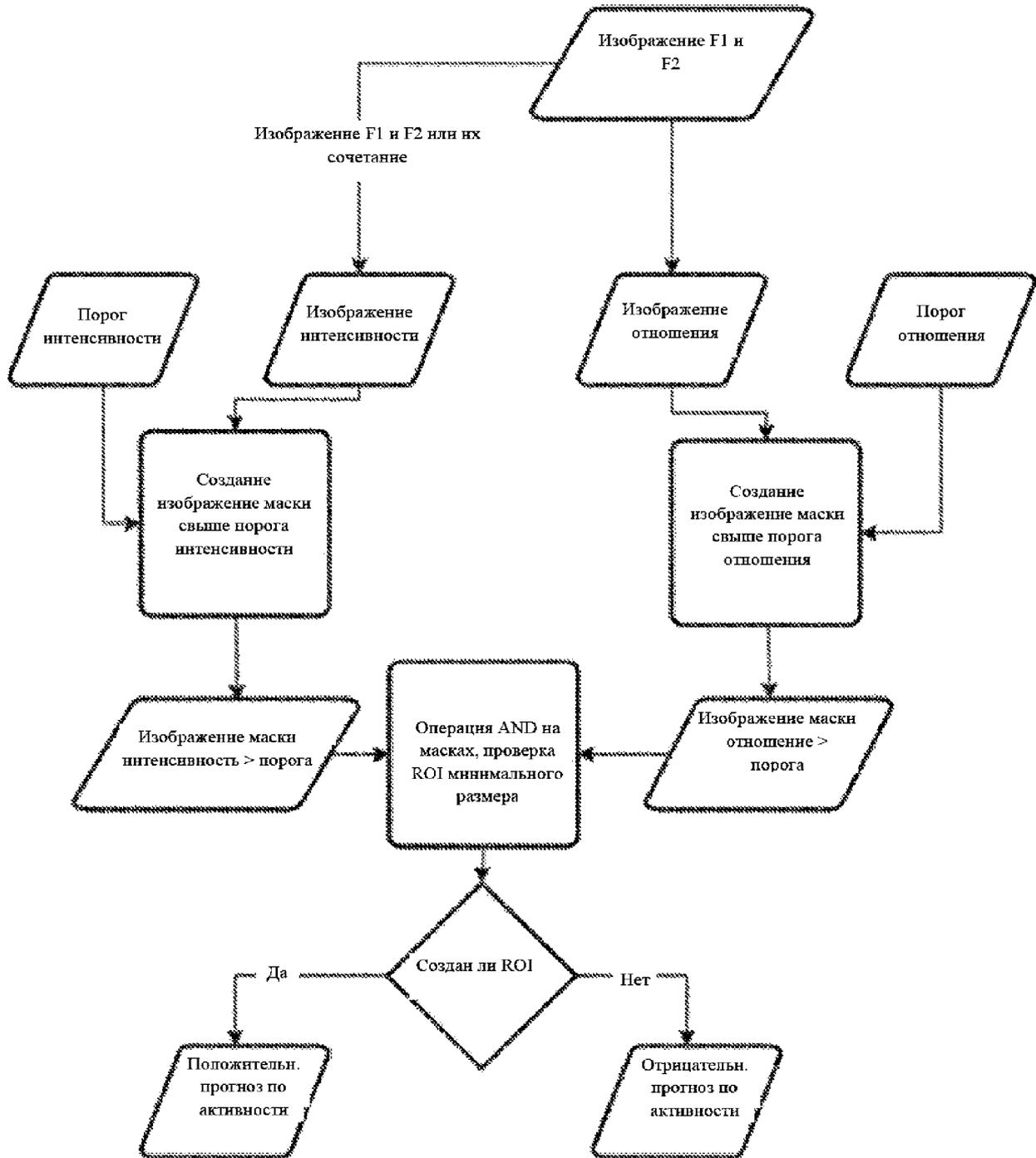


ФИГ. 8В

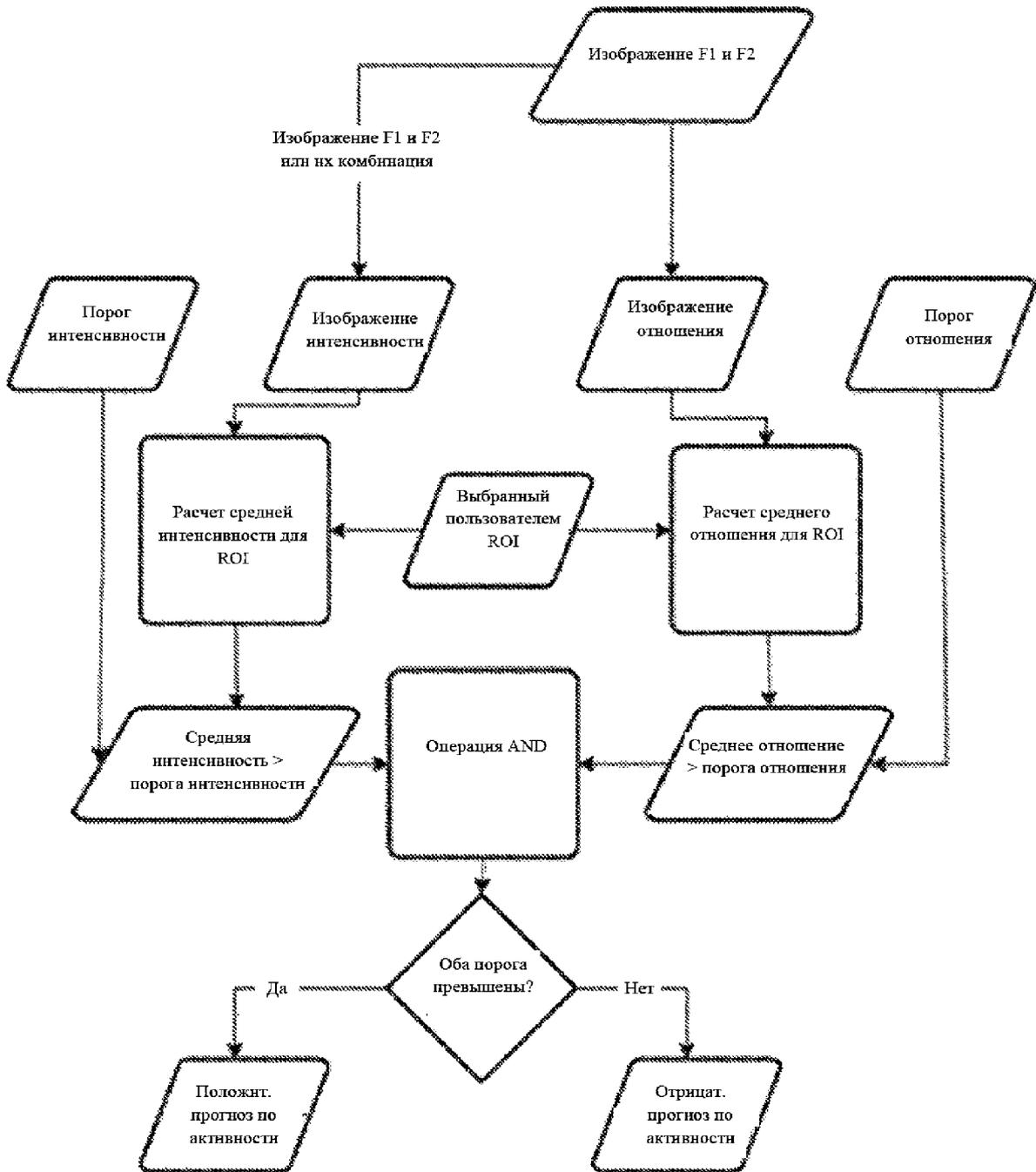




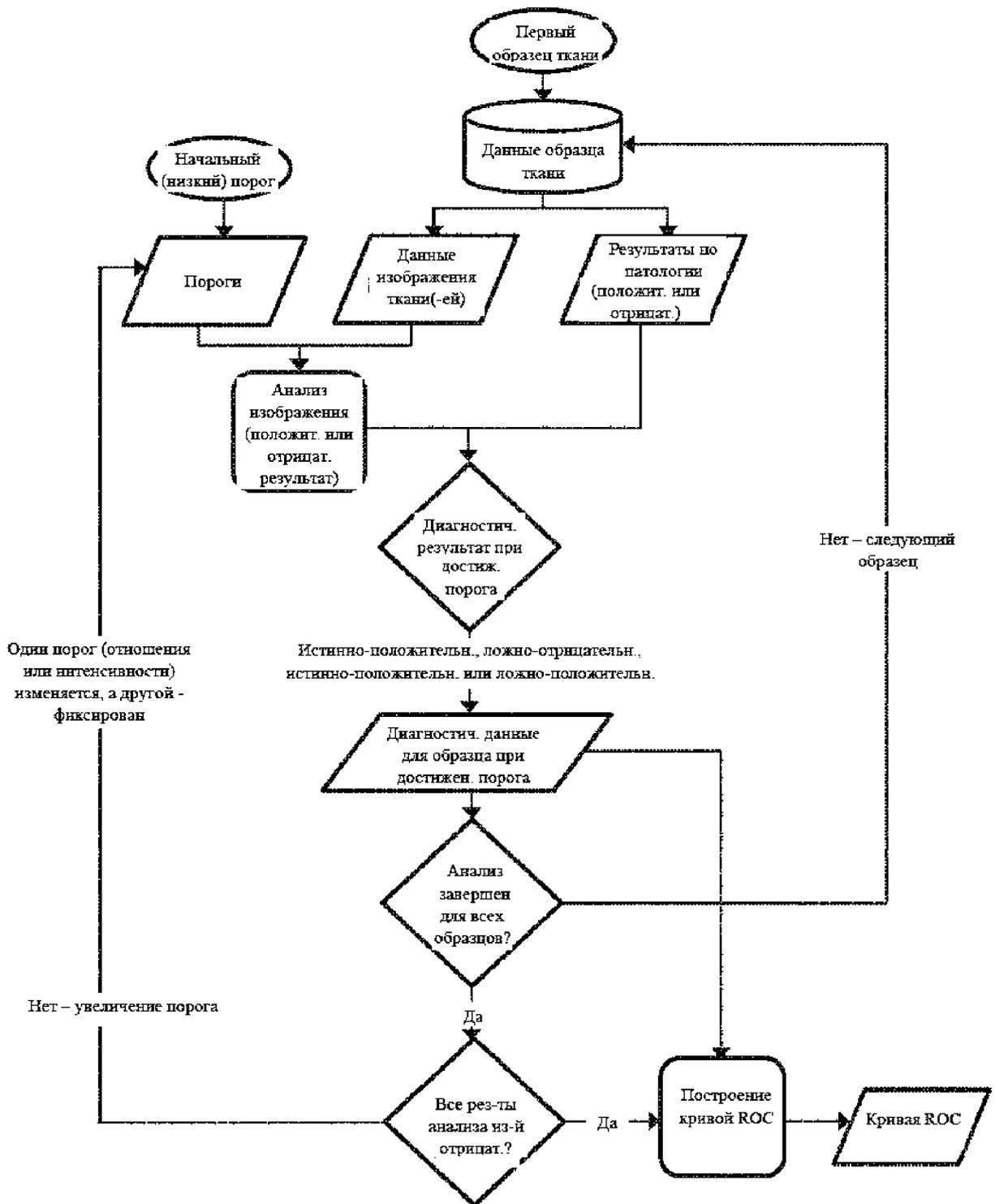
ФИГ. 9



ФИГ. 10

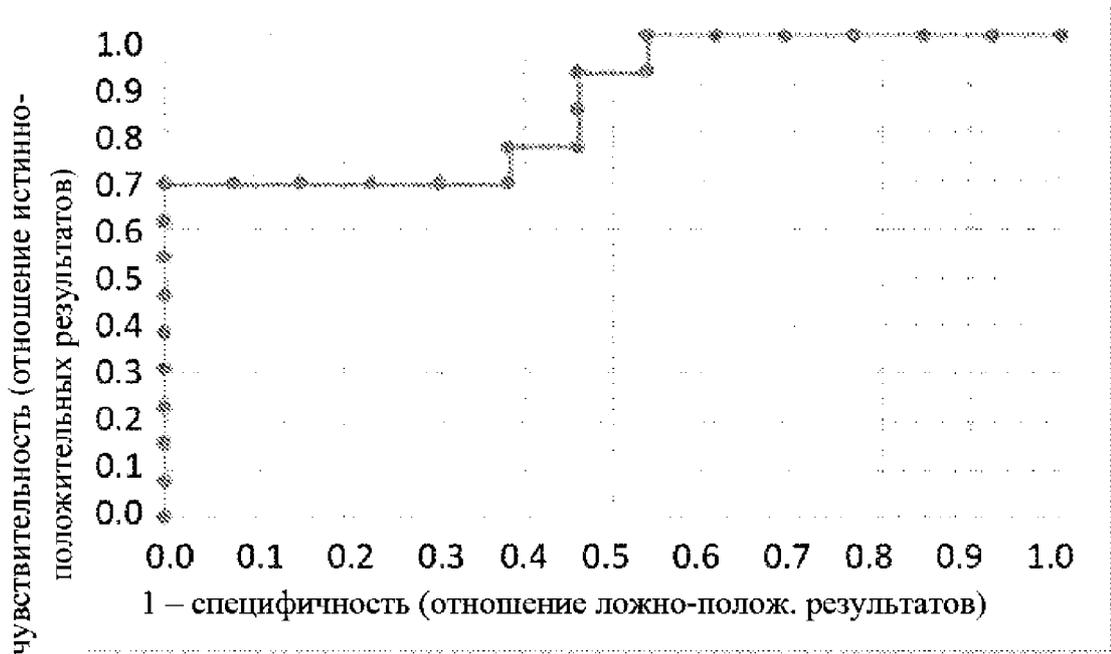


ФИГ. 11

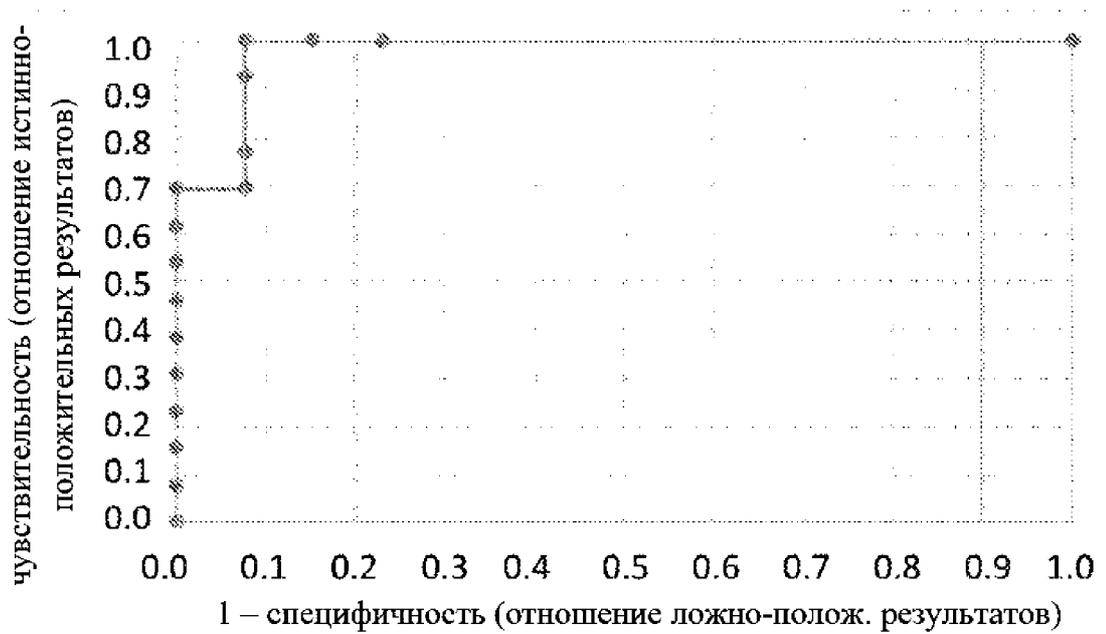


ФИГ. 12

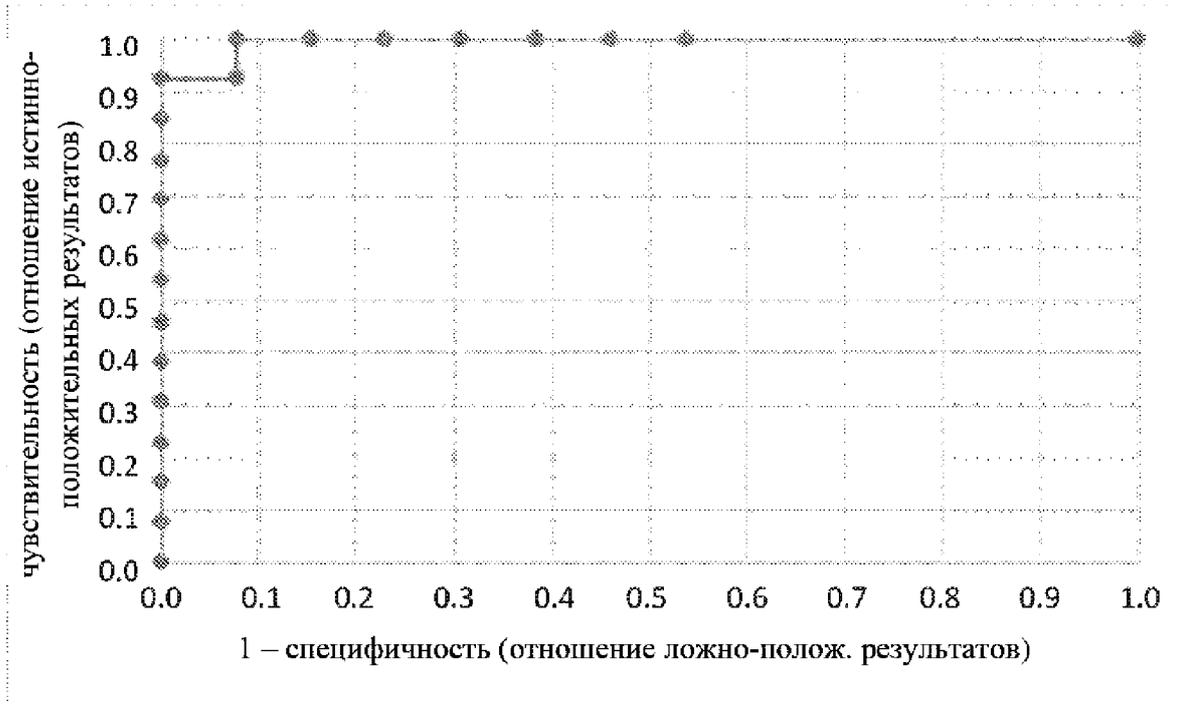
ФИГ. 13А



ФИГ. 13В



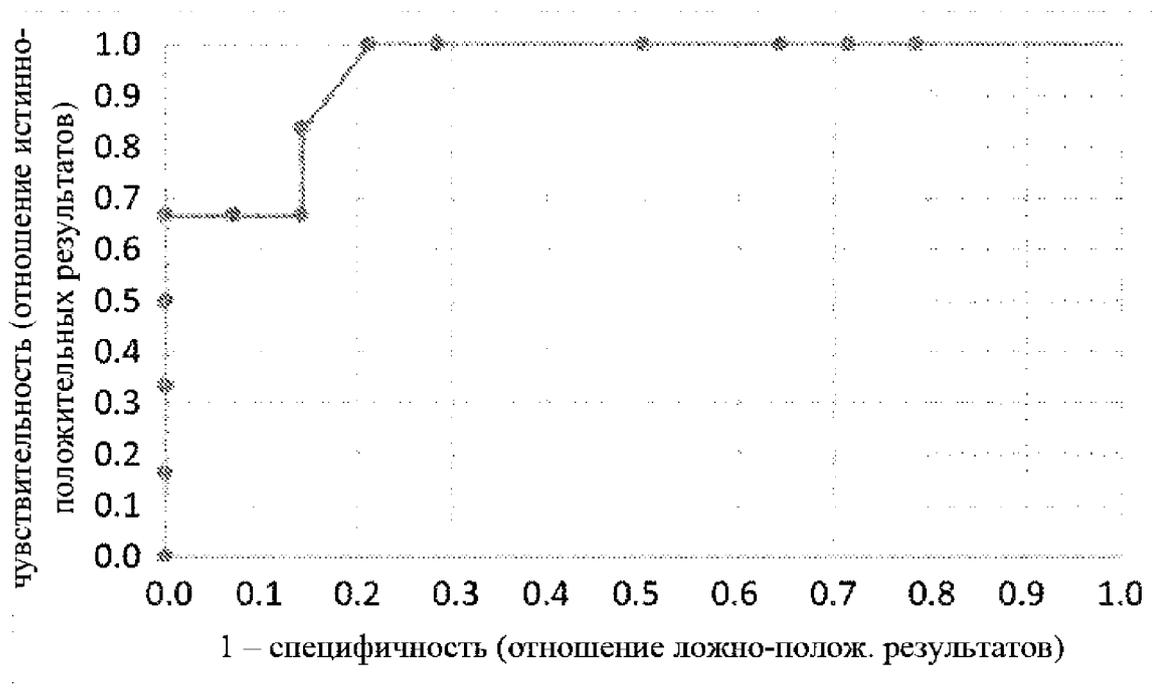
ФИГ. 13С



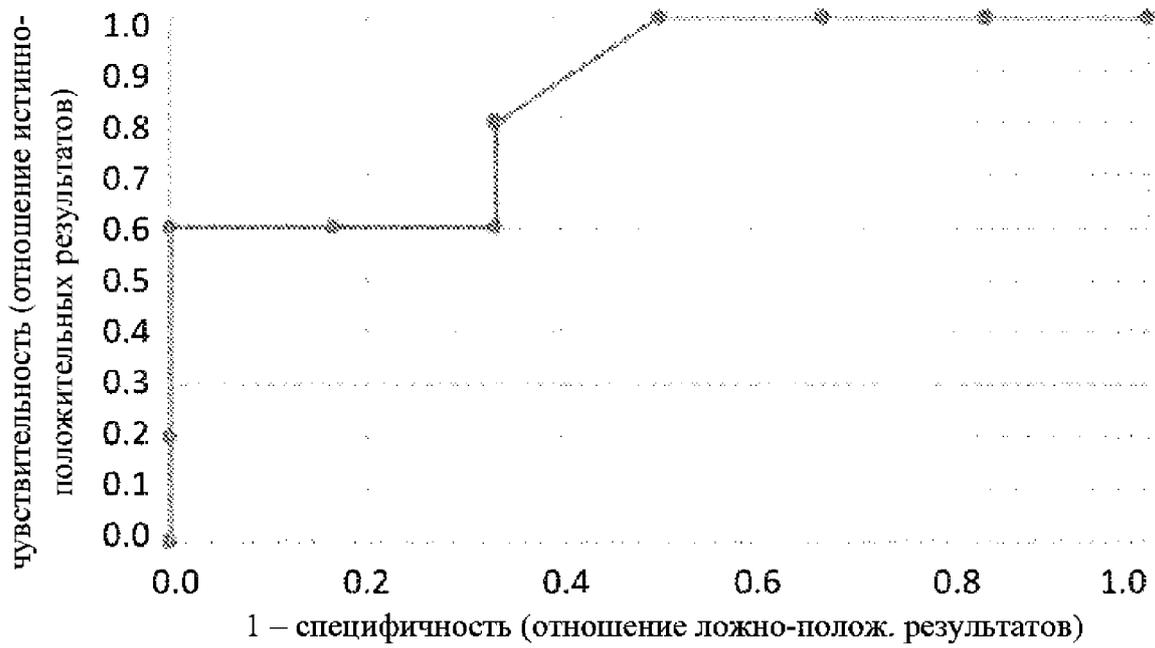
ФИГ. 14А



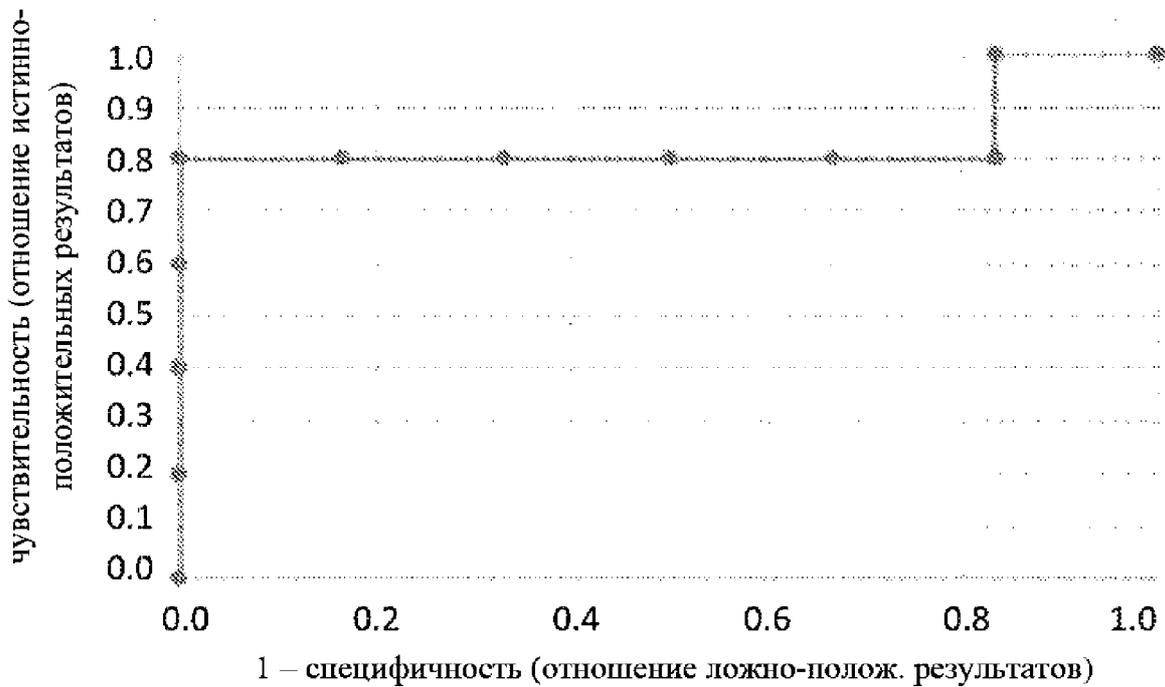
ФИГ. 14В



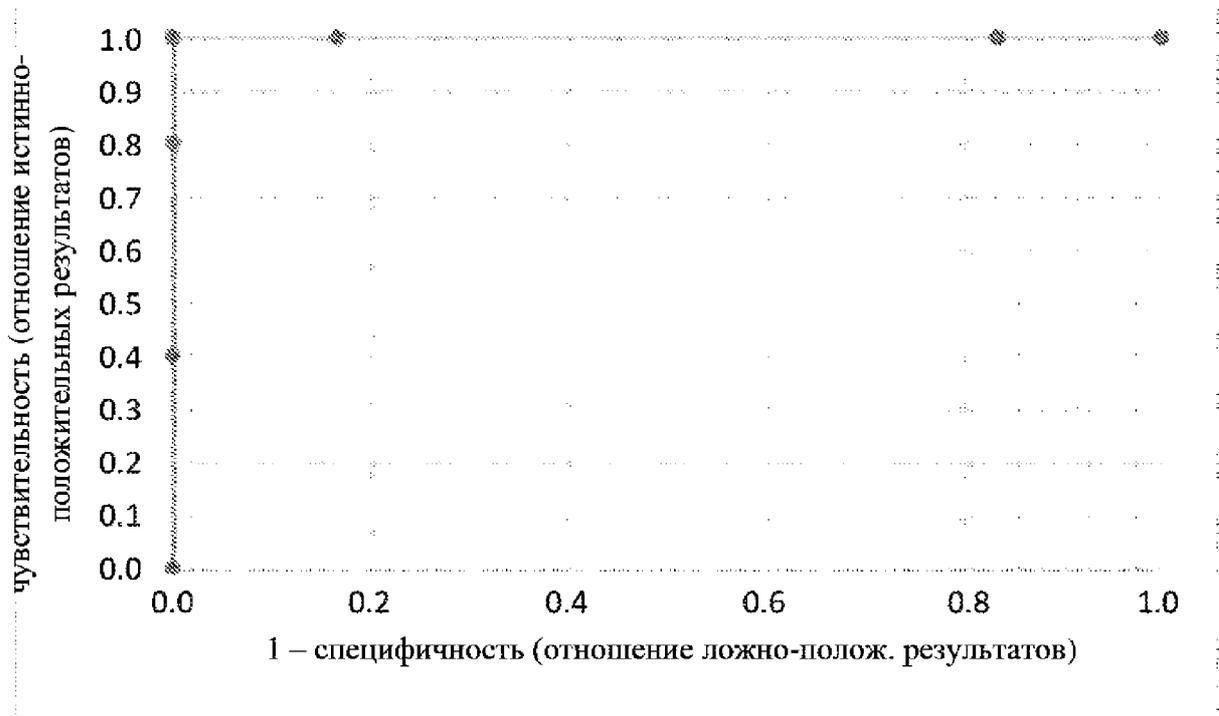
ФИГ. 15А

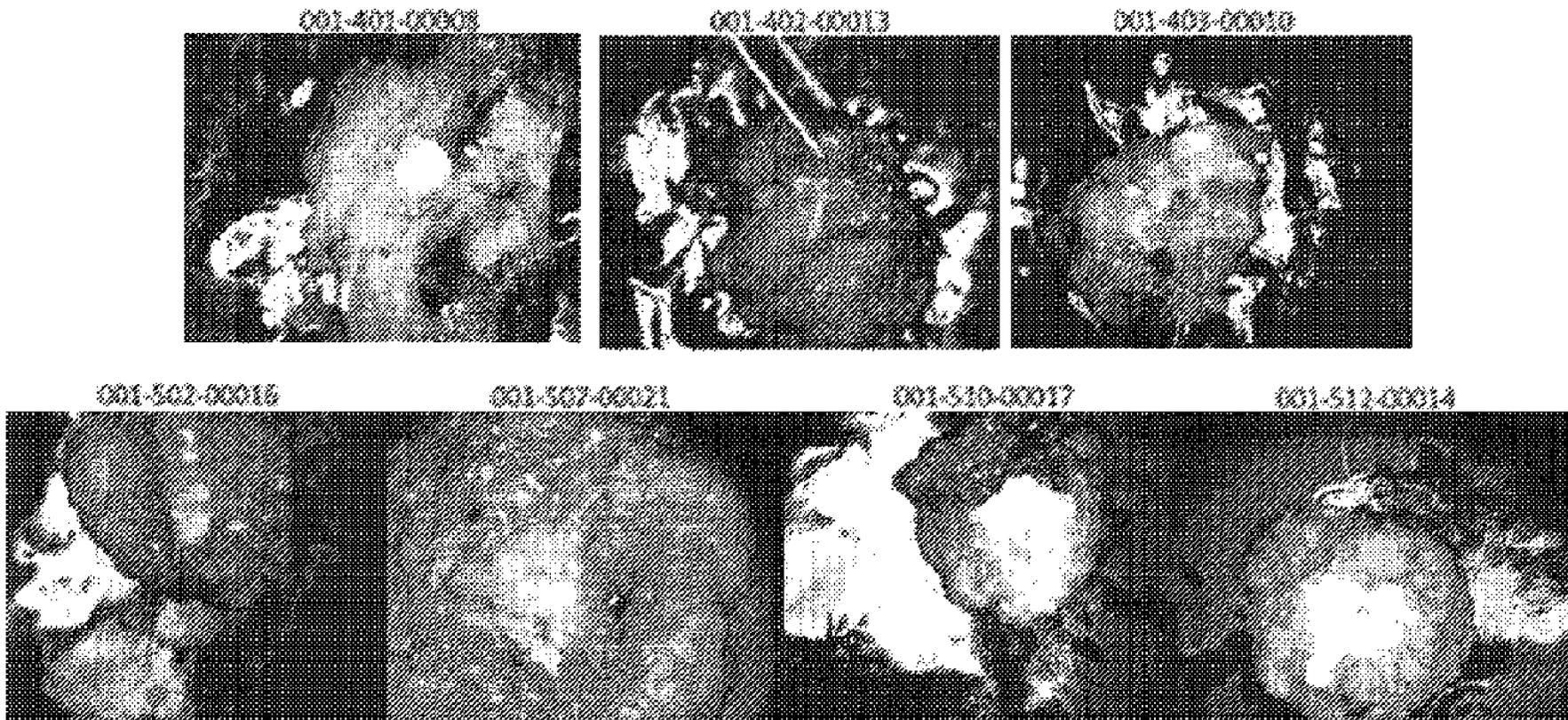


ФИГ. 15В

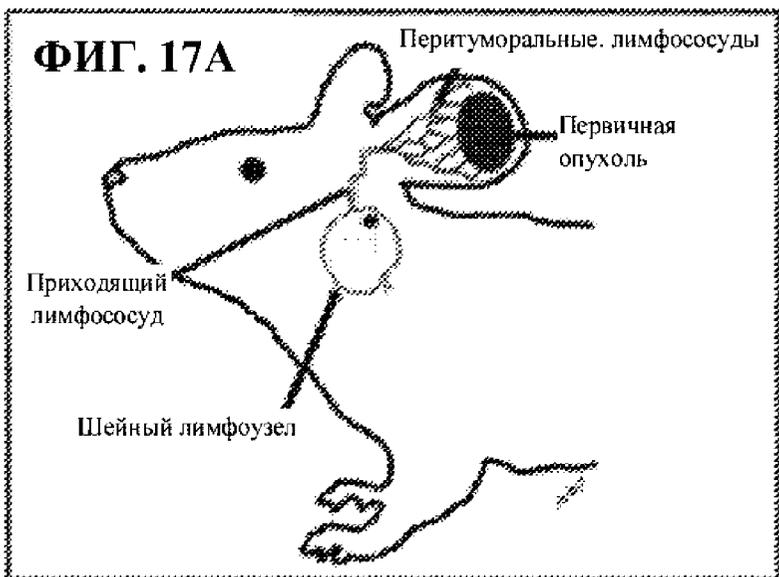


ФИГ. 15С





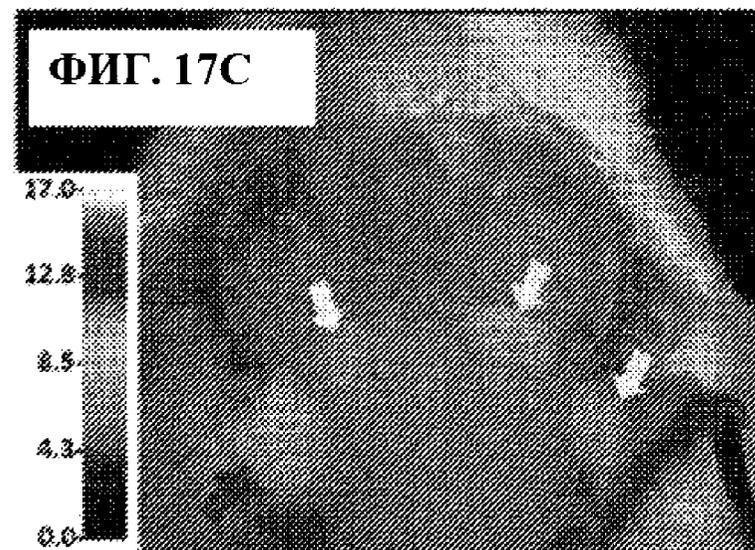
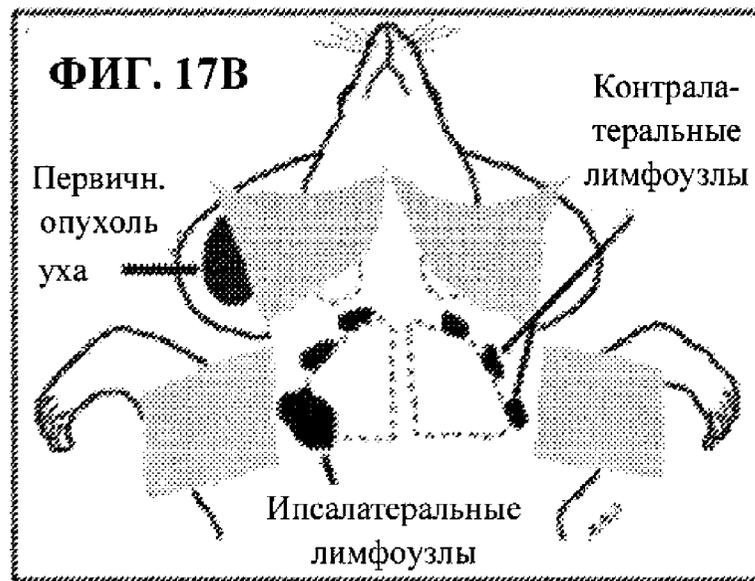
ФИГ. 16



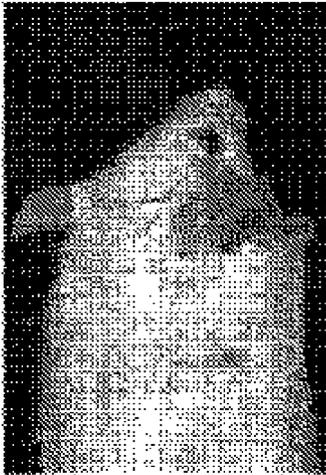
IV, AVB-620



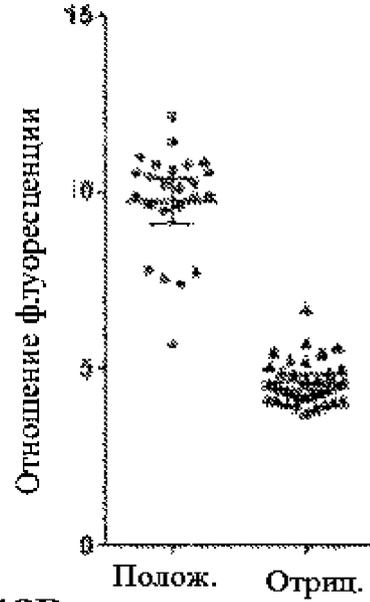
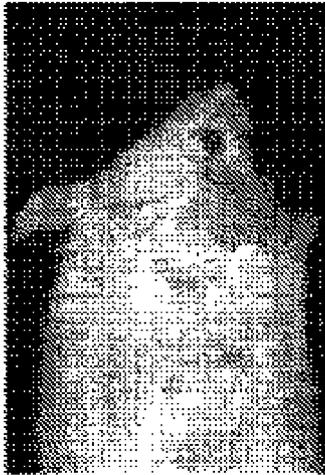
Время



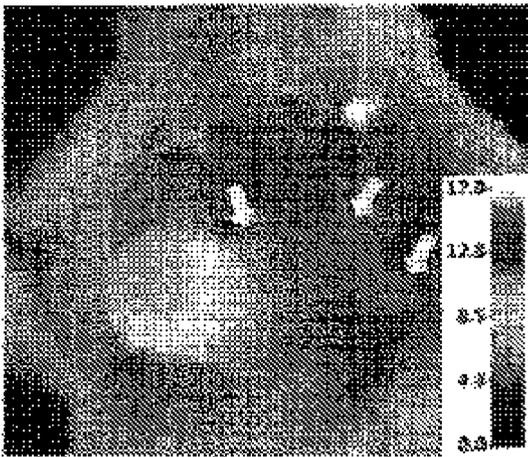
ФИГ. 18А



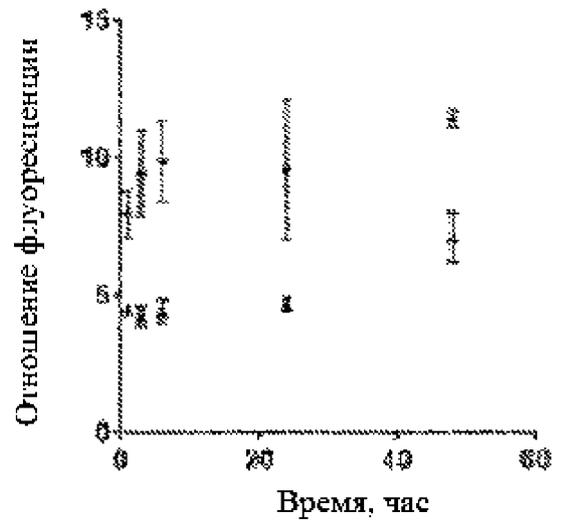
ФИГ. 18В



ФИГ. 18С



ФИГ. 18D



**ФИГ. 19А**



**ФИГ. 19В**

