

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192289** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.11.17

(51) Int. Cl. *G01N 33/58* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
C07H 3/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.02.20

(54) **СПОСОБЫ МЕЧЕНИЯ ЭУКАРИОТНЫХ КЛЕТОК МНОГОКЛЕТОЧНОГО ОРГАНИЗМА, А ТАКЖЕ ЛЕЧЕНИЯ И/ИЛИ ДИАГНОСТИКИ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МОНОСАХАРИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

(31) 19305202.4

(32) 2019.02.20

(33) EP

(86) PCT/EP2020/054567

(87) WO 2020/169782 2020.08.27

(71) Заявитель:

ДИАМИДЕКС (FR)

(72) Изобретатель:

Дюкан Сам (FR)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к модифицированным моносахаридным соединениям, применяемым в способах мечения и/или обнаружения эукариотической клетки многоклеточного организма. Изобретение также относится к таким модифицированным моносахаридным соединениям, применяемым в способах идентификации или выделения раковых клеток, диагностики рака или для клеточной терапии.

202192289
A1

202192289

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569987EA/072

СПОСОБЫ МЕЧЕНИЯ ЭУКАРИОТНЫХ КЛЕТОК МНОГОКЛЕТОЧНОГО ОРГАНИЗМА, А ТАКЖЕ ЛЕЧЕНИЯ И/ИЛИ ДИАГНОСТИКИ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МОНОСАХАРИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности, к онкологии. Оно относится к модифицированным моносахаридным соединениям, используемым в способах мечения, и/или обнаружения, и/или нацеливания на эукариотическую клетку многоклеточного организма. Оно также относится к таким модифицированным моносахаридным соединениям, которые применяются в способах идентификации или выделения раковых клеток, диагностики рака или для клеточной терапии.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Углеводы важны как сигнальные молекулы и для событий клеточного распознавания. Действительно, они могут вызывать поливалентные взаимодействия с белками распознавания углеводов (CRP) и использоваться в качестве зондов для живых организмов. Таким образом, углеводы предоставляют много возможностей для диагностики и лечения заболеваний. Как следствие, разработка биоактивных соединений и сенсоров на основе углеводов стала активной областью исследований. Эффективным и модульным синтетическим подходом к получению функциональных производных углеводов является клик-химия. Некоторые производные углеводов, полученные с помощью клик-химии CuAAC (Cu-катализируемое азид-алкин-1,3-диполярное циклоприсоединение) для терапии и диагностики, описаны в обзоре He et al. (Carbohydrate Research 429 (2016) 1-22). Клик-химия без меди с использованием реакции циклоприсоединения азид-алкинов, стимулируемой штаммом, также была описана для раковых клеток. Конкретные сахара, представляющие кликабельные группы (например, аналоги триацетил-N-азидоацетилманнозамина (Ac₃ManNAz)), метаболизируются раковыми клетками из-за специфической сверхэкспрессии расщепляемых ферментом аналогов сахаров. Таким образом, указанные сахара метаболизируются и специфически включаются в мембраны раковых клеток.

Несмотря на то, что для терапии и диагностики были описаны различные методы клик-химии углеводов/моносахаридов, эти методы клик-химии и используемые в них соединения кажутся цитотоксическими и/или неселективными по отношению к конкретным клеткам, например селективными по отношению к раковым клеткам. Цитотоксичность этих соединений предполагает использование низких нетоксичных концентраций, которые делают их менее эффективными.

В WO2013/1077559 в способах мечения конкретных живых микроорганизмов описаны модифицированные моносахаридные соединения, такие как конкретное соединение 8-азидо-3,8-дидезокси-D-маннооктулозоновая кислота (также называемая в

настоящем документе «KDO-N₃»). Меченые живые микроорганизмы были ограничены одноклеточными прокариотическими микроорганизмами (бактериями).

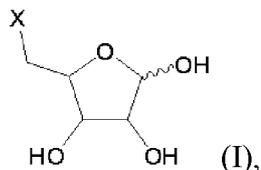
В WO2016/177712 в способах мечения конкретно живых микроорганизмов также описаны модифицированные моносахаридные соединения, такие как конкретное соединение 5-азидо-5-дезоксид-арабинофураноза (также называемое в настоящем документе «Ara-N₃»). Меченые живые микроорганизмы ограничиваются одноклеточными прокариотическими микроорганизмами (бактериями) и одноклеточными эукариотическими микроорганизмами (дрожжами, грибами и амебами).

Однако до сих пор не может быть дано объяснение того, как и где указанные моносахаридные соединения ассимилируются клеточными мембранами указанных микроорганизмов.

Существует постоянная потребность в поиске и разработке новых кандидатов, особенно для мечения и обнаружения эукариотических клеток многоклеточных организмов, чтобы предоставить способы идентификации или выделения раковых клеток, а также предоставить методы диагностики или клеточной терапии, особенно в области рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на моносахаридных соединениях формулы (I) или их предшественниках:



где X представляет собой реакционноспособную группу, позволяющую ковалентно связывать дополнительное соединение, такое как метка или противораковое лекарственное средство, или частицы, содержащие противораковое лекарственное средство, посредством реакции клик-химии. Созданные конъюгаты могут, таким образом, быть задействованы в способах мечения или обнаружения эукариотических клеток многоклеточного организма, для идентификации или выделения раковых клеток или для лечения рака.

Более конкретно, изобретатели обнаружили, что ассимиляция моносахаридных соединений формулы (I), особенно Ara-N₃, происходит с эукариотическими клетками многоклеточного организма. Они также обнаружили, что такая ассимиляция в опухолевых эукариотических клетках отличается от таковой в неопухолевых эукариотических клетках, а также более важна в сравнении с неопухолевыми клетками (в частности, в случае рака мочевого пузыря, крови, кожи, поджелудочной железы, мозга, печени, почек, легких, мышц, лимфоцитов, простаты, желудка, молочной железы по сравнению с нераковыми клетками). Следовательно, моносахаридные соединения формулы (I) и их предшественники также можно использовать в качестве зондов и маркеров рака, которые могут быть полезны для идентификации, выделения или нацеливания на раковые клетки и/или для диагностики рака у субъекта.

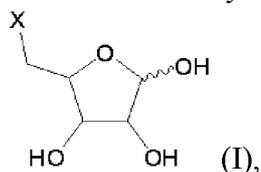
Соответственно, аспектом настоящего изобретения является способ, предпочтительно, способ *in vitro*, мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку многоклеточного организма, где способ включает стадии:

а) контактирование образца, содержащего эукариотические клетки, по меньшей мере с одним модифицированным моносахаридным соединением или его предшественником;

б) контактирование образца, полученного на стадии (а), с соединением, содержащим первую реакционноспособную группу, необязательно, в присутствии меди; и

с) необязательно, обнаружение связи соединения стадии (б) с моносахаридом стадии (а) для обнаружения эукариотических клеток;

где указанное по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение имеет следующую формулу (I):



где X представляет собой вторую реакционноспособную группу, первая и вторая реакционноспособные группы способны взаимодействовать вместе в реакции клик-химии с получением соединения стадии (б), связанного с указанным моносахаридом. В предпочтительном варианте осуществления изобретения первая реакционная группа представляет собой алкиновую группу, а вторая реакционная группа X представляет собой азидогруппу ($-N_3$).

В дополнительном аспекте изобретения представлен набор для осуществления способа мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку, как определено в настоящем документе, включающий:

- модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, предпочтительно формулы (I'), и

- соединение, несущее первую реакционноспособную группу.

Дополнительным аспектом изобретения является способ идентификации или выделения раковых клеток или диагностики рака у субъекта, включающий осуществление способа мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку многоклеточного организма, как определено в настоящем документе, от указанного субъекта.

Следующим аспектом изобретения является композиция, содержащая эукариотическую клетку, имеющую на своей поверхности по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, предпочтительно формулы (I'), определенной в настоящем документе, функционально связанное или не связанное с противораковым лекарственным средством или с частицами, содержащими по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство. Другим аспектом является фармацевтическая композиция, содержащая такую клетку. Другим

аспектом является указанная фармацевтическая композиция для применения при лечении рака, особенно с помощью клеточной терапии. Другим аспектом является указанная фармацевтическая композиция для использования при диагностике рака.

Другим аспектом является изобретения является способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, определенной в настоящем документе, содержащей эукариотическую клетку, имеющую на своей поверхности, по меньшей мере, одно модифицированное моносахаридное соединение формула (I) или его предшественник, предпочтительно формулы (I'), определенной в настоящем документе, функционально связанный с противораковым лекарственным средством или с частицами, содержащими по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство.

Дополнительным аспектом изобретения является применение модифицированного моносахаридного соединения или его предшественника, определенных в настоящем документе, для медицинской визуализации или диагностики, предпочтительно, для диагностики рака, необязательно, вместе с соединением, несущим первую реакционноспособную группу.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Соотношение сигналов флуоресценции *ex vivo* опухоли и скелетных мышц (соотношение опухоль/мышца), полученное на мышцах, несущих опухоль Panc-1, внутривенно инъецированных или не инъецированных Ara-N₃ и флуорофором.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

В соответствии с настоящим изобретением приведенные ниже термины имеют следующие значения:

«Многоклеточный организм» включает любой организм, состоящий более чем из одной клетки. Многоклеточный организм происходит от растения или животного или является, например, растением или животным, предпочтительно, млекопитающим, более предпочтительно, человеком.

«Эукариотическая клетка многоклеточного организма» представляет собой клетку, имеющую ядро внутри мембран, в отличие от прокариот, и происходящая из многоклеточного организма, такого как клетки животных или растений. Клетки животных и растений представляют собой наиболее известные эукариотические клетки многоклеточного организма. В контексте настоящего изобретения «эукариотические клетки» включают раковые клетки или нормальные клетки (или неопухолевые и опухолевые клетки).

Раковые клетки представляют собой клетки, которые безжалостно делятся, образуя твердые опухоли или наводняя кровь аномальными клетками. Таким образом, это может быть солидный рак или рак кроветворения, такой как лимфома или лейкемия.

Термин «рак» или «опухоль», используемый в настоящем документе, относится к наличию клеток, обладающих характеристиками, типичными для вызывающих рак клеток,

такими как неконтролируемая пролиферация, бессмертие, метастатический потенциал, скорость быстрого роста и пролиферации, а также определенные характерные морфологические особенности. Этот термин относится к любому типу злокачественного новообразования (первичному или метастазам). Типичные виды рака представляет собой солидный рак или рак кроветворения, такие как рак молочной железы, мозга, желудка, печени, кожи, предстательной железы, поджелудочной железы, пищевода, саркому, рак яичников, эндометрия, мочевого пузыря, шейки матки, прямой кишки, толстой кишки, почек, легких или ORL, опухоли у детей (нейробластома, мультиформная глиобластома), лимфому, карциному, глиобластома, гепатобластома, лейкоз, миелому, семиному, Ходжкина или злокачественные гемопатии.

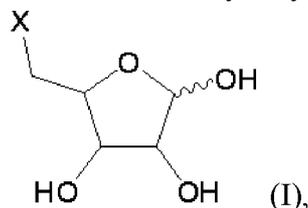
Настоящее изобретение относится к способу мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку многоклеточного организма, где способ включает следующие стадии:

а) контактирование образца, содержащего эукариотические клетки, по меньшей мере с одним модифицированным моносахаридным соединением или его предшественником;

б) контактирование образца, полученного на стадии (а), с соединением, содержащим первую реакционноспособную группу, необязательно, в присутствии меди; и

с) необязательно, включение обнаружения связи соединения стадии (б) с моносахаридом стадии (а);

где по меньшей мере одно указанное модифицированное моносахаридное соединение имеет следующую формулу (I):



где X представляет собой вторую реакционноспособную группу, первая и вторая реакционноспособные группы могут взаимодействовать вместе в реакции клик-химии. Реакция между первой и второй реакционноспособными группами позволяет соединению стадии (б) связываться с моносахаридами формулы (I).

Клик-химия представляет собой хорошо известный специалистам в данной области метод прикрепления интересующего зонда или субстрата к конкретной биомолекуле, такой как модифицированное моносахаридное соединение согласно изобретению. Азид-алкиновое циклоприсоединение является хорошо известной так называемой реакцией клик-химии в присутствии или нет медного катализатора, где азидная группа взаимодействует с алкиновой группой с образованием триазола. Алкиновая группа может быть модифицированной или нет.

Такое азид-алкиновое циклоприсоединение может осуществляться в условиях, катализируемых медью, в присутствии лиганда, предпочтительно, трис-триазольного

лиганда, такого как TGTA (трис((1-(D-глюкопиранозил)-1[1,2,3]-триазол-4-ил)метил)амин) или ТБТА (трис-[(1-бензил-1,1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин). Другими часто используемыми подходящими лигандами являются: трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин (ТНРТА), 2-(4-(((1-трет-бутил-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)этансульфоная кислота (BTES), трис((1-(((этил)карбоксиметил)-(1,2,3-триазол-4-ил))метил)амин, дисульфат батофенантролина или трис(2-бензимидазолилметил)амины.

Альтернативно, азид-алкиновое циклоприсоединение можно проводить в отсутствие меди, если используется модифицированный алкин, такой как азадибензоциклооктин (ADIBO, DIBAC или DBCO) или тетраметоксидибензоциклооктин (TMDIBO). Другие подходящие модифицированные алкины, часто используемые для реакции без меди, включают: циклооктин (OCT), безарилциклооктин (ALO), монофторциклооктин (MOFO), дифторциклооктин (DIFO), дибензоциклооктин (DIBO), диметоксиазациклооктин (DIMAC), тетраметилэтилазациклооктин (TMARTI), тетраметилазациллазациклооктин (TMARTI), биоактарилазацил (TM) дифторбензоциклооктин (DIFBO), оксадибензоциклооктин (ODIBO), карбоксиметилмонобензоциклооктин (COMBO) или бензоциклононин.

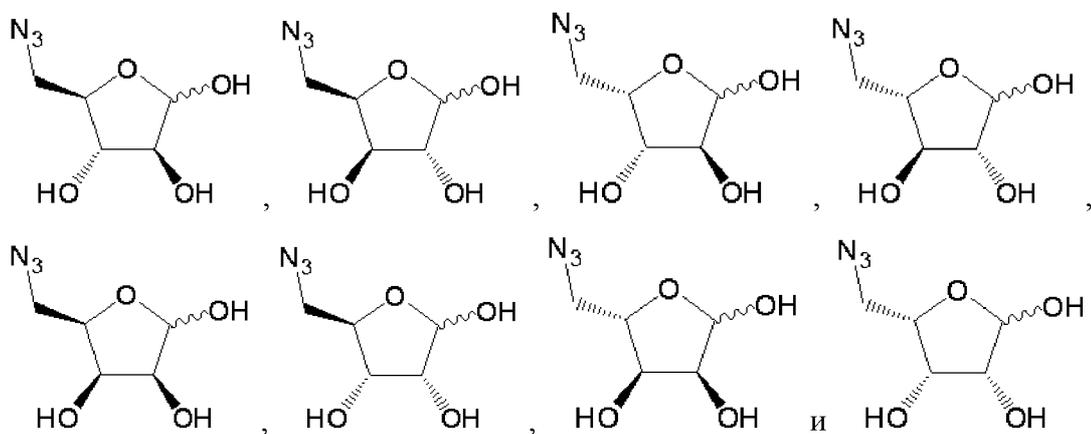
Для клик-химии возможно использование других реакционноспособных групп и других реакций, таких как: лигирование по Штаудингеру (первая реакционноспособная группа=азид и вторая реакционноспособная группа=фосфин), клик-химия без меди (первая реакционноспособная группа=азид и вторая реакционноспособная группа=затрудненный алкин (внутрициклический алкин)), карбонильная конденсация (первая реакционная группа=альдегид или кетон и вторая реакционноспособная группа=гидразид или оксамин), тиол-ен клик-химия (первая реакционноспособная группа=тиол и вторая реакционноспособная группа=алкен), нитрил-оксид-ен клик-химия (первая реакционноспособная группа=оксид нитрила или альдегид, оксим или гидроксимоилхлорид или хлороксим и вторая реакционноспособная группа=алкен или алкин), нитрилимин-ен клик-химия (первая реакционноспособная группа=нитрилимин или альдегид, гидразон или гидразоилхлорид или хлоргидразон и вторая реакционноспособная группа=алкен или алкин), лигирование Дильса-Альдера с обратными электронными требованиями (первая реакционноспособная группа=алкен и вторая реакционноспособная группа=тетразин), изонитрил-тетразин клик-химия (первая реакционноспособная группа=изонитрил и вторая реакционноспособная группа=тетразин), сочетание по Сузуки-Мияуры (первая реакционноспособная группа=арилгалогенид и вторая реакционная группа=арилборонат), His-tag (первая реакционноспособная группа=олигогистидин и вторая реакционноспособная группа=никелевый комплекс или никелевый лиганд).

Моносахаридные соединения и их предшественники

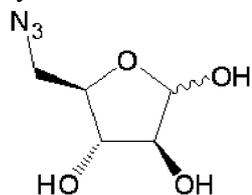
Согласно изобретению модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) содержит реакционноспособную группу X (вторую реакционноспособную группу),

подходящую для взаимодействия в реакции клик-химии, предпочтительно, в азид-алкиновом циклоприсоединении. Таким образом, X включает любую реакционноспособную группу, способную взаимодействовать с другой реакционноспособной группой посредством реакции клик-химии, такую как реакционноспособные группы, определенные выше. В конкретном варианте осуществления изобретения X включает любые группы, состоящие из азидогруппы ($-N_3$) или несущие ее, и группы, состоящие из алкиновой группы ($-C\equiv C-$) или несущие ее в модифицированном состоянии или без нее. В предпочтительном варианте X представляет собой азидогруппу ($-N_3$).

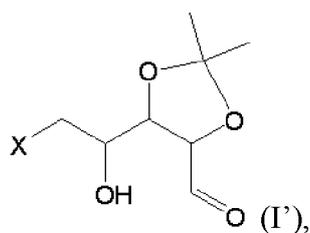
В конкретном варианте осуществления изобретения модифицированные моносахаридные соединения формулы (I) включают свои диастереоизомеры. В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанное модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) выбрано из группы, включающей следующие формулы:



В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанное по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) представляет собой 5-азидо-5-дезоксид-арабинофуранозу ($Ara-N_3$), в частности, имеющую следующую формулу:

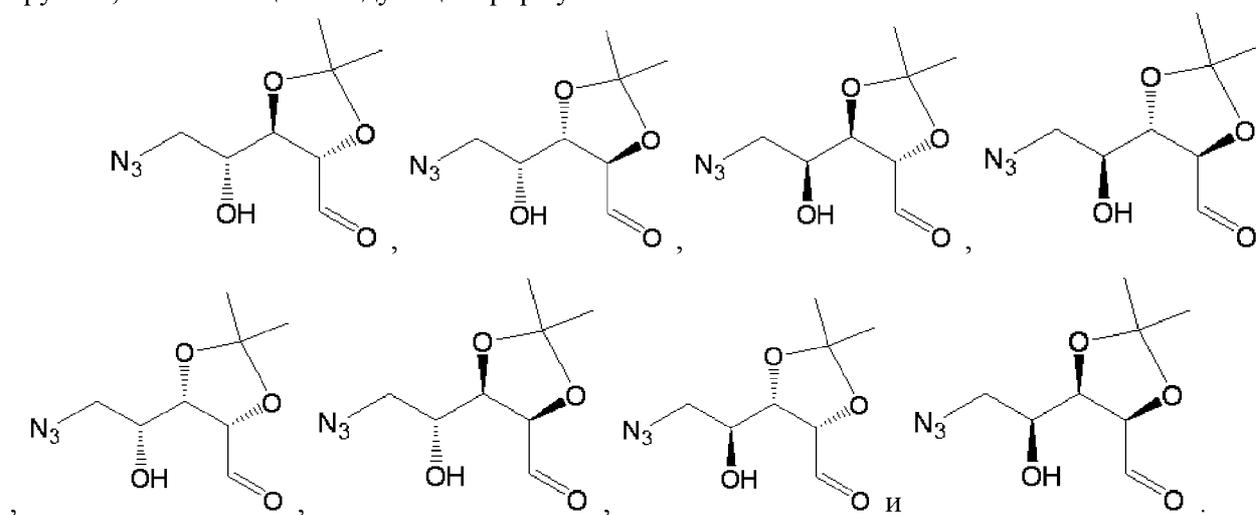


В другом конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) является предшественником указанных модифицированных моносахаридных соединений. Более конкретно, указанный предшественник имеет формулу (I')

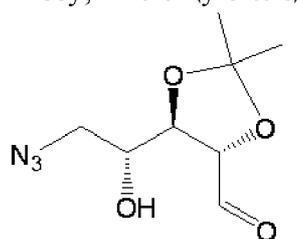


где X представляет собой вторую реакционноспособную группу, определенную выше, предпочтительно, азидогруппу ($-N_3$), первая и вторая реакционноспособные группы могут взаимодействовать вместе в реакции клик-химии.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанный предшественник формулы (I) включает свои диастереоизомеры. В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанный предшественник формулы (I) выбран из группы, включающей следующие формулы:



В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный предшественник формулы (I) представляет собой 5-азидо-5-дезоксид-2:3-изопропилиден-D-арабинозу, имеющую следующую формулу:



Модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник можно использовать согласно настоящему изобретению в любой концентрации, поскольку они не проявляют токсичности по отношению к клеткам. Согласно конкретному варианту осуществления изобретения концентрация моносахаридного соединения формулы (I) или его предшественника по изобретению может варьироваться от 10 мкМ до 100 мМ, предпочтительно, от 1 мМ до 50 мМ, более предпочтительно, от 1 мМ до 20 мМ.

Соединение, несущее первую реакционноспособную группу

Соединение, несущее первую реакционноспособную группу, содержит или является непосредственно определяемым фрагментом, или содержит или является косвенно определяемым фрагментом. Не прибегая к какой-либо теории, клетки связаны с соединением, несущим первую реакционноспособную группу, из-за реакции клик-химии со второй реакционноспособной группой моносахарида стадии (a), которая была ассимилирована клеточными мембранами на стадии (a). Обнаруживаемым фрагментом (или меткой) является фрагмент, который может быть обнаружен методами, известными специалистам в данной области, такими как флуоресценция, колориметрия или люминесценция. Таким образом, методами визуализации могут являться флуоресценция, магнитный резонанс или компьютерная томография.

Согласно одному варианту осуществления изобретения указанное соединение может содержать или может быть обнаруживаемым фрагментом, а именно фрагментом, состоящим из или несущим обнаруживаемое вещество (или метку), а именно вещество, которое может быть обнаружено методами, известными специалистам в данной области, такими как флуоресценция, колориметрия или люминесценция.

Согласно другому варианту осуществления изобретения указанное соединение, несущее первую реакционноспособную группу, включает или является косвенно определяемым фрагментом, который является первым лигандом (или, более конкретно, первым связывающим белком, несущим указанную первую реакционноспособную группу) и обнаружение и или иммобилизация на стадии (c), как подробно описано ниже, может происходить путем контактирования указанной эукариотической клетки, связанной с указанным первым лигандом (или более конкретно с первым связывающим белком), со вторым лигандом (или вторым связывающим белком), специфически реагирующим или связывающимся с указанным первым лигандом (или, более конкретно, с первым связывающим белком).

Более конкретно, указанное соединение представляет собой первый лиганд, предпочтительно, биотин, несущий указанную первую реакционноспособную группу, и на стадии c) указанные эукариотические клетки, связанные с указанным первым лигандом, выявляются взаимодействием указанных эукариотических клеток с антителом или другим белком, специфичным для указанного первого лиганда, где указанное антитело несет обнаруживаемое вещество или фрагмент, предпочтительно, флуорохром или люминесцентную молекулу или фермент.

Обнаруживаемое вещество или фрагмент может быть выбрано из красителей, радиоактивных меток и аффинных меток. В частности, красители могут быть выбраны из группы, включающей флуоресцентные, люминесцентные или фосфоресцентные красители, предпочтительно, дансил, флуоресцеин, акридин, родамин, кумарин, BODIPY и цианиновые красители. Более конкретно, флуоресцентные красители могут быть выбраны из красителей, продаваемых компанией Thermo Fisher, таких как красители Alexa Fluor, Pacific или Texas Red, или другими поставщиками цианинов 3, 5 и 7. В частности, красители, содержащие азид для CuAAC, коммерчески доступны для Alexa Fluor® 488, 55,

594 и 647 и для TAMRA (тетраметилродамин). Во втором аспекте обнаруживаемое вещество или фрагмент (или метка) может быть аффинной меткой. Такая аффинная метка может быть, например, выбрана из группы, включающей биотин, His-таг, Flag-таг, Strep-таг, сахара, липиды, стероиды, линкеры PEG и кофакторы. В конкретном варианте осуществления изобретения обнаруживаемое вещество представляет собой биотинилированную метку. Биотины, связанные с азидом, коммерчески доступны (азид биотина). В предпочтительном варианте осуществления метка представляет собой флуоресцентную метку.

Согласно изобретению соединение, несущее первую реакционноспособную группу, включает первую реакционноспособную группу, которая комплементарна второй реакционноспособной группе X, как определено выше, для взаимодействия в реакции клик-химии, предпочтительно, азид-алкинового циклоприсоединения. В конкретном варианте осуществления первая реакционноспособная группа соединения включает любую группу, состоящую из азидогруппы ($-N_3$) или несущую ее, и группы, состоящие из затрудненной или не алкиновой группы ($-C\equiv C-$) или несущие ее.

В вышеупомянутом перечне групп, участвующих в реакциях, первая реакционноспособная группа и вторая реакционноспособная группа X могут быть заменены друг на друга. Все вышеупомянутые химические реакции приводят к ковалентной связи. Например, когда X представляет собой азидогруппу ($-N_3$) или группу, несущую азидогруппу, тогда первая реакционноспособная группа представляет собой алкин или группу, содержащую алкиновую группу. Когда X представляет собой алкин или группу, содержащую алкиновую группу, тогда первая реакционная группа представляет собой азидогруппу ($-N_3$) или группу, содержащую азидогруппу. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вторая реакционная группа X представляет собой азидогруппу ($-N_3$), а первая реакционная группа представляет собой алкиновую группу ($-C\equiv C-$).

Способ мечения, обнаружения или нацеливания

Стадия а) в соответствии со способом мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку многоклеточного организма включает контактирование образца, содержащего эукариотическую клетку, по меньшей мере с одним модифицированным моносахаридным соединением формулы (I) или его предшественником, содержащим реакционноспособную или функциональную группу X. Такая стадия контактирования а) позволяет включить по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник в мембрану указанной эукариотической клетки многоклеточного организма, более конкретно, на поверхности указанной клетки. Такой процесс может соответствовать ассимиляции по меньшей мере одного модифицированного моносахаридного соединения формулы (I) указанной эукариотической клеткой. Соответственно, указанная клетка имеет по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) на своей поверхности или мембране.

Стадия b) включает контактирование образца стадии (a) (в котором по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник включено в мембрану эукариотической клетки) с соединением, содержащим первую реакционноспособную группу, определенную выше. Такая стадия b) позволяет генерировать клик-химическую реакцию между первой реакционноспособной группой соединения и второй реакционноспособной группой X по меньшей мере одного модифицированного моносахаридного соединения формулы (I) или его предшественника, предпочтительно формулы (I'), тем самым обеспечивая связанную эукариотическую клетку многоклеточного организма, которая помечена или нацелена или может быть помечена или нацелена впоследствии (как подробно описано выше).

Предпочтительный вариант осуществления изобретения представляет собой способ мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку многоклеточного организма, где способ включает следующие стадии:

- a) контактирование образца, содержащего эукариотическую клетку, с Ara-N_3 ; и
- b) контактирование указанного образца с соединением, содержащим первую реакционноспособную группу, необязательно, в присутствии меди.

Специалисте в данной области техники известно, как осуществить стадии (a) или (b). В соответствии с конкретным вариантом осуществления изобретения указанные стадии (a) и/или (b) проводят в культуральной или инкубационной среде, обеспечивающей рост образца, содержащего эукариотическую клетку, предпочтительно, специфичную для роста указанной эукариотической клетки.

Более конкретно, условия культивирования (включая время и среду для культивирования клеток) на стадиях (a) или (b) адаптированы к эукариотической клетке, которую нужно пометить, обнаружить или нацелить. Среда для культивирования клеток может быть дополнена любым соединением для усиления или стимулирования удвоения клеток и/или ассимиляции модифицированного моносахаридного соединения формулы (I) на поверхности или мембране клетки.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения продолжительность стадии (a) позволяет включить по меньшей мере одно моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник в мембрану указанной эукариотической клетки. Более конкретно, продолжительность стадии (a) представляет собой по меньшей мере время удвоения эукариотической клетки, которую необходимо пометить, обнаружить или нацелить. Более конкретно, продолжительность стадии (a) меньше чем в пять раз превышает время удвоения эукариотической клетки, которую необходимо пометить, обнаружить или нацелить. Согласно конкретному варианту осуществления изобретения продолжительность стадии (a) соответствует одному времени удвоения или двум временам удвоения эукариотической клетки, которая должна быть помечена, обнаружена или нацелена.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения указанные стадии (а) и/или (b) проводят с реагентами и/или катализаторами для генерации реакции указанной первой реакционноспособной группы с указанной второй реакционноспособной группой.

Интересно отметить, что моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник проявляют низкую токсичность или отсутствие токсичности по отношению к клеткам, как проиллюстрировано примерами, так что его используемое количество может варьироваться в большом диапазоне. Такое количество будет определено специалистом в данной области, чтобы количество было достаточным для мечения, идентификации или обнаружения эукариотических клеток.

Способ может быть реализован с любым образцом, обычно с биологическим образцом субъекта, например, жидкостью, такой как образец крови, плазмы, сыворотки, мочи, спинномозговой жидкости или образец ткани субъекта или ее части. Изобретение может быть реализовано с образцами от любого субъекта, включая любого пациента-человека, страдающего раком или подозреваемого в его наличии. Способ обычно выполняется на образце, или полученном из него, крови, сыворотки или плазмы, таком как предварительно обработанный образец крови. Образец можно обработать перед использованием по изобретению (например, разбавить, сконцентрировать, отделить, частично очистить, заморозить и т. д.). Согласно конкретному варианту осуществления изобретения каждый образец, используемый на стадии (а) способа, включает популяцию клеток или, предпочтительно, отдельную клетку, предпочтительно, полученную путем сортировки клеток, в частности, с помощью проточной цитометрии. Когда метод реализуется *in vivo*, он может применяться ко всему организму субъекта или его части. В этом контексте моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник и, необязательно, соединение, несущее первую реакционноспособную группу, можно вводить энтерально (включая перорально) или парентерально (включая внутривенно или внутримышечно).

Для обнаружения связанной эукариотической клетки многоклеточного организма способ дополнительно включает стадию с), включающую обнаружение связи соединения стадии (b) с моносахаридом стадии (а).

Преимущественно, настоящее изобретение включает дополнительную стадию (с) обнаружения эукариотической клетки при определении того, связана ли указанная эукариотическая клетка с соединением, несущим первую реакционноспособную группу стадии (b), и/или при иммобилизации указанной эукариотической клетки, связанной с соединением, несущим первую реакционноспособную группу на твердом субстрате, где указанное соединение, несущее первую реакционноспособную группу, представляет собой фрагмент или молекулу, содержащую поддающееся обнаружению вещество или способную взаимодействовать или связываться с поддающимся обнаружению веществом, или, предпочтительно, указанное соединение, несущее первую реакционноспособную группу, представляет собой первую молекулу, способную взаимодействовать или связываться со второй молекулой и/или твердым субстратом, где, предпочтительно,

указанная вторая молекула содержит поддающееся обнаружению вещество и/или указанная вторая молекула связана или способна связываться с указанным твердым субстратом.

Соответственно, настоящее изобретение позволяет метить эукариотические клетки многоклеточного организма, а также подсчитывать или обнаруживать эукариотические клетки, а также концентрировать и/или изолировать эукариотические клетки, необязательно иммобилизованные на твердой подложке; особенно на твердой подложке, состоящей из магнитных шариков, несущих указанную первую реакционноспособную группу.

Более конкретно, указанное соединение, несущее первую реакционноспособную группу, представляет собой первую молекулу, способную реагировать или связываться со второй молекулой и/или твердым субстратом, где, предпочтительно, указанная вторая молекула включает поддающееся обнаружению вещество, и способ включает стадию с) обнаружения эукариотических клеток при определении того, содержит ли указанная эукариотическая клетка указанную обнаруживаемую молекулу или фрагмент, связанный с указанной эукариотической клеткой.

В соответствии со способом по настоящему изобретению в отсутствие метки или обнаружения можно сделать вывод, что внедренный образец не содержит эукариотических клеток многоклеточного организма.

Указанная стадия с) обнаружения можно проводиться в жидкой среде или на твердой подложке.

Предпочтительно, способ мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку многоклеточного организма является способом *in vitro*.

Согласно конкретному варианту осуществления способ по настоящему изобретению может дополнительно включать одну или несколько стадий промывки.

Согласно конкретному варианту осуществления способ согласно изобретению можно проводить с одним или несколькими образцами одновременно, используя, например, микролуночный планшет. Микропланшет обычно имеет 6, 12, 24, 48, 96, 384 или 1536 лунок для образцов. В соответствии с указанным конкретным вариантом осуществления каждая лунка для образца, используемая на стадии (а) способа, предпочтительно, содержит популяцию клеток или, предпочтительно, отдельную клетку, более предпочтительно, полученную путем сортировки клеток, в частности, с помощью проточной цитометрии.

Таким образом, дополнительным объектом изобретения является использование *in vitro* по меньшей мере одного модифицированного моносахаридного соединения формулы (I) или его предшественника, предпочтительно формулы (I'), для мечения или обнаружения эукариотической клетки многоклеточного организма, предпочтительно, с соединением, содержащим первую реакционноспособную группу, и, необязательно, со второй молекулой и/или твердым субстратом, где, предпочтительно, указанная вторая молекула содержит обнаруживаемое вещество.

Еще одним объектом изобретения является набор для осуществления способа мечения или обнаружения эукариотической клетки многоклеточного организма, определенной в настоящем документе, включающий:

- модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, предпочтительно формулы (I'), определенной выше, и
- соединение, несущее первую реакционноспособную группу, определенную выше.

Согласно конкретному варианту осуществления набор может дополнительно содержать вторую молекулу и/или твердый субстрат, как определено выше, где, предпочтительно, указанная вторая молекула или твердый субстрат содержат обнаруживаемое вещество, причем соединение, несущее первую реакционноспособную группу, является первой молекулой, способной взаимодействовать или связываться со второй молекулой и/или с твердым субстратом.

Еще одной целью является применение набора, определенного выше, для осуществления способа мечения или обнаружения эукариотической клетки многоклеточного организма, определенной в настоящем документе.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения эукариотическая клетка многоклеточного организма представляет собой клетку, восприимчивую к злокачественной или опухолевой клетке. Соответственно, способ и набор согласно изобретению могут быть использованы для идентификации раковых или опухолевых клеток путем обнаружения мечения.

Способ идентификации или выделения раковых клеток или диагностики рака

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу, предпочтительно способу *in vitro* или *ex vivo*, идентификации или выделения раковых клеток или диагностики рака у субъекта, включающему осуществление способа мечения или обнаружения эукариотической клетки, определенной в настоящем документе, у указанного субъекта или в биологическом образце от указанного субъекта. В предпочтительном варианте осуществления изобретения способ идентификации или выделения раковых клеток или диагностики рака у субъекта дополнительно включает стадию обнаружения мечения и, необязательно, сравнения мечения с уровнем начала отсчета.

Биологический образец от субъекта является таким, как определено выше, и, предпочтительно, образец представляет собой образец от пациента-человека, страдающего раком или подозреваемого в его наличии. Согласно конкретному варианту осуществления изобретения каждый образец, используемый на стадии (а), включает популяцию клеток или, предпочтительно, отдельную клетку, предпочтительно, полученную путем сортировки клеток, в частности, с помощью проточной цитометрии.

Более конкретно подозревается, что образец содержит раковые клетки.

Примеры таких образцов включают жидкости, такие как кровь, плазма, слюна, моча и образцы семенной жидкости, а также образцы биопсии, органов, тканей или клеток. Перед использованием образец может быть обработан.

Раковые клетки, которые идентифицированы или выделены согласно изобретению, могут быть любого типа. Они могут возникать в результате солидных опухолей или рака кроветворения. Раковые клетки включают циркулирующие или не циркулирующие опухолевые клетки. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦКО) представляет собой клетки, которые попали в сосудистую сеть или лимфатические сосуды из первичной опухоли и разносятся по телу в кровотоке. ЦОК представляют собой «семена» для последующего роста дополнительных опухолей (метастазов) в отдаленных органах, механизм, который ответственен за подавляющее большинство смертей, связанных с раком.

Обнаружение и анализ раковых клеток в соответствии с настоящим изобретением может помочь в раннем прогнозе пациента и определить соответствующие индивидуальные методы лечения. Возможность отслеживать прогрессирование заболевания с течением времени может способствовать внесению соответствующих изменений в терапию пациента, потенциально улучшая его прогноз и качество жизни. В случае обнаружения и анализа циркулирующих опухолевых клеток этот метод может позволить раннее обнаружение рака и, в частности, метастазов. В этом отношении образец согласно изобретению представляет собой кровяную жидкость. Анализы крови легко и безопасно выполнять, и со временем можно брать несколько образцов. Важным аспектом способности прогнозировать будущее прогрессирование заболевания является устранение (по крайней мере, временно) необходимости в хирургическом вмешательстве, когда количество повторных ЦОК низкое и не увеличивается; очевидные преимущества отказа от хирургического вмешательства включают избежание риска, связанного с врожденной опухоленностью операций при раке. С этой целью представляют огромный интерес методы, такие как настоящее изобретение, с необходимой чувствительностью и воспроизводимостью для обнаружения ЦКО у пациентов с метастатическим заболеванием.

Как используется в настоящем документе, выражение «обнаружение мечения» может включать визуализацию или обнаружение присутствия меченых эукариотических клеток многоклеточного организма, а также измерение такого мечения. Измерение такого мечения, такой как флуоресценция, позволяет обнаруживать, идентифицировать или изолировать раковые клетки, необязательно, путем сравнения мечения с контрольным уровнем.

Было обнаружено, что ассимиляция модифицированного моносахаридного соединения формулы (I) или его предшественника, предпочтительно формулы (I'), в раковых клетках отличается от такового в нераковых клетках и, в частности, выше по сравнению с нераковыми клетками (например, контрольный уровень или контрольный образец). Как показано в примерах, интенсивность флуоресценции выше для раковых клеток по сравнению с нераковыми клетками (например, после времени удвоения одной или двух клеток).

Следовательно, настоящее изобретение относится к способу идентификации или выделения раковых клеток или диагностики рака у субъекта, включающему:

осуществление описанного в настоящем документе способа мечения эукариотической клетки образца от указанного субъекта;

обнаружение мечения после осуществления указанного способа мечения и, необязательно, сравнение мечения с контрольным уровнем; и затем

идентификация раковых клеток или диагностика рака на основе измерения метки.

Способ идентификации или выделения раковых клеток или диагностики рака может преимущественно выполняться в пределах периода времени одного клеточного цикла. Обнаружение метки, предпочтительно, проводят в период от 10 часов до 40 часов, более предпочтительно, от 16 до 24, 25 или до 36 часов после осуществления указанного способа мечения, и, более конкретно, после осуществления стадии (а), подробно описанной выше.

Способ может, необязательно, включать сравнение с контрольным уровнем, более конкретно, с контрольным образцом или эталоном. Контрольный уровень может быть интенсивностью мечения (например, флуоресценции), измеренной в нормальной клетке (например, нераковой клетке) и/или известной раковой клетке. Предпочтительно, эталонная клетка является ближайшей к исследуемой клетке, предпочтительно, клеткой из той же клеточной линии, того же органа и/или того же типа. Способ может включать предшествующую стадию получения образца опухоли и гистологически подобранной нормальной ткани от субъекта.

Согласно конкретным вариантам осуществления, раковые клетки идентифицируются или рак диагностируется, когда измерение метки образца выше, чем измерение метки контрольного образца, который не является раковым образцом. «Более высокое измерение» означает, что коэффициент мечения образца по отношению к образцу без рака составляет более 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 или 3,0. Более конкретно, коэффициент мечения образца по отношению к образцу без рака составляет более 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 или 3,0.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения рак, который необходимо диагностировать, выбирают из рака прямой кишки, колоректального рака, рака желудка, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака шейки матки, рака матки, рака молочной железы, рака яичников, рака мозга, рака легких, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака крови, рака почек, рака печени, рака простаты, множественной миеломы и рака эндометрия. Более конкретно, диагностируемый рак выбирают из группы, включающей рак мочевого пузыря, крови, кожи, поджелудочной железы, мозга, печени, почек, легких, мышц, лимфоцитов, простаты, желудка и молочной железы. Согласно более конкретному варианту осуществления изобретения диагностируемый рак выбирают из группы, включающей рак мочевого пузыря, крови, толстой кишки, желудка, молочной железы, легких, кожи и поджелудочной железы.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения раковые клетки, которые должны быть идентифицированы или выделены, представляют собой раковые клетки, происходящие от перечисленных выше видов рака.

Фармацевтическая композиция и ее применение

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей эукариотическую клетку, имеющую на своей поверхности по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, предпочтительно формулы (I'), определенной выше, функционально связанное или не связанное с антибиотиком. - противораковое лекарственное средство или к частицам, содержащим по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство.

В одном конкретном аспекте клетка, имеющая на своей поверхности по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, как определено выше, функционально связанное или не связанное с противораковым лекарственным средством, или с частицами, содержащими по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство.

Композиция согласно изобретению может быть приготовлена способом, включающим следующие стадии:

а) контактирование композиции, содержащей эукариотические клетки многоклеточного организма, по меньшей мере, с одним модифицированным моносахаридным соединением или его предшественником, определенных выше;

б) контактирование композиции стадии (а) с соединением, несущим первую реакционноспособную группу и, необязательно, содержащим функционально связанные противораковые лекарственные средства или частицы, содержащие по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство, необязательно, в присутствии меди.

Указанные стадии подобны описанным выше. Стадия а) позволяет указанной клетке обеспечить по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник на своей поверхности или мембране. Стадия б) позволяет инициировать реакцию клик-химии между первой реакционноспособной группой соединения и второй реакционноспособной группой X по меньшей мере одного модифицированного моносахаридного соединения формулы (I) или его предшественника, предпочтительно формулы (I').

Согласно одному варианту осуществления соединение с первой реакционноспособной группой может также содержать или быть функционально связанным с противораковым лекарственным средством или частицами, содержащими по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство, присоединенное к указанному соединению, стадия (b) позволяет предоставлять эукариотические клетки многоклеточного организм в сочетании с противораковыми препаратами или с частицами, содержащими противораковые препараты.

Таким образом, способ позволяет получить посредством реакции клик-химии, как подробно описано выше, конъюгат, в котором модифицированные моносахаридные соединения формулы (I) или их предшественники формулы (I') функционально связаны с противораковым лекарственным средством или частицами, содержащими их, и эукариотическая клетка представляет на своей поверхности указанный конъюгат. В конкретном варианте осуществления конъюгат получают путем реакции клик-химии между

противораковыми лекарственными средствами, содержащими алкиновые группы, или частицами, имеющими на своей поверхности алкиновые группы, и модифицированными моносахаридными соединениями формулы (I) или их предшественниками формулы (I'), содержащими азидогруппы.

Согласно такому варианту осуществления способ позволяет получить посредством реакции клик-химии, как подробно описано выше, конъюгат, в котором модифицированные моносахаридные соединения формулы (I) или их предшественники формулы (I') связаны с первым лигандом. способна реагировать или связываться со вторым лигандом, который является противораковым агентом, и эукариотическая клетка представляет на своей поверхности указанный конъюгат. В конкретном варианте осуществления конъюгат получают с помощью реакции клик-химии, как подробно описано выше.

Как используется в настоящем документе, «противораковое лекарственное средство» соответствует любому лекарственному средству, используемому в настоящее время в терапии рака, такому как противоопухолевое лекарственное средство. В предпочтительном варианте осуществления противораковое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из химиотерапевтических средств, противораковых антител, гормональной терапии, иммунотерапии и ингибиторов киназ.

Термин «функционально связанный противораковый препарат» относится к противораковому лекарственному средству, которое связано, предпочтительно ковалентно, при том, что оно способно проявлять свой терапевтический эффект.

Частицы, содержащие по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство, представляют собой частицы, содержащие противораковое лекарственное средство, предпочтительно, наночастицы, с первыми реакционноспособными группами, как определено выше. Частицы могут быть, например, наночастицами бицикло[6,1,0]нонин-модифицированного гликоля хитозана (BCN-CNP). Известно, что CNP способны инкапсулировать карциномные лекарства с высокой совместимостью и широко используются для доставки лекарств.

Химиотерапия может включать ингибитор топоизомераз I или II, сшивающий агент ДНК, агент алкилирования ДНК, антиметаболический агент и/или ингибитор митотических веретен.

Ингибиторы топоизомераз I и/или II включают, но не ограничиваются ими, этопозид, топотекан, камптотецин, иринотекан, амсакрин, интплицин, антрациклины, такие как доксорубицин, эпирубицин, даунорубицин, иданрубицин и митоксантрон. Ингибиторы топоизомеразы I и II включают, помимо прочего, интоплицин.

Сшивающие агенты ДНК включают, но не ограничиваются ими, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин.

Антиметаболические агенты блокируют ферменты, ответственные за синтез нуклеиновых кислот, или включаются в ДНК, что создает неправильный генетический код и приводит к апоптозу. Их неисчерпывающие примеры включают, без ограничения,

антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы, и, в частности, метотрексат, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, пентосторущил, 5-гемцитабин и капецитабин.

Алкилирующие агенты включают, без ограничения, мустаргены, производные этиленмина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины, соли металлов и триазены. Неисчерпывающие их примеры включают урамустин, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN®), ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилтиофосфорамин, бусульфан, кармустилин, стрепетемопламин, фоломустилин, ломустеплатин, ломустеплацин и темозоломид.

Ингибиторы митотических веретен включают, но не ограничиваются ими, паклитаксел, доцетаксел, винорелбин, ларотаксел (также называемый XRP9881; Sanofi-Aventis), XRP6258 (Sanofi-Aventis), BMS-184476 (Bristol-Meyer-Squibb), BMS-188797 (Bristol-Meyer-Squibb), BMS-275183 (Bristol-Meyer-Squibb), ortataxel (также называемый IDN 5109, BAY 59-8862 или SB-T-101131; Bristol-Meyer-Squibb), RPR 109881A (Bristol-Meyer-Squibb), RPR 116258 (Bristol-Meyer-Squibb), NBT-287 (TAPESTRY), PG-паклитаксел (также называемый CT-2103, PPX, паклитаксел полиглукс, паклитаксел полиглутамат или Xyotax™), ABRAXANE® (также называемый Nab-Паклитаксел; ABRAXIS BIOSCIENCE), тезетаксел (также называемый DJ-927), IDN 5390 (INDENA), таксопрексин (также называемый докозагексановая кислота-паклитаксел; PROTARGA), ДНА-паклитаксел (также называемый Тахорепхин®) и MAC-321 (WYETH). Также см. обзор Hennenfent & Govindan (2006, *Annals of Oncology*, 17, 735-749).

Ингибитор иммунных контрольных точек может быть выбран из группы, включающей анти-CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4) лекарственные средства, такие как ипилимумаб, ингибиторы PD-1 (белок 1 программируемой гибели клеток), такие как ниволумаб, пембролизумаб или BGB-A317, ингибиторы PDL1 (лиганд программируемой гибели клеток), такие как атезолизумаб, авелумаб или дурвалумаб, ингибиторы LAG-3 (ген активации лимфоцитов 3), такие как BMS-986016, ингибиторы TIM-3 (иммуноглобулин Т-клеток и муцин-домен, содержащий-3), ингибиторы TIGIT (иммунорецептор Т-клеток с доменами Ig и ITIM), ингибиторы BLTA (аттенюатор В- и Т-лимфоцитов), ингибиторы IDO1, такие как эпикадостат, или их комбинация.

Гормонотерапия включает, например, тамоксифен, фарестон, аримидекс, аромазин, фемара, золадекс/лупрон, мегас и халотестин.

Эукариотические клетки многоклеточного организма в композиции согласно изобретению предпочтительно представляют собой изолированные нераковые клетки. Клетки, предпочтительно, представляют собой изолированные мультипотентные стволовые клетки. Клетки, предпочтительно, представляют собой мезенхимальные стволовые клетки (МСК). МСК можно найти во всем теле, предпочтительно, в жировой

ткани, костном мозге, тканях, поддерживающих органы, а также в костях, хрящах и мышцах и т. д. Эукариотические клетки согласно изобретению могут быть Т-клетками.

Клетки являются либо аллогенными, либо, предпочтительно, аутологичными (то есть от субъекта или самого пациента).

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения композиция включает МСК, имеющие на своей поверхности по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, как определено выше. Такая композиция может быть использована, например, для идентификации раковых клеток или опухолей или диагностики рака с использованием свойства моносахарида выявляться соединением, содержащим первую реакционноспособную группу, прямо или косвенно, как подробно описано выше. Такая композиция также может быть использована в терапии для контроля гемопоэтических трансплантатов.

Согласно другому конкретному варианту осуществления изобретения композиция включает МСК, имеющие на своей поверхности по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, как определено выше, функционально связанные с противораковым лекарственным средством или с частицами, содержащими по меньшей мере одно противораковое лекарственное средство и присоединенное к указанному соединению. Такая композиция также может быть использована в терапии, в частности, для лечения рака.

Композиция по изобретению, предпочтительно, представляет собой фармацевтическую композицию.

Рассматриваемые в настоящем документе фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель в дополнение к клетке, представляющей противораковое лекарственное средство, как подробно описано выше. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает любой носитель (например, подложка, вещество, растворитель и т. д.), который не влияет на эффективность биологической активности клеток и который не токсичен для хозяина, которому его вводят. Например, для парентерального введения активные соединения могут быть составлены в виде стандартной лекарственной формы для инъекций в таких носителях, как физиологический раствор, раствор декстрозы, сывороточный альбумин и раствор Рингера. Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде растворов в фармацевтически совместимых растворителях или в виде эмульсий, суспензий или дисперсий в подходящих фармацевтических растворителях или носителе, или в виде пилюль, таблеток или капсул, содержащих твердые носители, известным в данной области способом. Составы, подходящие для парентерального введения, обычно включают стерильный масляный или водный препарат активного ингредиента, который предпочтительно изотоничен крови реципиента.

Носитель должен быть «приемлемым» в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами препаратов и не вреден для его реципиента. Фармацевтические композиции, преимущественно, применяют путем инъекции или внутривенной инфузии подходящих

стерильных растворов. Способы безопасного и эффективного введения большинства этих химиотерапевтических агентов известны специалистам в данной области. Кроме того, их применение описано в стандартной литературе.

Фармацевтическая композиция по изобретению может использоваться в терапии рака, и, более конкретно, в терапии раковых клеток.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, определенную в настоящем документе, для применения при лечении рака, как определено выше.

Еще один предпочтительный вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, определенной в настоящем документе.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения является применение фармацевтической композиции, определенной в настоящем документе, при изготовлении лекарственного средства для лечения рака.

Визуализация и диагностика

Как подробно описано выше, модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник формулы (I') подходят для образования обнаруживаемого объекта с меткой, предпочтительно, флуоресцентной меткой, в частности, посредством реакции клик-химии.

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению модифицированного моносахаридного соединения формулы (I) или его предшественника формулы (I'), описанных в настоящем документе, в качестве инструмента исследования для обнаружения эукариотической клетки многоклеточного организма и, в частности, для идентификации или изолирования раковых клеток. Изобретение также относится к модифицированному моносахаридному соединению формулы (I) или его предшественнику формулы (I'), описанных в настоящем документе, для медицинской визуализации или диагностики, предпочтительно, для диагностики рака.

Дополнительные аспекты и преимущества настоящего изобретения будут описаны в следующих примерах, которые следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничивающие.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Синтез соединений

Материалы и методы:

Тонкослойную хроматографию выполняли на Merck 60 F254 с обнаружением УФ-излучением и/или обугливанием серной кислотой или растворами KMnO_4 или фосфорномолибденовой кислоты. Силикагель 60 40-63 мкм использовали для колоночной флэш-хроматографии.

Спектры ЯМР снимали на спектрометрах Bruker Avance 300 или 500 МГц, используя остаточный протонированный растворитель в качестве внутреннего стандарта. Химические

сдвиги δ даны в миллионных долях (м.д.), а константы взаимодействия указаны в герцах (Гц). Схемы расщепления обозначаются как синглет (с), дублет (д), триплет (т), дублет дублета (дд), дублет дублета (ддд). Паттерны расщепления, которые невозможно интерпретировать или легко визуализировать, обозначают как мультиплет (м).

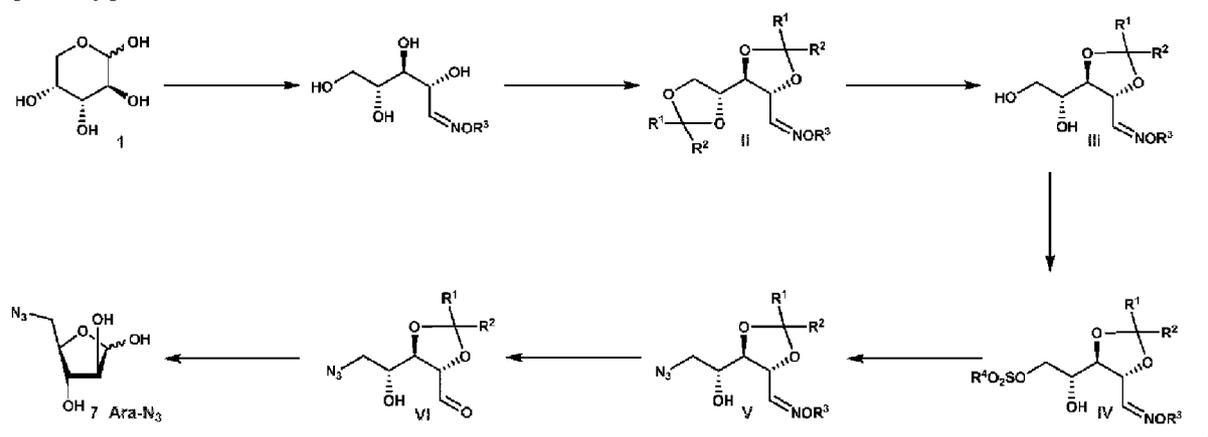
Масс-спектры снимали на Waters LCT Premier XE (ToF) с ионизацией электрораспылением в положительном (ESI+) или отрицательном (ESI-) режиме детектирования.

ИК-Фурье спектры записаны на спектрометре Perkin Elmer Spectrum 100. Характеристические значения поглощения указаны в см⁻¹.

Удельное оптическое вращение измеряли при 20°C с помощью поляриметра Anton Paar MCP 300 в 10-сантиметровой ячейке при 20°C и 589 нм.

Все биологические и химические реагенты были аналитического качества или уровня для культивирования клеток, были получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

Ara-N₃ и его предшественник VI были синтезированы в соответствии со следующей процедурой:



где R¹, R² и R³ представляют собой метильную группу.

***O*-метилоксим 2:3,4:5-диизопропилиден-D-арабинозы (соединение II)**

К раствору D-(-)-арабинозы (4,00 г, 26,6 ммоль, 1,0 экв.) в сухом пиридине (90 мл) добавляли гидрохлорид метоксиамин (2,72 г, 32,0 ммоль, 1,2 экв.) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 часов. Растворители удаляли при пониженном давлении и остаток трижды упаривали совместно с толуолом. Остаток ресуспендировали в 2,2-диметоксипропане (100 мл) и добавляли 7-толуолсульфоновую кислоту (1,01 г, 5,33 ммоль, 0,2 экв.) и суспензию нагревали с обратным холодильником в течение 4 часов с последующими 15 часами перемешивания. Реакционную смесь фильтровали через Celite® и растворители выпаривали. Остаток растворяли в этилацетате (200 мл) и промывали насыщенным водн. раствором NaCl (2×150 мл). Очистка колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (циклогексан/этилацетат 9: 1) дает смесь изомеров *O*-метилоксима 2:3,4:5-диизопропилиден-D-арабинозы (IIЕ/IIZ) и неизвестной примеси (ЯМР, соотношение 6:1:0,4, 5,83 г) в виде бесцветного масла. Эту смесь использовали без дополнительной

очистки на следующей стадии. Аликвоту чистого (2E) получали второй флэш-хроматографией на колонке (дихлорметан/МТВЕ 98:2) и характеризовали.

Изомер (IIЕ):

Rf (CH₂Cl₂/МТВЕ 98:2): 0,35.

ИК (см⁻¹): 2987, 2939, 2900, 2821, 1631, 1456, 1381, 1371, 1241, 1212, 1150, 1065, 1038, 887, 842.

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ: 7,35 (д, 1H, J_{1,2} 6,3 Гц, H-1); 4,46 (дд, 1H, J_{2,3} 7,1, J_{1,2} 6,3 Гц, H-2); 4,13 (ддд, 1H, J_{3,4} 6,9, J_{4,5a} 6,1, J_{4,5b} 4,8 Гц, H-4); 4,08 (дд, 1H, J_{5a,5b} 8,5, J_{4,5a} 6,1 Гц, H-5a); 3,97 (д, 1H, J_{2,3} 7,1, J_{3,4} 6,9 Гц, H-3); 3,94 (дд, 1H, J_{5a,5b} 8,5, J_{4,5b} 4,8 Гц, H-5b); 3,85 (с, 3H, CH₃-O); 1,40 (с, 3H, CH₃-C); 1,38 (с, 6H, 2 CH₃-C); 1,32 (с, 3H, CH₃-C).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ: 147,8 (C-1); 110,8 (C-6); 110,0 (C-7); 79,4(C-3); 76,7 (C-2); 76,6 (C-4); 67,1 (C-5); 62,1 (CH₃-O); 27,1, 27,0, 26,9, 25,4 (4 CH₃-C).

МСВР (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₁₂H₂₂NO₅⁺) Вычисл. m/z: 260,1492, найдено: 260,1502.

***O*-метилоксим 2:3-изопропилиден-D-арабинозы (соединение III)**

Раствор *O*-метилоксима 2:3,4:5-диизопропилиден-D-арабинозы (II) (IIЕ/IIZ) и примеси (1,50 г) в 80%-ной (об./об.) водной уксусной кислоте (30 мл) нагревали при температуре 40°C при давлении 200 мбар на ротационном испарителе. Через 2,5 часа растворители удаляли при пониженном давлении и остаток упаривали вместе с толуолом. Смесь изомеров *O*-метилоксима 2:3-изопропилиден-D-арабинозы (IIЕ/IIZ) (ЯМР, соотношение 4:1, 876 мг, 58% за 3 стадии) получали после колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (циклогексан/этилацетат. 1:1) в виде бесцветного масла. Чистота более 95% по данным ЯМР.

Rf (циклогексан/этилацетат 1:1): 0,24.

ИК (см⁻¹): 3409, 2939, 1373, 1216, 1040, 885.

МСВР (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₉H₁₈NO₅⁺) Вычисл. m/z: 220,1179, найдено: 220,1184.

Изомер (IIIЕ):

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ: 7,44 (д, 1H, J_{1,2} 5,5 Гц, H-1); 4,56 (дд, 1H, J_{2,3} 7,4, J_{1,2} 5,5 Гц, H-2); 4,07 (дд, 1H, J_{2,3} 7,4, J_{3,4} 5,6 Гц, H-3); 4,13 (ддд, 1H, J_{3,4} 5,6, J_{4,5} 5,1, J_{4,5} 4,7 Гц, H-4); 3,84 (с, 3H, CH₃-O); 3,72-3,68 (м, 2H, 2 H-5); 1,42 (с, 3H, CH₃-C); 1,38 (с, 3H, CH₃-C).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ: 149,1 (C-1); 110,3 (C-6); 79,4 (C-3); 75,0 (C-2); 71,6 (C-4); 63,4 (C-5); 62,2 (CH₃-O); 26,9, 26,7 (2 CH₃-C).

Изомер (IIIZ):

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ: 6,86 (д, 1H, J_{1,2} 5,9 Гц, H-1); 4,95 (дд, 1H, J_{2,3} 7,7, J_{1,2} 5,9 Гц, H-2); 3,92 (с, 3H, CH₃-O); 3,87 (дд, 1H, J_{2,3} 7,7, J_{3,4} 6,9 Гц, H-3); 3,82-3,75 (м, 2H, H-4, H-5a); 3,72-3,68 (м, 1H, H-5b); 1,40 (2s, 6H, 2 CH₃-C).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ: 151,0 (C-1); 110,9 (C-6); 80,4(C-3); 72,9 (C-2); 72,7 (C-4); 63,5 (C-5); 62,8 (CH₃-O); 27,0, 26,5 (2 CH₃-C).

***O*-метилоксим 2:3-изопропилиден-5-*O*-метансульфонил-D-арабинозы (соединение IV)**

К раствору *O*-метилоксима 2:3-изопропилиден-*D*-арабинозы (III) (ШЕ/ШЗ) (100 мг, 0,46 ммоль, 1,0 экв.) в сухом пиридине (2,0 мл) при температуре -20°C добавляли мезилхлорид (0,10 мл, 1,37 ммоль, 3,0 экв.) и реакционную смесь перемешивалась в течение 1,5 часов при температуре -20°C. После гашения реакции CH_3OH (0,3 мл) растворители удаляли в вакууме. Полученный остаток очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (циклогексан/этилацетат 6:4) с получением смеси изомеров *O*-метилоксима 2:3-изопропилиден-5-*O*-метансульфонил-*D*-арабинозы (IVE/IVZ) (ЯМР, соотношение 4:1, 110 мг, 81%) в виде бесцветного масла. Аликвоту чистого (IVE) изомера получали с помощью колоночной флэш-хроматографии (дихлорметан/диэтиловый эфир 9:1) и характеризовали. Чистота более 95% по данным ЯМР.

Rf (циклогексан/этилацетат 6:4): 0,24.

ИК (cm^{-1}): 3500, 2989, 2941, 2824, 1631, 1458, 1350, 1215, 1170, 1067, 1033, 959, 887, 863, 833.

МСВР (ESI⁺): [M+H]⁺ ($\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NO}_7\text{S}^+$) Вычисл. m/z: 298,0955, найдено: 298,0947.

Изомер (IVE):

Rf (циклогексан/этилацетат 6:4): 0,20.

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ : 7,42 (д, 1H, J_{1,2} 5,6 Гц, H-1); 4,56 (дд, 1H, J_{2,3} 6,8, J_{1,2} 5,6 Гц, H-2); 4,41 (дд, 1H, J_{5a,5b} 11,0, J_{4,5a} 2,7 Гц, H-5a); 4,28 (дд, 1H, J_{5a,5b} 11,0, J_{4,5b} 5,7 Гц, H-5b); 4,03 (ддд, 1H, J_{3,4} 7,0, J_{4,5b} 5,7, J_{4,5a} 2,7 Гц, H-4); 4,01 (дд, 1H, J_{2,3} 6,8, J_{3,4} 7,0 Гц, H-3); 3,85 (с, 3H, CH₃-O); 3,06 (с, 3H, CH₃-S); 1,41 (с, 3H, CH₃-C); 1,39 (с, 3H, CH₃-C).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl_3) δ : 148,2 (C-1); 110,9 (C-6); 77,9 (C-3); 76,2 (C-2); 70,9 (C-5); 70,8 (C-4); 62,3 (CH₃-O); 37,8 (CH₃-S); 27,0, 26,9 (2 CH₃-C).

Изомер (IVZ):

¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ : 6,87 (д, 1H, J_{1,2} 5,9 Гц, H-1); 4,96 (дд, 1H, J_{2,3} 7,3, J_{1,2} 5,9 Гц, H-2); 4,45 (дд, 1H, J_{5a,5b} 11,4, J_{4,5a} 2,4 Гц, H-5a); 4,29 (дд, 1H, J_{5a,5b} 11,4, J_{4,5b} 7,9 Гц, H-5b); 3,98 (ддд, 1H, J_{4,5b} 7,9, J_{4,3} 7,5, J_{4,5a} 2,4 Гц, H-4); 3,93 (с, 3H, CH₃-O); 3,84 (дд, 1H, J_{3,4} 7,5, J_{3,2} 7,3 Гц, H-3); 3,06 (с, 3H, CH₃-S); 1,40 (с, 3H, CH₃-C); 1,39 (с, 3H, CH₃-C).

¹³C-ЯМР (75 МГц, CDCl_3) δ : 150,7 (C-1); 111,2 (C-6); 79,1 (C-3); 72,9 (C-2); 71,3 (C-5); 70,9 (C-4); 62,9 (CH₃-O); 37,9 (CH₃-S); 27,0, 26,6 (2 CH₃-C).

***O*-метилоксим 5-азидо-5-дезоксид-2:3-изопропилиден-*D*-арабинозы (соединение V):**

К раствору (IVE/IVZ) (810 мг, 2,72 ммоль, 1,0 экв.) в *N,N*-диметилформамиде (30,0 мл, 0,10 М) добавляли азид натрия (531 мг, 8,17 ммоль, 3,0 экв.) и реакционную смесь нагревали при температуре 80°C в течение 15 часов. Затем растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (циклогексан/этилацетат 9:1) с получением смеси изомеров *O*-метилоксима 5-азидо-5-дезоксид-2:3-изопропилиден-*D*-арабинозы (VE/VZ) (ЯМР соотношение 7:3, 637 мг, 96%) в виде масла желтоватого цвета. Фракцию (VE) выделяли с помощью колоночной флэш-хроматографии (дихлорметан/МТВЕ 97:3) для ее характеристики. Чистота более 95% по данным ЯМР.

Rf (циклогексан/этилацетат 8:2): 0,30.

ИК (см⁻¹): 3458, 2989, 2939, 2823, 2100, 1630, 1443, 1373, 1213, 1164, 1066, 1036, 885, 865.

МСВР (ESI⁺): [M+H]⁺ (C₉H₁₇N₄O₄⁺) Вычисл. m/z: 245,1245, найдено: 245,1250.

Изомер (VE):

Rf (дихлорметан/МТВЕ 97:3): 0,23.

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ: 7,42 (д, 1H, J_{1,2} 5,8 Гц, H-1); 4,54 (дд, 1H, J_{2,3} 7,2, J_{1,2} 5,8 Гц, H-2); 3,98 (дд, 1H, J_{2,3} 7,2, J_{3,4} 6,4 Гц, H-3); 3,92 (ддд, 1H, J_{3,4} 6,4, J_{4,5b} 6,2, J_{4,OH} 3,9, J_{4,5a} 3,8 Гц, H-4); 3,85 (с, 3H, CH₃-O); 3,46 (дд, 1H, J_{5a,5b} 12,5, J_{4,5a} 3,8 Гц, H-5a); 3,42 (дд, 1H, J_{5a,5b} 12,5, J_{4,5b} 6,2 Гц, H-5b); 2,61 (д, 1H, J_{4,OH} 3,9 Гц, OH); 1,41 (с, 3H, CH₃-C); 1,39 (с, 3H, CH₃-C).

¹³C-ЯМР (125 МГц, CDCl₃) δ: 148,4 (C-1); 110,6 (C-6); 78,8(C-3); 75,8 (C-2); 71,5 (C-4); 62,3 (CH₃-O); 53,7 (C-5); 27,0, 26,8 (2 CH₃-C).

Изомер (VZ):

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ: 6,86 (д, 1H, J_{1,2} 6,1 Гц, H-1); 4,94 (дд, 1H, J_{2,3} 7,2, J_{1,2} 6,1 Гц, H-2); 3,93 (с, 3H, CH₃-O); 3,87 (ддд, 1H, J_{3,4} 7,5, J_{4,5b} 6,4, J_{4,5a} 2,8 Гц, H-4); 3,82 (дд, 1H, J_{3,4} 7,5, J_{2,3} 7,2 Гц, H-3); 3,47 (дд, 1H, J_{5a,5b} 12,8, J_{4,5a} 2,8 Гц, H-5a); 3,39 (дд, 1H, J_{5a,5b} 12,8, J_{4,5b} 6,4 Гц, H-5b); 1,40 (с, 3H, CH₃-C); 1,38 (с, 3H, CH₃-C).

¹³C-ЯМР (75 МГц, CDCl₃) δ: 150,8 (C-1); 111,0 (C-6); 80,0 (C-3); 72,9 (C-2); 72,5 (C-4); 62,8 (CH₃-O); 53,5 (C-5); 26,9, 26,5 (2 CH₃-C).

5-азидо-5-дезоксид-2:3-изопропилиден-D-арабиноза (соединение VI)

К раствору (VE/VZ) (820 мг, 3,36 ммоль, 1,0 экв.) в 80%-ной (об./об.) водной уксусной кислоте (120 мл) добавляли формальдегид (0,8 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 час при комнатной температуре. Растворители удаляли при пониженном давлении и выпаривали совместно с толуолом, чтобы гарантировать полное удаление уксусной кислоты. Получали сырое соединение 5-азидо-5-дезоксид-2:3-изопропилиден-D-арабинозу (VI) (682 мг).

Бесцветное масло

Rf (циклогексан/этилацетат 7:3): 0,56.

ИК (см⁻¹): 3408, 2988, 2936, 2100, 1733, 1440, 1373, 1238, 1213, 1164, 1063, 863.

¹H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ: 9,79 (д, 1H, J_{1,2} 1,2 Гц, H-1); 4,41 (дд, 1H, J_{2,3} 6,4, J_{1,2} 1,2 Гц, H-2); 4,04 (дд, 1H, J_{2,3} 6,4, J_{3,4} 6,1 Гц, H-3); 3,90 (ддд, 1H, J_{4,5b} 6,4, J_{3,4} 6,1, J_{4,5a} 3,4 Гц, H-4); 3,51 (дд, 1H, J_{5a,5b} 12,8, J_{4,5a} 3,4 Гц, H-5a); 3,43 (дд, 1H, J_{5a,5b} 12,8, J_{4,5b} 6,4 Гц, H-5b); 1,47 (с, 3H, CH₃-C); 1,37 (с, 3H, CH₃-C).

МСВР (ESI⁺): [2M+Na]⁺ (C₁₆H₂₆N₆NaO₈⁺) Вычисл. m/z: 453,1704, найдено: 453,1726.

5-азидо-5-дезоксид-арабиурофураноза (соединение VII, Ara-N₃)

К раствору 5-азидо-5-дезоксид-2:3-изопропилиден-D-арабинозы (VI) (100 мг) в смеси CH₂Cl₂/H₂O (20:1, 21 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (1 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем растворители выпаривали, сырой остаток ресуспендировали в воде и лиофилизовали. После колоночной

флэш-хроматографии на диоксиде кремния (дихлорметан/метанол 92:8) получали соединение 5-азидо-5-дезоксид-арабиурофуранозу или Aga-N₃ (VII) (50 мг, 58% за 2 стадии из соединения (V)) в виде смеси α/β-аномеров (ЯМР, соотношение 55:45) в виде бесцветного масла. Чистота более 95% по данным ЯМР.

Rf (дихлорметан/метанол 92:8): 0,28.

ИК (см⁻¹): 3367, 2106, 1281, 1040.

МСВР (ESI⁺): [M+H-N₂]⁺ (C₅H₁₀NO₄⁺) Вычисл. m/z: 148,0604, найдено: 148,0610.

Аномер альфа (VIIα):

¹H-ЯМР (500 МГц, D₂O) δ: 5,24 (д, 1H, J_{1,2} 2,9 Гц, H-1); 4,17 (ддд, 1H, J_{3,4} 6,4, J_{4,5b} 5,8, J_{4,5a} 3,5 Гц, H-4); 4,01 (дд, 1H, J_{2,3} 4,6, J_{1,2} 2,9 Гц, H-2); 3,97 (дд, 1H, J_{3,4} 6,4, J_{3,2} 4,6 Гц, H-3); 3,64 (дд, 1H, J_{5a,5b} 13,6, J_{4,5a} 3,5 Гц, H-5a); 3,44 (дд, 1H, J_{5a,5b} 13,6, J_{4,5b} 5,8 Гц, H-5b).

¹³C-ЯМР (125 МГц, D₂O) δ: 101,0 (C-1); 81,3 (C-4); 81,2 (C-2); 76,3 (C-3); 51,5 (C-5).

Аномер бета (VIIβ):

¹H-ЯМР (500 МГц, D₂O) δ: 5,28 (шир. д, 1H, J_{1,2} 3,1 Гц, H-1); 4,10-4,05 (м, 2H, H-2, H-3); 3,89 (ддд, 1H, J_{3,4} 7,1, J_{4,5b} 6,5, J_{4,5a} 3,5 Гц, H-4); 3,59 (дд, 1H, J_{5a,5b} 13,3, J_{4,5a} 3,5 Гц, H-5a); 3,42 (дд, 1H, J_{5a,5b} 13,3, J_{4,5b} 6,5 Гц, H-5b).

¹³C-ЯМР (125 МГц, D₂O) δ: 95,2 (C-1); 79,6 (C-4); 75,8 (C-2); 74,7 (C-3); 52,6 (C-5).

Пример 2: Маркировка неопухолевых и опухолевых эукариотических клеток мочевого пузыря

Материал и методы:

Культура клеток:

Уроэпителиальные клетки человека (SV-HUC-1) и карцинома мочевого пузыря человека (T24) были приобретены в ATCC (Манассас, Ван, США). Эти клеточные линии выращивали в среде RPMI 1640 со средой глутамина 1 (Lonza Biowhittaker) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (VWR international S.A.S). Питательную среду меняли каждые два дня. Пассирование клеток проводили с использованием Tруп-LE express 1x (Gibco). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью тестов исключения трипанового синего.

Воздействие на клетки зонда Aga-N₃:

Клетки SV-HUC-1 и T24 высевали в 24-луночные планшеты при плотности 5×10⁴ клеток/лунку. Затем клетки инкубировали при температуре 37°C, 5% в CO₂ в течение 24 часов. После этого культуральную среду из каждой лунки удаляли, и прикрепленные клетки дважды промывали фосфатным буфером с солевым раствором (PBS) (Lonza Biowhittaker), перед затем воздействовали зондом Aga-N₃ (10 мМ). Зонд добавляли в культуральную среду с различными концентрациями FBS (3% и 10%). Затем клетки снова инкубировали при температуре 37°C, 5% в CO₂ в течение 24 часов. Контрольные клетки культивировали с использованием культуральной среды с добавлением 5% или 10% FBS без добавления Aga-N₃.

Маркировка антителами к биотину:

Ассимиляцию флуоресценции зондов Ara-N₃ визуализировали с помощью клик-химии без меди с использованием сульфо-DBCO-биотина (1 мМ) с последующим мечением конъюгатом мышиных анти-биотин Alexa Fluor 488 антитела (исходный раствор 0,62 мг/мл, Jackson ImmunoResearch, разведение 1/10). Клик-реакцию проводили следующим образом: через 24 часа инкубации культуральные среды удаляли и прикрепленные клетки дважды промывали PBS. Клетки отделяли с помощью Труп-LE, дважды промывали PBS и центрифугировали при 13000 g в течение 2 минут. Осадки клеток ресуспендировали в 10 мкл сульфо-DBCO-биотина и инкубировали 30 мин в темноте при температуре 37°C. Затем клетки дважды промывали PBS, центрифугировали и клеточные осадки ресуспендировали с 10 мкл раствора мышиных анти-биотин антител перед тем, как инкубировать при комнатной температуре в темноте. После этого клетки дважды промывали PBS и небольшие пятна клеточной суспензии (5 мкл) помещали на слайды для адгезии polysine® (VWR international S.A.S) в темной комнате до высыхания (20 мин). Пятна фиксировали 4% параформальдегидом в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Затем предметные стекла дважды промывали PBS, а затем закрывали квадратными покровными стеклами (VWR international S.A.S) с глицериновой монтажной средой (Dako) и хранили при температуре 4°C в темной комнате.

Флуоресцентная микроскопия:

Сбор данных по флуоресценции регистрировали с помощью Olympus Microscopy IX83 (Olympus Life Science), оснащенной объективом с цифровым отверстием 60X/1,3/1,4 SRI (силиконовый показатель преломления) и камерой Hamamatsu orea flash 4 LT с калиброванным размером пикселя 109 нм/пиксель. Свет возбуждения испускался X-CITE 120LED с использованием фильтра возбуждения AT180/30X, а сигнал контролировался с помощью фильтра излучения AT535/40m. Время экспозиции в зеленом свете составляло 600 мс, а время экспозиции в белом свете определялось методами DIC и составляло 340 мс. Размер области сбора данных, проанализированный программным обеспечением Cellsens Dimension V1.16, отличался в зависимости от количества клеток, содержащихся в пятне.

Обработка изображений и количественная оценка флуоресценции:

Изображения обрабатывали с использованием единицы измерения и подсчета программного обеспечения Cellsens Dimension V1.16. Фоновый шум удалялся следующим образом: сначала определялась область интереса на фоне изображения и вычислялась средняя интенсивность пикселей. Полученное таким образом значение было вычтено из всех пикселей изображения. Интенсивность флуоресценции каждой клетки определяли по пороговому значению, равному 3030. Все пиксели с интенсивностью ниже 3030 не подсчитывались.

Результаты:

Таблица 1: Оценка меченых клеток% через 24 часа - концентрация FBS 3%

Интенсивность/мкм²	SV-HUC1% (n=239)	T24% (n=226)
0-50000	62,34	2,21

50000-100000	2,51	2,65
100000-150000	2,09	2,65
150000-200000	1,26	5,75
200000-250000	1,67	3,98
250000-300000	3,77	3,54
300000-350000	0,42	2,21
350000-400000	0,42	3,98
400000-450000	0,84	2,65
450000-500000	2,93	3,54
>500000	21,76	66,81

Таблица 2: Оценка меченых клеток% через 24 ч - концентрация FBS 10%

Интенсивность/мкм ²	SV-HUC1% (n=301)	T24% (n=282)
0-50000	73,45	1,42
50000-100000	4,32	2,13
100000-150000	1,66	2,48
150000-200000	1,33	1,42
200000-250000	0,66	2,13
250000-300000	0,66	1,42
300000-350000	0,33	1,77
350000-400000	0,66	2,48
400000-450000	0,66	3,19
450000-500000	1,33	2,13
>500000	14,62	79,43

Результаты таблиц 1 и 2 показывают больший % меченых клеток для клеток T24 по сравнению с клетками SV-HUC1 через 24 часа, тем самым демонстрируя большую ассимиляцию зондов Aga-N₃ для клеток опухолевого пузыря. Более конкретно, при интенсивности/мкм² выше, чем 500000, SV-HUC1% составляет 21,76, а T24% составляет 66,81 при концентрации FBS 3%, SV-HUC1% составляет 14,62 и T24% составляет 79,42 при концентрации FBS 10%, тогда как при низкой интенсивности полученные % меченых клеток являются противоположными. Общее распределение интенсивности различается для нормальных и раковых клеток.

Пример 3: Мечение нераковых и раковых эукариотических клеток

Материал и методы:

Были выполнены те же эксперименты, что и в примере 2, с другими раковыми и соответствующими нераковыми клетками. Культуральные среды были адаптированы к тестируемым клеткам и дополнены 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (FBS). В

культуральную среду с концентрацией FBS (10%) добавляли зонд Ara-N₃ (10 мМ). Время инкубации соответствовало времени одного или двух удвоений тестируемых клеток (см. таблицу ниже).

Отношения сигнала флуоресценции "рак/не рак" рассчитывали на основе интенсивностей флуоресценции, полученных с Ara-N₃, испытанным на раковых и соответствующих не раковых клетках.

Результаты:

Результаты представлены ниже (таблица 3) и показывают более высокую интенсивность флуоресценции для тестируемых линий раковых клеток по сравнению с соответствующими линиями нераковых клеток (соотношение выше 1).

Линия раковых клеток человека	Орган	Заболевание	Время удвоения	Линия нераковых клеток человека	Орган	Время удвоения	Соотношение рак/не рак	
THP1	Кровь	моноцитарный острый лейкоз	26 ч	Моноциты/макрофаги	Кровь	26 ч	19,5	
KCL22	Кровь	хронический миелолейкоз	24 ч	Лимфоциты	Кровь	24 ч	4,9	
A431	Кожа	Эпидермоидная карцинома	30 ч	HaCat	Кожа	30 ч	17,5	
A375	Кожа	Злокачественная меланома	26 ч	PIG	Кожа	26 ч	3,5	
PANC	Поджелудочная железа	Карцинома поджелудочной железы	32 ч	HPNE	Поджелудочная железа	32 ч	1,8	
NAMALWA	Лимфоцит В	Лимфома Беркитта, связанная с вирусом Эпштейна-Барра	20 ч	B12-F8	Лимфоцит В	24 ч	2,3	
Kasumi-1	Кровь	Острый миелоидный лейкоз	48 ч	B12-F8	Кровь	24 ч	1,5	
K562	Кровь	Хронический миелоидный лейкоз	24 ч	Лимфоциты Т	Кровь	24 ч	1,6	
HL-60	Кровь	Острый миелоидный лейкоз	28 ч	Лимфоциты Т	Кровь	24 ч	1,6	
RS4	Кровь	Острый лимфобластный лейкоз	35 ч	Лимфоциты Т	Кровь	24 ч	1,6	
HT29	толстая кишка	Колоректальная аденокарцинома	40 ч	Эпителиальные клетки толстой кишки	толстая кишка	40 ч	13,2	тест на 2 время удвоения
AGS	Желудок	Аденокарцинома молочной железы	30 ч	Эпителиальные клетки желудка	Желудок	30 ч	2,9	тест на 2 время удвоения
MDA-MB-231	Молочная железа	Аденокарцинома молочной железы	40 ч	Эпителиальные клетки молочной	Молочная железа	40 ч	2,5	тест на 2 время удвоения

				железы				
A549	Легкое	Карцинома	40 ч	Эпителиальны е клетки бронхов	Легкое	40 ч	7,7	тест на 2 время удвоения
BL-2	Кровь	неэндемичная лимфома Беркитта	24 ч	Изолированны е первичные В-клетки	Кровь		2,5	
DOHH-2	Кровь	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома типа В-клеток зародышевого центра	40-48 ч	Изолированны е первичные В-клетки	Кровь		7,4	
OCI-Ly3	Кровь	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома	24 ч	Изолированны е первичные В- клетки	Кровь		6,2	
OCI-Ly10	Кровь	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома	24 ч	Изолированны е первичные В- клетки	Кровь		2,1	
SU-DHL-4	Кровь	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома типа В-клеток зародышевого центра	40 ч	Изолированны е первичные В- клетки	Кровь		2,5	
MDA MB175	Молочная железа	Рак молочной железы	30 ч	НМЕ-1	Молочная железа	30 ч	2	
MDA MB453	Молочная железа	Рак молочной железы	30 ч	НМЕ-1	Молочная железа	30 ч	2,2	
SK-BR-7	Молочная железа	Рак молочной железы	30 ч	НМЕ-1	Молочная железа	30 ч	2,1	

Такие же эксперименты были проведены с другими раковыми клетками человека, включая более конкретно следующие (таблица 4) по сравнению с подобранными нераковыми клетками:

Таблица 4

Линия раковых клеток человека	Орган	Заболевание
U87	Мозг	Глиобластома
HUH6	Печень	Гепатобластома
HUH7	Печень	Карцинома печени
786-O	Почки	Почечно-клеточный рак
NCI-H28	Легкое	Саркоматоидная мезотелиома плевры
SW 684	Мышцы	Фибросаркома
IMR-32	Мозг	Нейробластома
MDA PCa 2b	Простата	Аденокарцинома
AGS	Желудок	Аденокарцинома желудка
Kato III	Желудок	Карцинома желудка
NCI-N87	Желудок	Карцинома желудка

Ожидается, что будут получены те же результаты, что и в таблице 3, то есть более высокая интенсивность флуоресценции для тестируемых линий раковых клеток по сравнению с соответствующими линиями нераковых клеток (в частности, соотношение выше 1).

Пример 4: Сравнение мечения Ara-N₃ и KDO-N₃

KDO-N₃ (8-азидо-3,8-дидезокси-D- маннооктулозоновая кислота) описан в заявке на патент WO2013/107759 как полезный инструмент для мечения бактерий.

Ara-N₃ и KDO-N₃ анализировали в тех же условиях, что и в примере 2, с другими линиями клеток человека: HeLa, Raw и Macrophages.

Указанные клеточные линии не были мечены KDO-N₃ (не наблюдалась интенсивность флуоресценции), тогда как указанные клеточные линии были помечены Ara-N₃.

Пример 5: Нетоксичность зонда Ara-N₃ по отношению к клеткам (*in vitro/in vivo*)

A-Эксперименты *in vitro*

Материалы и методы

Зонд Ara-N₃ получали, как подробно описано выше.

Линии клеток (как подробно описано ниже в таблице) были предоставлены трансферной ячейкой Inserm/Aquiderm. Культивирование клеточных линий и тесты на цитотоксичность также проводились с помощью трансферной клетки Aquiderm в лаборатории INSERM U1035.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови
(моноцитов/лимфоцитов)

Мононуклеарные клетки человека были выделены из периферической крови от 2 разных здоровых доноров в соответствии с соглашением, установленным Etablissement Français du Sang d'Aquitaine. Используемая методика представляла собой градиентную изоляцию фиколла. Вкратце, кровь, разбавленную фосфатно-солевым буфером (PBS), наносили на раствор сахарозы (Ficoll, Eurobio) и центрифугировали для разделения различных элементов крови. Между фиколлом и плазмой было установлено клеточное кольцо, состоящее из моноцитов и лимфоцитов. Его извлекали и промывали PBS для подсчета клеток Малассеза.

Моноциты CD14+ человека выделяли из лимфоцитов с помощью магнитных шариков, связанных с антителом против CD14 (Miltenyi Biotech). Мононуклеарные клетки инкубировали в течение 15 минут в буфере PBS в присутствии определенной концентрации шариков в зависимости от количества клеток. Затем клетки промывали PBS и затем помещали на колонку, установленную на сильном магните. Клетки CD14+, прикрепленные к магнитному шарикам против CD14, могут оставаться прикрепленными к колонке. После промывки колонку снимали с магнитной подложки и отсоединяли клетки, промывая колонку в буфере PBS.

Число моноцитов определяли путем подсчета клеток Малассеза.

Культура клеток

Клетки культивировали в печи при температуре 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности в различных питательных средах:

- либо в среде RPMI 1640 с добавлением 10% декомплементарной FCS (эмбриональная телячья сыворотка) и антибиотиков пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептавидина (100 мкг/мл) для пары Моноциты/THP1.

- либо в среде DMEM с добавлением 10% декомплементарной FCS и антибиотиков пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептавидина (100 мкг/мл) для пары Hscat/A431.

Среду для культивирования меняли каждые 2 дня на протяжении всего исследования.

Когда культуры достигли 70-80% слияния, прилипшие клетки отделили с помощью 10% трипсина-EDTA. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью теста исключения трипанового синего.

Контакт с зондом Aga-N₃

Все клетки высевали в планшеты для культивирования либо в 96 лунок при плотности 1×10⁴ клеток/лунку для теста пролиферации MTS, либо в 24 лунки при плотности 5×10⁴ клеток/лунку для теста Annexin V/IP. контрольная работа. Затем клетки инкубировали при температуре 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов. Через 24 часа культуральную среду меняли во всех лунках, и клетки, прилипшие к дну лунок, дважды промывали в PBS (Eurobio) или центрифугировали и дважды промывали в PBS для клеток

в суспензии, затем подвергали воздействию Aga-N_3 зонд в различных концентрациях: 1, 10, 50 и 100 мМ. Клетки инкубировали при температуре 37°C и 5% CO_2 в течение 48 часов.

Контрольные клетки культивировали с добавленной культуральной средой без добавления зонда Aga-N_3 .

Тест на цитотоксичность аннексина V/IP

Для этого теста необходимо использование набора Annexin V-APC (Biolegend) для обнаружения апоптоза/некроза. В этом тесте используется способность аннексина V связываться с мембранными фосфатидилсеридами (PS) и интеркалирующие свойства пропидия иодида (PI) на ДНК.

Конкретно жизнеспособная клетка экспрессирует PS на внутреннем слое своего мембранного бислоя. Таким образом, PS недоступны для Annexin V-APC. Точно так же клетка сохраняет целостность своей ДНК вдали от ядра, что делает ДНК также недоступной для PI. Когда клетка вступает в апоптоз (запрограммированную смерть клетки), происходит ряд событий. Среди них - инверсия слоев цитоплазматической мембраны. PS, которые экспонировались на внутренней мембране, обнаруживаются на внешней мембране пузырьков, образованных в результате деградации липидного бислоя. Таким образом, они могут фиксировать молекулу аннексина V-APC и излучать флуоресценцию на длине волны 660 нм, которую можно обнаружить с помощью проточной цитометрии.

В процессе апоптоза клетки переходят в некроз. Происходит разрушение ядерной мембраны и выброс ДНК в культуральную среду. PI может быть вставлен между основаниями ДНК и испускать вторую флуоресценцию при 370-550 нм, также обнаруживаемую с помощью проточной цитометрии.

Вкратце, после инкубации клеток с зондом Aga-N_3 в различных концентрациях и в разное время (24 часа и 48 часов) клетки выделяли, трипсинизировали (для прикрепленных клеток) и промывали PBS. После подсчета в трипановом синем на клетке Malassez, клетки инкубировали в буфере для мечения (100 мкл) в присутствии аннексина V-APC (5 мкл) и IP (10 мкл) в течение 15 минут при комнатной температуре и в темный. Затем они были непосредственно проанализированы цитометрией после добавления 100 мкл буфера для метки.

Нетоксичные концентрации Aga-N_3 по отношению к тестируемым клеткам собраны в следующей таблице 5.

В- Эксперименты *in vivo*

Материалы и методы

Зонд Aga-N_3 получали, как подробно описано выше.

Десять голых мышей-самок NMRI (возраст 6 недель, Janvier, Le Genest-Saint Isle, Франция) были включены в этот анализ. Трех мышам вводили внутривенно через день в течение 8 дней (4 инъекции) 50 мг/мышь/ инъекцию Aga-N_3 для кумулятивной дозы 200 мг, а еще трех мышей лечили в течение 8 дней 50 мг Aga-N_3 в 8 мл. воды, потребляемой в день, на кумулятивную дозу 400 мг. В качестве контрольных групп четырех мышей с опухолями не лечили.

В конце лечения мышей умерщвляли и вскрывали. Сердце, легкие, мозг, матка, яичники, почки, скелетные мышцы, селезенка, поджелудочная железа, брюшной жир, печень, кожа, желудок, толстая кишка, слепая кишка, тонкий кишечник, брыжеечные лимфатические узлы, подмышечные лимфатические узлы, плечевые лимфатические узлы и общий объем крови. собирают и замораживают для анализов.

Результаты

Введение Ara-N₃ в питьевую воду (до 6,25 мг/мл) не повлияло на потребление воды мышами.

Лечение Ara-N₃ либо с питьевой водой, либо с помощью внутривенных инъекций не вызывало потери веса тела.

Таблица 5 (*in vitro/in vivo*)

	Линии клеток/тип клеток/модель	Нетоксичная концентрация Ara-N ₃
<i>In vitro</i>	НАСАТ (иммортиализованные клеточные линии)	>10 мМ
	A431 (линии опухолевых клеток)	>10 мМ
	Макрофаги (первичные клетки)	>10 мМ
	THP1 (линии опухолевых клеток)	>10 мМ
	HME1 (иммортиализованные клеточные линии)	>1 мМ
	MDA MB175 (линии опухолевых клеток)	>1 мМ
	MDA MB231 (линии опухолевых клеток)	>1 мМ
	MDA MB453 (линии опухолевых клеток)	>1 мМ
<i>In vivo</i>	Голая мышь (мышь)	>1 мМ

Пример 6: Специфическое мечение зонда Ara-N₃ в отношении линий опухолевых клеток (*in vivo*)

Материалы и методы

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с институциональными руководящими принципами Европейского экономического сообщества по использованию лабораторных животных (EU Directive 2010/63/EU) и были утверждены Министерством высшего образования и науки Франции под номером APAFIS#8854-2017031314338357.

Ксенотрансплантаты подкожных опухолей

Самкам мышей NMRI nude (возраст 6 недель, Janvier, Le Genest-Saint Isle, Франция) вводили подкожно в бок 8×10^6 клеток Панс-1 в 1X PBS.

Лечение Ara-N₃ внутривенными инъекциями: оценивали кумулятивные 20 мг дозы Ara-N₃.

Через 10 дней после имплантации опухолевых клеток мышей с опухолью Panc-1 лечили через день в течение 21 дня (11 инъекций) 1,8 мг/мышь/инъекцию Aga-N₃ для **кумулятивной дозы 20 мг** соответственно (n=3 мыши на дозу).

Без лечения: В качестве контрольных групп не лечили трех мышей с опухолями на клеточную линию (Ctr).

Введение контрастного вещества

DBC0-IRDye800CW

Мыши, получавшие внутривенные инъекции

Двум мышам с опухолью Panc-1 на каждое условие лечения внутривенно вводили 100 мкг DBC0-IRDye800CW через 24 часа после последней лечебной инъекции (Aga-N₃+Fluo).

Контрольные мыши

- Одной необработанной мышью с опухолью Panc-1 внутривенно вводили 100 мкг DBC0-IRDye800CW (Ctr+Fluo).

Анализ данных флуоресцентной визуализации (ex vivo)

Мышей умерщвляли и вскрывали через 48 часов после инъекции DBC0-IRDye800CW. Флуоресцентную визуализацию ex vivo выполняли на скелетных мышцах и опухоли.

Полуколичественные данные были получены из флуоресцентных изображений путем рисования вручную областей интереса (ROI), скорректированных на области опухоли, подлежащей количественной оценке. Общий сигнал флуоресценции, измеренный в ROI, делится на количество пикселей в ROI. Таким образом, данные выражаются в единицах относительной флуоресценции (RLU) на пиксель скелетных мышц и опухоли. Затем рассчитывается соотношение сигналов флуоресценции опухоли и скелетных мышц (отношение опухоль/мышца).

Результаты представлены на **фигуре 1**.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

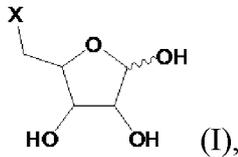
1. Способ *in vitro* мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку многоклеточного организма, включающий стадии:

а) контактирования образца, содержащего эукариотические клетки, по меньшей мере с одним модифицированным моносахаридным соединением или его предшественником;

б) контактирования образца, полученного на стадии (а), с соединением, содержащим первую реакционноспособную группу, необязательно, в присутствии меди; и

с) необязательно, обнаружения связи соединения стадии (б) с моносахаридом стадии (а) для обнаружения эукариотических клеток;

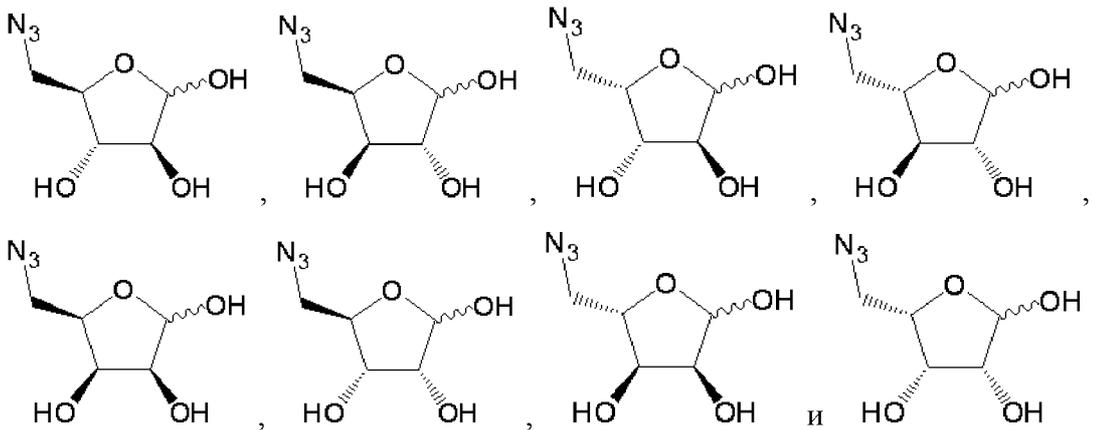
где указанное по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение имеет следующую формулу (I):



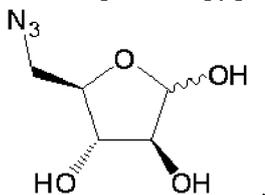
в которой X представляет собой вторую реакционноспособную группу, первая и вторая реакционноспособные группы способны взаимодействовать вместе в реакции клик-химии.

2. Способ по п.1, где вторая реакционная группа X представляет собой азидогруппу (-N₃) и первая реакционная группа представляет собой алкиновую группу.

3. Способ по п.1 или 2, где указанное по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) выбрано из группы, состоящей из следующих формул:



4. Способ по любому из пп.1-3, где по меньшей мере одно указанное модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) представляет собой 5-азидо-5-дезоксид-D-арабинофуранозу, имеющую следующую формулу:



5. Способ идентификации или выделения раковых клеток *in vitro* или *ex vivo*, где указанный способ включает осуществление способа по любому из пп.1-4.

6. Способ диагностики рака у субъекта *in vitro* или *ex vivo*, где указанный способ включает осуществление способа по любому из пп.1-4.

7. Способ по п.5 или 6, где способ дополнительно включает стадию обнаружения метки и, необязательно, сравнения метки с контрольным уровнем; и затем идентификацию раковых клеток или диагностику рака на основе измерения метки.

8. Способ по любому из пп.5-7, где образец, полученный на стадии (а), представляет собой биологический образец от субъекта, где указанный субъект страдает раком или подозревается в его наличии.

9. Набор для осуществления способа мечения, обнаружения или нацеливания на эукариотическую клетку по любому из пп.1-7, содержащий:

- модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, предпочтительно, формулы (I'), и

- соединение, несущее первую реакционноспособную группу.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая эукариотическую клетку, имеющую на своей поверхности по меньшей мере одно модифицированное моносахаридное соединение формулы (I) или его предшественник, предпочтительно формулы (I'), определенные в любом из пп.1-7, необязательно, связанное функционально или нет, с противораковым лекарственным средством или с частицами, содержащими противораковое лекарственное средство.

11. Композиция по п.10, где противораковое лекарственное средство представляет собой противоопухолевое лекарственное средство, предпочтительно, выбранное из группы, включающей химиотерапевтические средства, противораковые антитела, гормональную терапию, иммунотерапию и ингибиторы киназ.

12. Композиция по п.10 или 11, где клетка представляет собой изолированную нераковую клетку и, предпочтительно, МСК.

13. Фармацевтическая композиция по п.12 для лечения рака.

14. Фармацевтическая композиция по п.12 для применения при диагностике рака.

15. Способ диагностики рака по п.5 или фармацевтическая композиция для применения по п.13, где рак выбран из рака прямой кишки, колоректального рака, рака желудка, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака шейки матки, рака матки, рака молочной железы, рака яичников, рака мозга, рака легких, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака крови, рака почек, рака печени, рака простаты, множественной миеломы и рака эндометрия.

16. Применение модифицированного моносахаридного соединения или его предшественника, определенных в любом из пп.1-4, для медицинской визуализации или диагностики, предпочтительно, для медицинской визуализации или диагностики рака.

По доверенности

ФИГ.1

