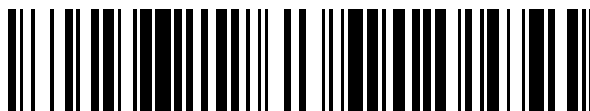


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 781**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)
A61K 49/08	(2006.01)
A61K 49/14	(2006.01)
A61K 51/08	(2006.01)
A61K 51/04	(2006.01)
C07D 257/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2009 PCT/IL2009/000228**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2009 WO09107139**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2009 E 09714191 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2257309**

54 Título: **Conjugados de RGD-(bacterio)clorofila para uso en el diagnóstico de tumores que comprenden dominios necróticos**

30 Prioridad:

27.02.2008 US 64298 P

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

04.06.2020

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LTD. (100.0%)
At The Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SCHERZ, AVIGDOR;
GOLDSHAID, LIAT y
SALOMON, YORAM**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 764 781 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de RGD-(bacterio)clorofila para uso en el diagnóstico de tumores que comprenden dominios necróticos

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la oncología y se refiere a conjugados de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila para uso en el diagnóstico de tumores que comprenden dominios necróticos y a un método para visualizar un tumor con dominios necróticos.

Definiciones y abreviaturas: **Bchl a**: bacterioclorofila a: 7,8,17,18-tetrahidroporfirina pentacíclica con un quinto anillo isocíclico, un átomo de Mg central, un grupo fitilo o geranilgeranilo en la posición 17³, un grupo COOCH₃ en la posición 13², un átomo de H en la posición 13², grupos metilo en las posiciones 2, 7, 12, 18, un grupo acetilo en la posición 3 y un grupo etilo en la posición 8, en esta memoria compuesto **1**; **Bphe**: bacteriofeofitina a (Bchl en la que el Mg central se reemplaza por dos átomos de H); **Bpheid**: bacteriofeoforbida a (el ácido carboxílico libre de C-17² obtenido a partir de Bphe sin el átomo metálico central); **Chl**: clorofila; **Rodobacterioclorina**: 7,8,17,18-tetrahidroporfirina tetracíclica que tiene un grupo -CH₂CH₂COOH en la posición 17, un -COOH en la posición 13, grupos metilo en las posiciones 2, 7, 12, 8 y grupos etilo en las posiciones 3 y 8; **Pd-Bpheid**: Pd-bacteriofeoforbida a; **EC**: células endoteliales; **ECM**: matriz extracelular; **NIR**: infrarrojo cercano; **PDT**: terapia fotodinámica; **RGD-4C**: el nonapéptido cíclico CDCRGDCFC-NH₂; **ROS**: especies de oxígeno reactivas.

La numeración de la IUPAC de los derivados de bacterioclorofila se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva. Usando esta nomenclatura, las bacterioclorofilas naturales son portadoras de dos ésteres de ácido carboxílico en las posiciones 13² y 17², sin embargo, están esterificadas en las posiciones 13³ y 17³.

Antecedentes de la invención

La necrosis y la hipoxia de los tumores primarios y metastásicos se han correlacionado fuertemente con la agresividad del tumor y el mal pronóstico en pacientes con cáncer. Los tumores sólidos que alcanzan cierto tamaño superan su suministro de oxígeno y se vuelven hipóxicos y eventualmente necróticos. En áreas tumorales ubicadas a más de 70 μm de un vaso sanguíneo nutritivo, la presión de oxígeno intersticial disminuye y más allá de una distancia de 150-180 μm, las células se vuelven casi anóxicas (Vaupel et al. 2001). Se cree que la necrosis es el resultado de una isquemia crónica que está causada por un colapso vascular y un rápido crecimiento de las células tumorales que es mayor que la tasa de angiogénesis (Leek et al. 1999).

Las áreas necróticas en los tumores sólidos sufren modificaciones morfológicas. Al principio, la estructura original se conserva básicamente, y las células necróticas mantienen su forma general pero se vuelven altamente eosinófilas. Después de algún tiempo, ese patrón se reemplaza por necrosis por licuefacción, en la cual las estructuras celulares se descomponen (Leek et al. 1999).

Tanto la necrosis como la hipoxia están bien establecidas como indicadores de un pronóstico desfavorable. En el carcinoma de células de transición del tracto urinario superior, el mesotelioma maligno y el carcinoma de células renales (CCR), se sugirió la necrosis como un mecanismo de predicción independiente del desenlace de un cáncer y como una herramienta muy poderosa para fines de pronóstico (Edwards et al. 2003; Sengupta et al. 2005; Lee et al. 2007).

En el carcinoma invasivo de mama, la necrosis se correlacionaba con una alta densidad vascular y angiogénesis, niveles elevados de infiltración focal de macrófagos y disminución de la supervivencia del paciente (Kato et al. 1997; Lee et al. 1997; Leek et al. 1999; Tomes et al. 2003). La necrosis central, que es una característica común del cáncer de mama invasivo, se asoció con un pronóstico desfavorable y agresión tumoral. Se mostró que los macrófagos están atraídos hacia los tumores necróticos a través de factores quimiotácticos, liberados por células tumorales hipóxicas o moribundas (Leek et al. 1999). Se observaron grandes áreas necróticas en el lumen ductal en el carcinoma ductal in situ tipo comedo (invasivo) (DCIS) en oposición al DCIS no de tipo comedo (no invasivo) (Cutuli et al. 2002). La necrosis y la hipoxia en el centro de las lesiones del DCIS con hasta 360 μm de diámetro, mostraban una diferencia biológica notable en la naturaleza y el comportamiento de las células neoplásicas. Por lo tanto, se encontró que la presencia o ausencia de necrosis en los conductos era un criterio factible para la clasificación del DCIS (Bussolati et al. 2000).

Se mostró que la necrosis en la mayoría de este tipo de tumores se asocia con la hipoxia (Tomes et al. 2003). La hipoxia y la anoxia someten a las células tumorales a estrés oxidativo. Se mostró que unas condiciones hipóxicas prolongadas aumentan la tasa de mutaciones, aceleran la progresión del tumor, aumentan la angiogénesis y el potencial metastásico y activan las vías de señalización que favorecen el crecimiento. Una adaptación al estrés oxidativo a menudo hace que las células tumorales sean resistentes a ciertas modalidades terapéuticas (Brown et al., 2001).

La correlación entre necrosis e hipoxia está muy bien establecida, sin embargo, puede haber condiciones hipóxicas que no hayan alcanzado la necrosis, o una necrosis que no refleje necesariamente una hipoxia aguda o grave (Dewhirst 1998). Existen varios genes marcadores para la hipoxia, entre ellos: el factor 1 inducido por hipoxia (HIF1),

el transportador de glucosa 1 y la anhidrasa carbónica IX. Solo una detección de los tres marcadores asegura la clasificación de la necrosis (Tomes et al. 2003), lo que hace que la identificación de un área como necrótica mediante expresión génica sea bastante complicada.

5 Se sabe que las condiciones necróticas e hipóxicas crean un problema importante en la terapia contra el cáncer. Los dominios tumorales hipóxicos son relativamente resistentes al tratamiento con radiación, ya que existe una escasa difusión del ataque con radiación y ya que las células madre que pueden estar presentes eventualmente en el volumen del tumor, no responden bien al tratamiento, lo que da lugar a un nuevo crecimiento tumoral (Brown et al., 1998; Dean et al., 2005). Dado que la mayoría de los reactivos quimioterapéuticos imponen la muerte celular debido a las interacciones con las células que están en el ciclo celular, la detención del ciclo celular debido a la hipoxia da lugar a una resistencia a la quimioterapia convencional, dejando intactas las células que no proliferan o con proliferación lenta (Tannock, 1978). Además, las condiciones hipóxicas generalmente crean un entorno ácido que podría cambiar la naturaleza del fármaco, volviéndolo menos activo (Tannock et al., 1989).

15 Uno de los aspectos más problemáticos de la quimioterapia de tumores sólidos implica la circulación de agentes terapéuticos hacia los tumores y especialmente hacia dominios hipóxicos y necróticos. Los tumores generalmente contienen microvasos irregulares y permeables, con flujo sanguíneo heterogéneo y con grandes distancias entre los vasos. Estas características, además de la ausencia de un drenaje linfático adecuado y las altas presiones intersticiales, hacen que la difusión sea el mecanismo más importante para el transporte extravascular de nutrientes y fármacos a los tumores. Sin embargo, debido a la vascularización no regular, muchas de las células tumorales están a mayores distancias de los capilares que las células en los tejidos normales, lo que se refleja en que tienen concentraciones insuficientes de agentes antitumorales en los sitios celulares. Además, la presión aumentada del líquido intersticial debido a la falta de drenaje linfático, reduce la captación por convección e inhibe aún más la distribución de fármacos a las células tumorales, particularmente la de macromoléculas (Minchinton et al., 2006).

25 Por lo tanto, es de suma importancia la capacidad para detectar áreas hipóxicas y necróticas dentro de tumores *in vivo*. Un conocimiento de los dominios tumorales hipóxicos podría ayudar a elegir el tratamiento adecuado, ya sea mejorando la oxigenación del tumor antes o durante el tratamiento o utilizando estrategias que exploten la hipoxia (Weinmann et al., 2004). Empleando este enfoque, la aplicación de citotoxinas activadas por hipoxia, como las 2-ciclopropil-indoloquinonas, AQ4N, Tirapazamina (TPZ) y PR-104, puede ayudar a mejorar el resultado de un tratamiento (Brown et al., 2004; Lee et al., 2007; Patterson et al. 2007).

30 La histopatología y la inmunohistoquímica se usan comúnmente para la identificación de una necrosis e hipoxia; sin embargo, son métodos invasivos y no permiten la detección *in situ*. Los métodos *in situ* incluyen la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) (Kamel et al. 2003; Metz et al. 2003), la MRI dependiente del nivel de oxigenación de la sangre (Kennan et al. 1997), la tomografía por emisión de positrones (PET) (Lehtio et al. 2004) y la MRI ponderada por difusión (Lang et al. 1998).

35 Los agentes de contraste ávidos de necrosis (NACAs) para la MRI se pueden clasificar en agentes basados en porfirina y no basados en porfirina. Uno de los NACAs a base de porfirina más conocidos es la gadofrina-2, que muestra una acumulación específica de necrosis principalmente en los márgenes del área necrótica. Se sugirió que el mecanismo de acumulación se basaba en la circulación de la albúmina sérica (SA), pero estudios recientes dudan de este enfoque (Hofmann et al. 1999; Ni et al. 2005)

40 La mayoría de las células malignas no pueden crecer formando una masa tumoral clínicamente detectable en ausencia de vasos sanguíneos. Es por eso que los tumores que alcanzan cierto tamaño (aproximadamente 2-3 mm³) tienen que cambiar a un fenotipo angiogénico para favorecer su crecimiento. El cambio a un fenotipo angiogénico puede representar una expresión desequilibrada de factores angiogénicos e inhibidores de la angiogénesis. Una sobreexpresión de factores angiogénicos y una regulación a la baja de los inhibidores de la angiogénesis son necesarias y suficientes para inducir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, y estos dos procesos generalmente ocurren simultáneamente para activar la angiogénesis tumoral (Cao 2005).

45 Las características bioquímicas que significan vasos sanguíneos en los tumores pueden incluir moléculas relacionadas con la angiogénesis, tales como ciertas integrinas. La familia de las integrinas de los receptores de adhesión celular comprende 24 heterodímeros $\alpha\beta$ distintos que reconocen ligandos de glicoproteínas en la matriz extracelular o en las superficies celulares. Muchos miembros de la familia de las integrinas, incluyendo $\alpha5\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alpha11\beta3$, $\alphaV\beta3$, $\alphaV\beta5$, $\alphaV\beta6$ y $\alphaV\beta8$, reconocen un motivo Arg-Gly-Asp (RGD) dentro de sus ligandos. Estos ligandos incluyen fibronectina, fibrinógeno, vitronectina, factor von Willebrand y muchas otras glicoproteínas grandes (Takagi 2004). Por lo tanto, se ha sugerido que las moléculas que contienen un motivo RGD proporcionan nuevas oportunidades para una captación selectiva y, posteriormente, la obtención de imágenes y la detección de lesiones tumorales primarias, áreas necróticas y terapias dirigidas. Este campo de investigación está recibiendo cada vez más atención. Existen muchos artículos sobre el uso de componentes con RGD marcado para la obtención de imágenes (Temming et al. 2005). El principal inconveniente descrito en las publicaciones es la concentración insuficiente del elemento informador en el sitio de tumores de menos de 4-5 mm. Es por eso que el uso de formación de imágenes dirigidas a RGD se restringió principalmente a la exploración PET, que es un método más sensible.

La comprensión del crecimiento tumoral, la formación de metástasis, la interacción tumor-hospedador y la

angiogénesis requiere modelos tumorales que permitan un fácil seguimiento de las células tumorales incluso a nivel individual. Los métodos anteriores utilizados para la medición directa de parámetros biológicos más significativos de los tumores, solo se pueden lograr mediante procedimientos invasivos de criterio de valoración (Lyons 2005). La mayoría de esos métodos implica un examen histopatológico o inmunohistoquímico, que son enfoques lentos, invasivos y no siempre sensibles (Yang et al. 2000). Por lo tanto, ha sido necesario introducir nuevos métodos que permitan una visualización directa de los tejidos tumorales, que no sean invasivos y permitan una medición de los parámetros relevantes de un tumor tanto a nivel celular como molecular.

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos no invasivos: MRI y espectroscopía, PET, tomografía computarizada por emisión de fotón único y tomografía computarizada (Lyons 2005).

Existen varios métodos de formación de imágenes basados en transgenes. Esos métodos permiten una medición no invasiva de una amplia gama de parámetros biológicos con especificidad tumoral excelente, formación de imágenes de todo el cuerpo en animales modelo vivos y detección de metástasis. Dos de estos métodos son: formación de imágenes con bioluminiscencia y formación de imágenes con fluorescencia.

La bioluminiscencia óptica se basa en tres componentes: la enzima luciferasa, el sustrato luciferina y el adenosintrifosfato (ATP). En ese método, no se requiere una excitación luminosa para generar una emisión de luz. Sin embargo, si uno de estos componentes está ausente, no es posible la detección. El método permite vigilar la viabilidad celular o la función celular con un rendimiento elevado, debido al valor señal/ruido óptimo (Lyons 2005). Las principales desventajas del método de luciferasa/luciferina son las bajas resoluciones anatómicas y de imagen, lo que requiere una cantidad considerable de tiempo para recoger los fotones suficientes para formar una imagen a partir de un animal anestesiado. Además, el aumento de la profundidad del tejido y la necesidad de un suministro exógeno del sustrato, atenúan la emisión de luz *in vivo* (Yang et al., 2000; Lyons, 2005). Adicionalmente, los experimentos *ex vivo* son difíciles de realizar ya que se requiere ATP para la actividad enzimática. Es importante destacar que el método implica una parametrización subjetiva que reduce su valor cuantitativo.

Otra forma de vigilar la progresión tumoral mediante la formación de imágenes ópticas con fluorescencia se basa en transfectar las células tumorales con una proteína fluorescente estable, tal como la proteína fluorescente verde (GFP) y la proteína fluorescente roja (RFP). En ese método existe una necesidad de excitación externa antes de que se pueda detectar la emisión. Las principales desventajas de ese método son que (1) las luces de excitación y emisión son propensas a atenuarse a medida que aumenta la profundidad del tejido y (2) la autofluorescencia de células no marcadas aumenta el ruido de fondo (Lyons, 2005). Las principales ventajas incluyen: múltiples longitudes de onda informadoras que permiten la formación de imágenes múltiples; alta compatibilidad con una gama de enfoques *ex vivo* para métodos analíticos tales como el análisis de tejidos recientemente extraídos; no hay necesidad de procedimientos preparativos para la obtención de imágenes, lo que es especialmente adecuado para visualizar un tejido vivo; el método es externo y no invasivo; el método proporciona una formación de imágenes ópticas con fluorescencia en tiempo real de tumores y metástasis con crecimiento interno en animales trasplantados que puede proporcionar una imagen de todo el cuerpo pero también la imagen de células individuales extraídas de la lesión primaria y las metástasis (Yang et al., 2000; Lyons, 2005). La formación de imágenes de todo el cuerpo es una de las herramientas más necesarias para comprender el desarrollo de un tumor. Por lo tanto, al marcar genéticamente las células tumorales con GFP o RFP, se puede lograr la formación de imágenes externas de todo el cuerpo, de tumores primarios y metastásicos (Yang et al. 2000).

Marcar con fluorescencia es adecuado para una detección *in vivo*, de tejido recientemente extraído e *in vitro*. El uso de células tumorales que expresan proteínas fluorescentes permite la obtención de imágenes de animales vivos y el seguimiento de la progresión tumoral en diferentes puntos de tiempo. La RFP tiene una emisión de longitud de onda más larga que la GFP, lo que permite una mayor sensibilidad y resolución del crecimiento de un tumor microscópico (longitud de onda de excitación de GFP - 489 nm, longitud de onda de emisión - 508 nm, longitud de onda de excitación de RFP - 558 nm, longitud de onda de emisión - 583 nm).

El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) comprende una proliferación clonal de las células que parecen malignas y se acumulan dentro del lumen de los conductos mamarios sin una evidencia de invasión en el estroma de la mama adyacente y más allá de la membrana basal epitelial. Existe una posibilidad significativa de transformación en las lesiones DCIS no invasivas en una enfermedad invasiva y potencialmente mortal si no se tratan en una etapa temprana. Después del uso generalizado de la mamografía, ha habido un fuerte aumento del número de pacientes diagnosticadas con DCIS en el estadio inicial y la modalidad de tratamiento recomendada ha cambiado de la mastectomía (con una tasa de curación cercana al 100%) hacia la cirugía de conservación de la mama (BCS), p. ej., lumpectomía o cirugía mamaria mínimamente invasiva (Kepple et al., 2004), opcionalmente acompañada de RT y terapias endocrinas adyuvantes. Sin embargo, se ha descubierto recientemente que las tasas de recurrencia después de BCS, tanto ipsilateralmente (mismo seno) como contralateralmente (otro seno), incluso cuando está acompañada de RT, son significativamente más altas que después de una mastectomía, particularmente para pacientes con una edad de ≤ 40 (tasa de regresión de 25-35%; Bijker N et al., 2006; Cutuli et al., 2002). Además, las lesiones multifocales presentan una dificultad para realizar una disección parcial y lo mismo es cierto para los márgenes implicados de manera persistente que se consideraron decisivos para completar la regresión tumoral (Cellini et al. al., 2005). Además, la carga física y psicológica y los posibles efectos estéticos de la lumpectomía seguida de RT, son significativos. Estos inconvenientes hacen que el tratamiento y el manejo del DCIS sean hoy

temas controvertidos en la terapia del cáncer de mama y han estimulado la búsqueda de nuevas modalidades y/o complementarias para el tratamiento y pronóstico.

5 El DCIS es una forma biológicamente heterogénea de malignidad con una presentación clínica, histología, características celulares y potencial biológico diversos. Se ha clasificado en carcinomas de tipo *comedo* (invasivo) y *no comedo* (no invasivos), en donde el tipo comedo tiene el mayor grado, con un subtipo potencialmente más invasivo, que contiene característicamente una gran área necrótica en el lumen ductal y células con marcada atipia citológica. Se espera que alrededor de dos tercios de los pacientes con DCIS de grado bajo a intermedio tengan una enfermedad multifocal ipsilateral con huecos que pueden alcanzar 1 cm entre los diferentes focos (Cutuli et al., 2002). Las lesiones de alto grado tienden a ser continuas con huecos menores de 5 mm (Cellini et al., 2005).

10 El desarrollo natural del DCIS no invasivo a un tumor mamario invasivo puede llevar de 15-20 años e implicar del 14 al 60 por ciento de las mujeres diagnosticadas (Burstein et al., 2004). De hecho, el DCIS parece representar un estadio del desarrollo del cáncer de mama en el cual muchos de los eventos moleculares que definen el cáncer de mama invasivo ya están presentes (Cutuli et al., 2002; Holland et al., 1990). Específicamente, ~30% de las lesiones de bajo grado se convertirán en un carcinoma invasivo si no se tratan (Sanders et al., 2005). Las lesiones con un diámetro superior a 2,5 cm suelen ir acompañadas de tumores microinvasivos ocultos que no pueden superar los 0,1 mm. La implicación de los márgenes tumorales proporciona un importante marcador del pronóstico. Cerca de la escisión (menos de 1 mm) o de los márgenes positivos, las áreas necróticas de alto grado y/o de tipo comedo están asociadas con un mayor riesgo de recurrencia.

20 Al igual que en muchos otros tipos de cáncer, la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en el cáncer de mama, desempeña un papel central tanto en la progresión local del tumor como en el desarrollo de metástasis distantes (Boehm-Viswanathan, 2000; Kieran et al., 2003). Se ha encontrado una densidad de microvasos (MVD) significativamente mayor en el tejido de un DCIS en comparación con el tejido normal circundante (Guidi et al., 1994; Guidi et al., 1997; Guinebretière et al., 1994). Las lesiones fibroquísticas con la densidad vascular más alta se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama (Guidi et al., 1994; Guidi et al., 1997; Guinebretière et al., 1994). Los exámenes histopatológicos de lesiones agresivas de DCIS se asociaron con un aumento de la MVD y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Guidi et al., 1997; Schneider et al., 2005). Las correlaciones clinicopatológicas también confirman el papel cardinal de la angiogénesis en la progresión del cáncer de mama, por lo que es un objetivo atractivo para la terapia y el pronóstico del DCIS (Folkman, 1997; Krippel et al., 2003; Relf et al., 1997). La cooptación de vasos, el crecimiento por intususcepción (Patan et al., 1996), la mimetización vascular y la vasculogénesis son procesos naturales que pueden disminuir la dependencia del tumor de la angiogénesis clásica. De particular importancia es el hallazgo de que el cáncer de mama inflamatorio depende casi por completo de la vasculogénesis, debido aparentemente a la incapacidad de las células cancerosas para unirse a las células endoteliales.

35 La dependencia decisiva del DCIS de un lecho vascular muy denso ha hecho que las terapias antiangiogénicas (que inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos) y antivascuales (oclusión/destrucción de vasos sanguíneos existentes) (Shimizu et al., 2005; Thorpe, 2004) sean opciones atractivas para la terapia de BC localizado (Schneider et al., 2005; Folkman, 1996). De hecho, los fármacos antiangiogénicos como el bevacizumab (un anticuerpo anti-receptor de VEGF-A) y SU011248 (un inhibidor de la tirosina del receptor de VEGF) se encuentran en ensayos clínicos de fase II. Curiosamente, también se encontró que el tamoxifeno posee actividad antiangiogénica. Sin embargo, un creciente cuerpo de evidencias indica deficiencias en el enfoque antiangiogénico. Estas incluyen la necesidad de un tratamiento crónico, el fracaso parcial de la "teoría de la resistencia a la resistencia" (Schneider et al., 2005; Streubel et al., 2004) y la resistencia farmacocinética. Después de estos obstáculos, el enfoque antivascular en la actualidad parece más prometedor, se espera que dé lugar a una erradicación de todo el tumor sin necesidad de un tratamiento crónico (Folkman, 2004). Una vía prometedora que ha surgido recientemente para el tratamiento dirigido a los vasos es la terapia fotodinámica (VTP).

50 Del mismo modo, metales paramagnéticos dirigidos a dianas con una relajación apropiada, entidades químicas que emiten positrones (p. ej., ⁶⁴Cu) o sondas fluorescentes para el lecho vascular denso de DCIS, deberían abrir nuevas vías para la detección de lesiones relacionadas, la definición de márgenes y el pronóstico tal y como se explica a continuación. La detección con fluorescencia de lesiones de cáncer de mama se mostró útil hasta a 10 mm de profundidad (Britton, 2006). La MRI dinámica con Gd como agente de contraste se basa en una mayor permeabilidad del sistema vascular tumoral y actualmente se usa para la localización tumoral en la mama (Rankin, 2000). Sin embargo, el uso actual de la MRI está limitado por el corto tiempo de integración disponible de los agentes de contraste que permanecen brevemente pero no son captados selectivamente por el tejido tumoral.

55 La terapia fotodinámica (PDT) genera una explosión de especies citotóxicas de oxígeno reactivo (ROS) en un sitio de tratamiento seleccionado. Debido a su corta vida útil, la toxicidad de ROS se limita al sitio iluminado. La PDT generalmente consiste en cinco etapas: 1. Administración intravenosa (IV) de un fotosensibilizador; 2. Un período de tiempo que permite que una concentración deseable de fotosensibilizadores llegue al tejido diana; 3. Iluminación del tejido diana por vía transcutánea o intersticial con luz láser de alta intensidad (hasta 1 W para la iluminación continua) a través de fibras ópticas delgadas (0,4 mm de diámetro o menos) para una iluminación profunda del tejido con la consiguiente generación local de ROS citotóxico; 4. Desarrollo de necrosis tumoral y erradicación tumoral; 5. Remodelación y cicatrización de los tejidos.

La PDT con objetivo vascular (VTP) tiene como finalidad la generación de ROS dentro de los vasos sanguíneos del tejido tratado, lo que se puede lograr mediante una iluminación del tejido inmediatamente después de la administración del sensibilizador o mediante el uso de sensibilizadores que no se extravasan de la circulación. Se han desarrollado en nuestro laboratorio varias generaciones de sensibilizadores de bacterioclorofila, denominados en este documento "derivados de Bchl" o "BchlD". Los compuestos sintetizados (Rosenbach-Belkin et al., 1996; documento US 5.650.292) poseen una absorción muy fuerte en el NIR (750-765 nm) que permite una penetración profunda de la luz en los tejidos del sujeto, asegurando un diámetro de tratamiento de hasta 4 cm alrededor de una fibra cilíndrica con tasas elevadas de fluencia (20 mW-1 W). Después de la iluminación, se genera una concentración local elevada de ROS (radicales OH· y O₂⁻) en el tumor y en las proximidades por el BchlD circulante, lo que da lugar a una coagulación de la sangre y la perforación de los vasos tumorales, seguidas de una parada completa del sistema vascular tumoral en cuestión de minutos después de la iluminación. Con algunos derivados de Bchl, se observó una intoxicación directa de las células endoteliales (Gross et al., 2003; Mazor et al., 2005). Por razones que actualmente están bajo investigación, la respuesta vascular del tumor es notablemente más rápida y más fuerte en comparación con la de los vasos en el tejido normal circundante. La eficacia del tratamiento produce tasas de curación elevadas (60-90% de supervivencia animal) (Mazor et al., 2005). Es importante destacar que los sensibilizadores inyectados por vía IV se aclaran rápidamente desde la circulación de los animales tratados (T_{1/2} es del orden de minutos a horas), (Mazor et al., 2005) evitando una toxicidad prolongada de la piel y permitiendo una repetición del tratamiento si es necesario. En los ensayos clínicos de fase II sobre cáncer de próstata localizado en pacientes en los que fallaba la radioterapia (Weersink et al., 2005), la VTP basada en BchlD generalmente ha dado como resultado una erradicación exitosa de las lesiones tumorales en el 50-60% de los pacientes tratados y una remodelación del tejido. Un segundo tratamiento tanto en modelos animales como en humanos (ensayos clínicos de fase II/III) parece dar como resultado tasas de curación similares o más altas por sesión (dependiendo del fármaco y la dosis de luz), aumentando la tasa de éxito general esperada a ~90% después de 2-3 sesiones. Es importante destacar que se encontraron tasas de curación notablemente más altas por sesión en los estudios con animales con dosis más elevadas del sensibilizador aplicado.

La terapia fotodinámica (PDT) en tumores implica la combinación de un fotosensibilizador administrado y un suministro de luz local, ambos agentes inocuos por sí mismos, pero que en presencia de oxígeno molecular son capaces de producir especies de oxígeno reactivo citotóxico (ROS) que puede eliminar las células. Al ser una modalidad de tratamiento binario, la PDT permite una mayor especificidad y tiene el potencial de ser más selectiva pero no menos destructiva, en comparación con la quimioterapia o radioterapia de uso común (Dougherty et al. 1998).

La aplicación de nuevos derivados de bacterioclorofila (Bchl) como sensibilizadores en la PDT ha sido descrita por los presentes inventores en los últimos años (Zilberstein et al., 2001; Schreiber et al., 2002; Gross et al., 1997; Zilberstein et al., 1997; Rosenbach-Belkin et al., 1996; Gross et al., 2003a; Koudinova et al., 2003; Preise et al., 2003; Gross et al., 2003b) y en los documentos de publicaciones de patentes US 5.726.169, US 5.650.292, US 5.955.585, US 6.147.195, US 6.740.637, US 6.333.319, US 6.569.846, US 7.045.117, DE 41 21 876, EP 1 246 826, WO 2004/045492, WO 2005/120573. Los espectros, la fotofísica y la fotoquímica de los derivados de Bchl los han convertido en moléculas óptimas de captación de luz con claras ventajas sobre otros sensibilizadores utilizados actualmente en la PDT. Estos derivados de Bchl son en su mayoría polares y permanecen en la circulación durante muy poco tiempo sin tener prácticamente una extravasación a otros tejidos (Brandis, 2003; Mazor et al. 2005). Por lo tanto, estos compuestos son buenos candidatos para una PDT dirigida al sistema vascular (VTP) que se basa en un encuentro intravascular temporal corto (5-10 min) con luz y una mayor susceptibilidad de los vasos tumorales frente al ROS citotóxico generado por la PDT.

Estudios recientes realizados por nuestro grupo han mostrado que la fotosensibilización primaria es intravascular con un rápido desarrollo de oclusiones isquémicas y estasis dentro del período de iluminación. Este proceso también favorece la peroxidación lipídica inducida fotoquímicamente (LPO) y la muerte celular endotelial temprana que se limita principalmente al sistema vascular tumoral (Koudinova et al. 2003). Debido a la ligera progresión independiente de las reacciones en cadena de radicales libres junto con el desarrollo de hipoxia, la LPO y la muerte celular se diseminan más allá del compartimento vascular para cubrir todo el intersticio del tumor hasta que se alcanza una necrosis completa del tumor alrededor de 24 horas después de la PDT. Por lo tanto, la acción primaria de la PDT bloquea el suministro de sangre e induce una hipoxia que inicia, de manera secundaria, una serie de eventos moleculares y fisiopatológicos que culminan con la erradicación del tumor. Es importante destacar que este enfoque se basa en las diferencias entre la respuesta de los vasos sanguíneos normales y los tumorales frente al ROS generado.

El documento de solicitud internacional nº WO 2008/023378 de los mismos solicitantes describe nuevos conjugados de derivados de porfirina, clorofila y bacterioclorofila (Bchl) con péptidos que contienen el motivo RGD o con peptidomiméticos de RGD, y su uso en métodos de terapia fotodinámica *in vivo* y diagnóstico de tumores y diferentes enfermedades vasculares, tales como la degeneración macular relacionada con la edad. En particular, el derivado de Bchl c(RGDfK)-Pd-MLT (Compuesto **24**) mostraba una acumulación de hasta 4-8 µM en xenoinjertos de tumores primarios y permanecía en el sitio del tumor durante un tiempo prolongado, permitiendo la acumulación de la señal y una buena relación entre señal y ruido.

Marcar con fluorescencia es adecuado para tejido recientemente extraído *in vivo* y la detección *in vitro*. c(RGDfK)-

Pd-MLT tiene una fluorescencia intrínseca en el infrarrojo cercano (NIR) que se puede detectar. c(RGDfK)-2H-MLT tiene una capacidad de brillo que es tres órdenes de magnitud más alta y, por lo tanto, podría ser un candidato aún mejor para la obtención de imágenes dirigidas. En este estudio mostramos que estas moléculas abren la posibilidad de detectar con precisión los márgenes tumorales y la necrosis en un modelo de adenocarcinoma de mama humano. La detección de los márgenes tumorales y la necrosis presentan hoy en día, dos de los problemas más desafiantes en el tratamiento de tumores. Además, ambos son elementos fieles para predecir un crecimiento de nuevo del tumor después de un tratamiento. Por lo tanto, en el futuro, cuando se apliquen clínicamente, se espera que los derivados de RGD mencionados anteriormente sean adecuados para la detección de tumores y de necrosis en la mesa de operaciones.

10 Compendio de la invención

Se ha encontrado ahora de acuerdo con la presente invención que los conjugados de RGD-(bacterio)clorofila descritos en el documento mencionado anteriormente WO 2008/023378 se dirigen y se acumulan en dominios tumorales necróticos mucho más tiempo que en dominios tumorales no necróticos.

La presente invención se refiere por tanto a dichos conjugados de RGD-bacterioclorofila y RGD-clorofila para uso en el diagnóstico de tumores que comprenden dominios necróticos.

La presente invención se refiere además a un método para visualizar un tumor con dominios necróticos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los plásmidos utilizados para la transfección de líneas celulares tumorales con proteína fluorescente roja (RFP). Fig. 1A: plásmido pDsRed2-N1 (Clontech, Palo Alto, CA). Fig. 1B: pDsRed-Monomer-Hyg-C1 (Clontech, Palo Alto, CA). Fig. 1C: pDsRed-Monomer-Hyg-C1 modificado.

Las Figs. 2A-2B muestran clones fluorescentes de las células transfectadas de la Fig. 1 detectadas por microscopía de fluorescencia (Nikon, X10 aumentos) después de 3 segundos de exposición. Fig. 2A: MDA-MB-231 RFP clon 1 (resistente a G418). Fig. 2B: MDA-MB-231 RFP clon 3 (resistente a la higromicina).

Las Figs. 3A-3B muestran imágenes de tumores extirpados y análisis histológicos (tinción con H&E) de secciones transversales de tumores MDA-MB-231-RFP. Fig. 3A: tumor grande (~1 cm³). Fig. 3B: tumor pequeño (~0,5 cm³) (ND - dominio necrótico, VD - dominio viable).

Las Figs. 4A-4B muestran una acumulación de compuesto 13 posterior en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor ~1 cm³). Los ratones fueron inyectados con compuesto 13. Se tomaron imágenes desde 15 min a 24 h después de la inyección del fármaco. Fig. 4A (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. 4B (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. 5A-5B muestran una acumulación de compuesto 13 en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor ~1 cm³). Los ratones fueron inyectados con compuesto 13. Se tomaron imágenes desde el día 1 al 7 después de la inyección del fármaco. Fig. 5A (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. 5B (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. 6A-6B muestran una acumulación de compuesto 13 en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor ~0,5 cm³). Los ratones fueron inyectados con compuesto 13. Se tomaron imágenes desde 20 min a 24 h después de la inyección del fármaco. Fig. 6A (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. 6B (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. 7A-7B muestran una acumulación de compuesto 13 en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor ~0,5 cm³). Los ratones fueron inyectados con compuesto 13. Se tomaron imágenes desde el día 1 al 3 después de la inyección del fármaco. Fig. 7A (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. 7B (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Fig. 8 es un gráfico que muestra una medición de la señal fluorescente del compuesto 13 en el tumor frente al lado colateral. La señal fluorescente en fotón/s/cm² se midió en 9 animales para el tumor y el lado colateral. Los resultados se recogieron desde 15 min a 216 h después de la inyección del compuesto 13. Se presenta el resultado promedio para todos los animales en cada punto de tiempo, así como la proporción de fluorescencia entre el tumor y el lado colateral.

Las Figs. 9A-9B muestran una acumulación de compuesto 24 en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor ~1 cm³). Los ratones fueron inyectados con compuesto 24. Se tomaron imágenes desde 1 hora a 24 horas después de la inyección del fármaco. Fig. 9A (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. 9B (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. 10A-10B muestran una acumulación de compuesto 24 en tumor un ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor ~1 cm³). Los ratones fueron inyectados con compuesto 24 y se tomaron imágenes desde el día 1 al 7

después de la inyección del fármaco. Fig. **10A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **10B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **11A-11B** muestran una acumulación de compuesto **24** en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor $\sim 0,5 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **24** y se tomaron imágenes desde 20 min a 24 h después de la inyección del fármaco. Fig. **11A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **11B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **12A-12B** muestran una acumulación de compuesto **24** en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor $\sim 0,5 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **24** y se tomaron imágenes desde el día 1 al 2 después de la inyección del fármaco. Fig. **12A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **12B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **13A-13B** muestran una acumulación de compuesto **13** en un tumor ortotópico MLS-mBanana (tamaño del tumor $\sim 1 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **13**. Se tomaron imágenes desde 1 hora a 24 horas después de la inyección del fármaco. Fig. **13A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **13B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **14A-14B** muestran una acumulación de compuesto **13** en un tumor ortotópico MLS-mBanana (tamaño del tumor $\sim 1 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **13**. Se tomaron imágenes desde el día 1 al 4 después de la inyección del fármaco. Fig. **14A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **14B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **15A-15B** muestran una acumulación de compuesto **13** en un tumor ortotópico MLS-mBanana (tamaño del tumor $\sim 0,5 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **13**. Se tomaron imágenes desde 10 minutos a 24 horas después de la inyección del fármaco. Fig. **15A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **15B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **16A-16B** muestran una acumulación de compuesto **13** en un tumor ortotópico MLS-mBanana (tamaño del tumor $\sim 0,5 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **13**. Se tomaron imágenes desde el día 1 al 4 después de la inyección del fármaco. Fig. **16A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **16B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **17A-17B** demuestran una comparación de la acumulación de compuesto **13** en tumores necróticos primarios MLS-mBanana ováricos humanos y no necróticos. Las imágenes fueron tomadas 2 días después de la inyección del compuesto **13**. Se tomaron imágenes de la fluorescencia NIR *in vivo* del cuerpo entero del compuesto **13**. Fig. **17A**: Tumores no necróticos ($\sim 0,5 \text{ cm}^3$). Fig. **17B**: Tumores necróticos ($\sim 1 \text{ cm}^3$).

Las Figs. **18A-18B** muestran una acumulación de compuesto **25** en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor $\sim 1 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **25** y se tomaron imágenes desde 5 minutos a 24 horas después de la inyección del fármaco. Fig. **18A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **18B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **19A-19B** muestran una acumulación de compuesto **25** en un tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor $\sim 1 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **25** y se tomaron imágenes desde el día 1 al 3 después de la inyección del fármaco. Fig. **19A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **19B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **20A-20B** muestran una acumulación de compuesto **25** en un tumor ortotópico no necrótico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor $\sim 0,5 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **25** y se tomaron imágenes desde 10 minutos a 24 horas después de la inyección del fármaco. Fig. **20A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **20B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **21A-21B** muestran una acumulación de compuesto **25** en un tumor ortotópico no necrótico MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor $\sim 0,5 \text{ cm}^3$). Los ratones fueron inyectados con compuesto **25** y se tomaron imágenes desde el día 1 al 3 después de la inyección del fármaco. Fig. **21A** (panel superior): formación de imágenes con fluorescencia roja. Fig. **21B** (panel inferior): formación de imágenes con fluorescencia NIR.

Las Figs. **22A-22D** muestran un ensayo de competencia de la acumulación de compuesto **13** en un tumor primario ortotópico de mama humana MDA-MB-231-RFP (tamaño del tumor $\sim 0,5 \text{ cm}^3$) cuando se administraba 1 h después de la administración de c(RGDfK) libre. Las imágenes fueron tomadas 24 horas después de la administración del compuesto **13**. Figs. **22A, 22B** - formación de imágenes con fluorescencia roja; Figs. **22C, 22D** - formación de imágenes con fluorescencia NIR. Figs. **22A, 22C**: el compuesto **13** se administró 1 h después de la administración de c(RGDfK) libre (competencia). Figs. **22B, 22D**: control, solo se administró el compuesto **13**.

Las Figs. **23A-23F** muestran una acumulación de compuesto **13** en las áreas viables frente a las necróticas del tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP, medida 10 minutos después de la inyección del fármaco. Las Figs. **23A, 23B** y **23C** (panel superior), son una fotografía *in vivo* de todo el cuerpo, una imagen de fluorescencia roja y una imagen de

fluorescencia NIR, respectivamente, del animal intacto; las Figs. **23D**, **23E** y **23F** (panel inferior), son una fotografía, una imagen de fluorescencia roja y una imagen de fluorescencia NIR, respectivamente, del tumor extirpado (el tumor se cortó por la mitad) (ND - dominio necrótico, VD - dominio viable).

5 Las Figs. **24A-24F** muestran una acumulación de compuesto **13** en las áreas viables frente a las necróticas del tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP, medida 1 hora después de la inyección del fármaco. Las Figs. **24A**, **24B**, **24C** (panel superior) y las Figs. **24D**, **24E**, **24F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

10 Las Figs. **25A-25F** muestran una acumulación de compuesto **13** en las áreas viables frente a las necróticas del tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP, medida 4 horas después de la inyección del fármaco. Las Figs. **25A**, **25B**, **25C** (panel superior) y las Figs. **25D**, **25E**, **25F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

15 Las Figs. **26A-26F** muestran una acumulación de compuesto **13** en las áreas viables frente a las necróticas del tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP, medida 24 horas después de la inyección del fármaco. Las Figs. **26A**, **26B**, **26C** (panel superior) y las Figs. **26D**, **26E**, **26F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

Las Figs. **27A-27F** muestran una acumulación de compuesto **13** en las áreas viables frente a las necróticas del tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP, medida 3 días después de la inyección del fármaco. Las Figs. **27A**, **27B**, **27C** (panel superior) y las Figs. **27D**, **27E**, **27F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

20 Las Figs. **28A-28F** muestran una acumulación de compuesto **13** en las áreas viables frente a las necróticas del tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP, medida 5 días después de la inyección del fármaco. Las Figs. **28A**, **28B**, **28C** (panel superior) y las Figs. **28D**, **28E**, **28F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

25 Las Figs. **29A-29F** muestran una acumulación de compuesto **13** en las áreas viables frente a las necróticas del tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP, medida 7 días después de la inyección del fármaco. Las Figs. **29A**, **29B**, **29C** (panel superior) y las Figs. **29D**, **29E**, **29F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

30 Las Figs. **30A-30F** muestran una acumulación de compuesto **24** en las áreas viables frente a las necróticas del tumor ortotópico MDA-MB-231-RFP, medida 9 días después de la inyección del fármaco. Las Figs. **30A**, **30B**, **30C** (panel superior) y las Figs. **30D**, **30E**, **30F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

35 Las Figs. **31A-31F** muestran una acumulación de compuesto **13** en una necrosis central del tumor MLS-mBanana, medida 7 días después de la inyección. Las Figs. **31A**, **31B**, **31C** (panel superior) y las Figs. **31D**, **31E**, **31F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

Las Figs. **32A-32F** muestran una acumulación de compuesto **13** en una necrosis no central del tumor MLS-mBanana, medida 7 días después de la inyección del fármaco. Las Figs. **32A**, **32B**, **32C** (panel superior) y las Figs. **32D**, **32E**, **32F** (panel inferior) son como se han descrito anteriormente para las Figs. **23A**, **23B**, **23C** y las Figs. **23D**, **23E**, **23F**, respectivamente.

40 Las Figs. **33A-33D** muestran una imagen del tumor extirpado y un análisis histológico (tinción con H&E) de una sección transversal del tumor MDA-MB-231-RFP. Fig. **33A**: una fotografía de la superficie de una sección transversal del tumor (aspecto macroscópico). Fig. **33B**: presentación histológica de la superficie de una sección transversal (aspecto microscópico). Fig. **33C**: vista de potencia media del área encuadrada en la Fig. **33B**. Fig. **33D**: vista de alta potencia de una región en la interfaz entre el tejido necrótico y el viable.

45 Las Figs. **34A-34B** muestran un ejemplo representativo de la respuesta local de MDA-MB-231-RFP humano a PDT. A un ratón con un xenoinjerto de MDA-MB-231-RFP (~0,5 cm³) en el lomo se le inyectaron i.v. 7,5 mg/kg de compuesto **13** y se iluminó 8 h más tarde a través de la piel. Fig. **34A**: fotografías tomadas desde el día 0 (antes del tratamiento) y después del tratamiento a los 1, 4, 7, 12 y 90 días. Fig. **34B**: formación de imágenes con fluorescencia roja *in vivo* del cuerpo entero.

50 Descripción detallada de la invención

Es un objeto principal de la presente invención proporcionar conjugados de fotosensibilizadores que dirigen especialmente el sensibilizador a dominios necróticos de tumores necróticos. Existen algunas ventajas de la terapia fotodinámica dirigida a tumores (PDT) sobre el direccionamiento hacia una diana tumoral con quimioterapia convencional. En primer lugar, durante la acumulación de un fármaco convencional dirigido, este está activo frecuentemente, a menos que sea un profármaco, mientras que el fotosensibilizador dirigido no está activo hasta que

se ilumina localmente. En segundo lugar, un fármaco convencional dirigido se unirá y actuará también sobre dianas no deseables que presentan la dirección a la que se dirige, mientras que el fotosensibilizador dirigido se activará solo en el sitio iluminado correspondiente.

5 Por tanto, en un aspecto amplio, la presente invención se refiere a un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y a un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila para uso en el diagnóstico de tumores que comprenden dominios necróticos.

10 Las expresiones "péptido que contiene RGD" o "péptido RGD" se usan en esta memoria de manera intercambiable y significan un péptido que contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), también denominada motivo RGD. La expresión "peptidomimético de RGD" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a compuestos, particularmente compuestos no peptídicos, que imitan a péptidos y tienen el motivo RGD.

Se sabe que los péptidos RGD interaccionan con los receptores de integrina de las células y tienen el potencial para iniciar procesos de señalización celular e influir en muchas enfermedades. Por esas razones, el sitio de unión de RGD a la integrina se ha considerado una diana farmacéutica atractiva.

15 El péptido que contiene RGD puede ser un péptido lineal o cíclico todo L, todo D o L,D, compuesto por 4-100, preferiblemente 5-50, 5-30, 5-20, más preferiblemente, 5-10 aminoácidos naturales, naturales modificados o no naturales, en donde los aminoácidos naturales se seleccionan a partir de Ala, Arg, Asp, Asn, Cys, His, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val, en donde la modificación de dichos aminoácidos naturales o no naturales modificados incluye una modificación D, una acilación o una alquilación del grupo amino terminal, o del grupo amino libre de lisina, una esterificación o una amidación del grupo carboxilo terminal o del grupo carboxilo libre de ácido aspártico o glutámico, y la esterificación o eterificación del grupo hidroxilo libre de serina o tirosina.

20 En realizaciones preferidas, el péptido RGD está compuesto por 4, 5, 6, 7, 9 o 25 residuos de aminoácidos, lo más preferiblemente 5.

25 Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen ácido 4-aminobutírico (Abu), ácido 2-aminoadípico, ácido diaminopropiónico (Dap), hidroxilisina, homoserina, homovalina, homoleucina, norleucina (Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), TIC, naftilalanina (Nal), derivados de Phe metilados en el anillo, derivados de Phe halogenados u O-metil-Tyr.

30 Las modificaciones D de los aminoácidos y la N-alkilación del enlace peptídico son muy beneficiosas para evitar una escisión del péptido a través de enzimas en el organismo. En la presente invención, un D-aminoácido se indica con una letra minúscula como para el residuo 'f' de D-fenilalanina en el péptido cicloRGDfK de la SEQ ID NO: 1, tal y como se emplea en esta memoria.

35 La presente invención incluye también péptidos cíclicos. Los péptidos pueden ciclarse mediante una variedad de métodos, tales como la formación de disulfuros, sulfuros y, especialmente, de lactama entre las funciones carboxilo y amino de los extremos N y C o las cadenas laterales de aminoácidos. La ciclación se puede obtener por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, a través de la formación de enlaces amida, por ejemplo, incorporando Glu, Asp, Lys, Orn, ácido diamino butírico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dap) en varias posiciones en la cadena (enlaces -CO-NH o -NH-CO). La ciclación de estructura principal a estructura principal también se puede obtener mediante la incorporación de aminoácidos modificados de las fórmulas $H-N((CH_2)_n-COOH)-C(R)H-COOH$ o $H-N((CH_2)_n-NH_2)-C(R)H-COOH$, en donde $n = 1-4$, y además en donde R es cualquier cadena lateral natural o no natural de un aminoácido.

40 La ciclación también se puede obtener mediante la formación de enlaces S-S por la incorporación de dos residuos Cys. Se puede obtener una ciclación adicional de cadena lateral a cadena lateral mediante la formación de un enlace de interacción de fórmula $-(CH_2)_n-S-CH_2-CO-$, en donde $n = 1$ o 2 , lo que es posible, por ejemplo, mediante la incorporación de Cys u homoCys y la reacción de su grupo SH libre, por ejemplo, con Lys, Orn, Dab o Dap bromoacetilados.

45 En algunas realizaciones, los péptidos RGD pueden ser los descritos en los documentos US 6.576.239, EP 0927045 y WO 2008/023378.

En una realización preferida, el péptido usado de acuerdo con la invención es el pentapéptido cíclico RGDfK de SEQ ID NO: 1, en donde 'f' indica un residuo D-Phe.

50 En otra realización preferida, el péptido es el pentapéptido cíclico RADfK de SEQ ID NO: 2 utilizado en esta memoria para facilitar la importancia del motivo RGD en la unión a los receptores de integrina. Otro ciclopéptido útil de acuerdo con la invención es el nonapéptido CDCRGDCGC de SEQ ID NO: 9, denominado en esta memoria 'RGD-4C', el cual contiene cuatro residuos de cisteína que forman dos enlaces disulfuro en la molécula.

55 El residuo de ácido aspártico del motivo RGD es altamente susceptible a una degradación química, lo que conduce a la pérdida de actividad biológica, y esta degradación se podría evitar mediante la ciclación a través de un enlace disulfuro. Junto con la mejora de la estabilidad, los péptidos cíclicos muestran una mayor potencia en comparación

con los péptidos lineales para inhibir la fijación de la vitronectina a las células. La cantidad y la naturaleza de los residuos que flanquean la secuencia RGD en los péptidos sintéticos tienen una influencia significativa en cómo esa secuencia es reconocida por los receptores de integrina individuales. Un residuo aromático puede ser particularmente importante para establecer contactos favorables en el sitio de unión de la integrina. Los péptidos RGD cíclicos dirigidos a $\alpha_v\beta_3$ se internalizan mediante una vía de endocitosis en fase fluida independiente de la integrina que no altera el número de receptores de integrina funcionales en la superficie celular. Además, los péptidos RGD cíclicos permanecen o se degradan en el lisosoma, en un proceso que alcanza la saturación después de 15 minutos, y solo una pequeña porción puede salir del lisosoma y llegar al citoplasma celular.

En otras realizaciones preferidas, el péptido RGD se selecciona a partir de los péptidos cíclicos: (i) tetrapéptido cicloRGDK (SEQ ID NO: 3), pentapéptido cicloRGDf-n(Me)K (SEQ ID NO: 4), en donde f indica D-Phe y el enlace peptídico entre f y K está metilado; y pentapéptido cicloRGDyK (SEQ ID NO: 5), en donde y indica D-Tyr.

En otra realización, el péptido que contiene RGD es lineal y se puede seleccionar a partir del hexapéptido GRGDSP (SEQ ID NO: 6), el heptapéptido GRGDSPK (SEQ ID NO: 7) y el péptido de 25 unidades (GRGDSP)₄K (SEQ ID NO: 8). En una realización más preferida, el péptido lineal es GRGDSP.

En una realización de la invención, el péptido RGD está unido directamente al macrociclo de un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila, a través de un grupo funcional en su periferia, por ejemplo, COOH, formando un grupo amida CO-NH₂ con el grupo amino terminal o un grupo amino libre del péptido RGD.

En otra realización, el péptido RGD está unido al macrociclo del fotosensibilizador a través de un brazo espaciador/grupo puente tal como, pero no limitado a, un hidrocarbilo C₁-C₂₅, preferiblemente un alqueno C₁-C₁₀ o fenileno, sustituido por un grupo funcional terminal tal como OH, COOH, SO₃H, COSH o NH₂, formando de este modo un grupo éter, éster, amida, tioamida o sulfonamida.

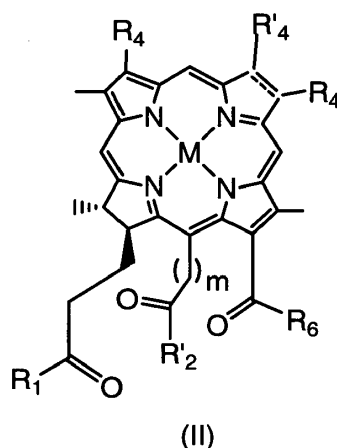
En algunas realizaciones, el fotosensibilizador se conjuga con un peptidomimético de RGD.

En una realización preferida, el peptidomimético de RGD es un compuesto no peptídico que comprende una guanidina y un grupo carboxilo terminal espaciado por una cadena de 11 átomos, en donde al menos 5 de dichos átomos son átomos de carbono, y dicha cadena comprende uno o varios átomos de O, S o N y opcionalmente pueden estar sustituidos por oxo, tioxo, halógeno, amino, alquilo C₁-C₆, hidroxilo o carboxilo, o uno o varios átomos de dicha cadena pueden formar un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3-6 miembros. Los compuestos de este tipo se describen en los documentos WO 93/09795 y WO 2008/023378 del mismo solicitante.

En realizaciones preferidas, el peptidomimético de RGD anterior comprende en la cadena átomos de N y está sustituido por un grupo oxo. En una realización más preferida, el peptidomimético de RGD tiene la fórmula:



La presente invención se refiere a un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila, en donde dicho conjugado es una clorofila o bacterioclorofila de fórmula II:



en donde

M representa 2H o un átomo seleccionado a partir del grupo que consiste en Mg, Pd, Pt, Co, Ni, Sn, Cu, Zn, Mn, In, Eu, Fe, Au, Al, Gd, Dy, Er, Yb, Lu, Ga, Y, Rh, Ru, Si, Ge, Cr, Mo, P, Re, Tl y Tc e isótopos y radioisótopos de los mismos;

R₁, R'₂ y R₆ son cada uno independientemente Y-R₈, -NR₉R'₉ o -N⁺R₉R'₉R''₉A⁻

o R₁ y R₆ juntos forman un anillo que comprende un residuo de péptido RGD o de peptidomimético de RGD;

Y es O o S;

5 R₄ es -CH=CR₉R'₉, -CH=CR₉Hal, -CH=CH-CH₂-NR₉R'₉, -CH=CH-CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉ A⁻, -CHO, -CH=NR₉, -CH=N⁺R₉R'₉ A⁻, -CH₂-OR₉, -CH₂-SR₉, -CH₂-Hal, -CH₂-R₉, -CH₂-NR₉R'₉, -CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉ A⁻, -CH₂-CH₂R₉, -CH₂-CH₂Hal, -CH₂-CH₂OR₉, -CH₂-CH₂SR₉, -CH₂-CH₂-NR₉R'₉, -CH₂-CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉ A⁻, -COCH₃, C(CH₃)=CR₉R'₉, -C(CH₃)=CR₉Hal, -C(CH₃)=NR₉, -CH(CH₃)=N⁺R₉R'₉A⁻, -CH(CH₃)-Hal, -CH(CH₃)-OR₉, -CH(CH₃)-SR₉, -CH(CH₃)-NR₉R'₉, -CH(CH₃)-N⁺R₉R'₉R''₉ A⁻ o -C≡CR₉;

R'₄ es metilo o formilo;

R₈, R₉, R'₉ y R''₉ cada uno es independientemente:

10 (a) H;

(b) hidrocarbilo C₁-C₂₅;

15 (c) hidrocarbilo C₁-C₂₅ sustituido por uno o varios grupos funcionales seleccionados a partir del grupo que consiste en halógeno, nitro, oxo, OR, SR, epoxi, epítio, -CONRR', -COR, COOR, -OSO₃R, -SO₃R, -SO₂R, -NHSO₂R, -SO₂NRR', -NRR', =N-OR, =N-NRR', -C(=NR)-NRR', -NR-NRR', -(R)N-C(=NR)-NRR', O←NR-, >C=NR, -(CH₂)_n-NR-COR', -(CH₂)_n-CO-NRR', -O-(CH₂)_n-OR, -O-(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-R, -PRR', -OPO₃RR', -PO₂HR y -PO₃RR', en donde R y R' son cada uno independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo y R'' es hidrocarbilo o heterociclilo, R' puede ser además un residuo de un péptido RGD o de un peptidomimético de RGD, o R y R' junto con el átomo de N al que están fijados forman un anillo saturado de 5-7 miembros que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado a partir de O, S y N, en donde el átomo de N adicional puede estar sustituido, y R'' es H, un catión, hidrocarbilo o heterociclilo;

20 (d) hidrocarbilo C₁-C₂₅ sustituido por uno o varios grupos funcionales seleccionados a partir del grupo que consiste en grupos cargados positivamente, grupos cargados negativamente, grupos básicos que se convierten en grupos cargados positivamente en condiciones fisiológicas y grupos ácidos que se convierten en grupos cargados negativamente en condiciones fisiológicas;

25 (e) hidrocarbilo C₁-C₂₅ que contiene uno o varios heteroátomos y/o uno o varios restos carbocíclicos o heterocíclicos;

(f) hidrocarbilo C₁-C₂₅ que contiene uno o varios heteroátomos y/o uno o varios restos carbocíclicos o heterocíclicos y está sustituido por uno o varios grupos funcionales tal y como se definen en (c) y (d) anteriormente;

30 (g) hidrocarbilo C₁-C₂₅ sustituido por un residuo de un aminoácido, un péptido RGD, una proteína, un monosacárido, un oligosacárido, un polisacárido o un ligando polidentado y su complejo quelante con metales;

35 (h) un residuo de un aminoácido, un péptido, preferiblemente un péptido RGD o un peptidomimético de RGD, una proteína, un monosacárido, un oligosacárido, un polisacárido o un ligando polidentado y su complejo quelante con metales;

R₈ puede ser además H⁺ o un catión R⁺₁₀ cuando R₁, R'₂ y R₆ cada uno es independientemente Y-R₈;

R⁺₁₀ es un metal, un grupo amonio o un catión orgánico;

A⁻ es un anión fisiológicamente aceptable;

m es 0 o 1;

40 la línea punteada en las posiciones 7-8 representa un doble enlace opcional; y

sales farmacéuticamente aceptables e isómeros ópticos de los mismos;

y dicho derivado de clorofila o bacterioclorofila de fórmula II contiene al menos un residuo de péptido que contiene RGD.

45 Tal y como se emplea en esta memoria, el término "hidrocarbilo" se refiere a cualquier radical hidrocarbilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, acíclico o cíclico, incluyendo radicales aromáticos, de 1-25 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 6, lo más preferiblemente de 2-3 átomos de carbono. El hidrocarbilo puede ser un radical alquilo, preferiblemente de 1-4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo o alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo tal como fenilo o un grupo aralquilo tal como bencilo, o en la posición 17 de los compuestos de fórmula II es un radical obtenido a partir de compuestos naturales de Chl y Bchl, p. ej., geranilgeranilo (2,6-dimetil-2,6-octadienilo) o fitilo (2,6,10,14-tetrametil-hexadec-14-en-16-ilo).

50

Tal y como se emplea en esta memoria, la expresión "resto carbocíclico" se refiere a un compuesto monocíclico o policíclico que contiene solo átomos de carbono en el (los) anillo(s). El resto carbocíclico puede estar saturado, es decir, cicloalquilo, o insaturado, es decir, cicloalqueno, o ser aromático, es decir, arilo.

5 El término "alcoxi" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a un grupo alquil(C₁-C₂₅)-O-, en donde el alquilo C₁-C₂₅ es como se ha definido anteriormente. Ejemplos de alcoxi son metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, terc-butoxi, pentoxi, hexoxi, -OC₁₅H₃₁, -OC₁₆H₃₃, -OC₁₇H₃₅, -OC₁₈H₃₇, y similares. El término "ariloxi" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a un grupo aril(C₆-C₁₈)-O-, en donde el arilo C₆-C₁₈ es como se ha definido anteriormente, por ejemplo, fenoxi y naftoxi.

10 Los términos y expresiones "heteroarilo" o "resto heterocíclico" o "heteroaromático" o "heterociclilo", tal y como se emplean en esta memoria, significan un radical obtenido a partir de un anillo heteroaromático monocíclico o policíclico que contiene de uno a tres heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en O, S y N. Ejemplos particulares son pirrolilo, furilo, tienilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, quinolinilo, pirimidinilo, 1,3,4-triazinilo, 1,2,3-triazinilo, 1,3,5-triazinilo., benzofurilo, isobenzofurilo, indolilo, imidazo[1,2-a]piridilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo y benzoxazolilo.

15 Cualquier "carbociclo", "arilo" o "heteroarilo" puede estar sustituido por uno o varios radicales tales como halógeno, arilo C₆-C₁₄, alquilo C₁-C₂₅, nitro, OR, SR, -COR, -COOR, -SO₃R, -SO₂R, -NH₂SO₂R, -NRR', -(CH₂)_n-NR-COR' y -(CH₂)_n-CO-NRR'. Debe entenderse que cuando se sustituye un anillo heteroaromático policíclico, las sustituciones pueden estar en cualquiera de los anillos carbocíclicos y/o heterocíclicos.

El término "halógeno", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

20 En una realización de la invención, el fotosensibilizador del conjugado es una clorofila o una bacterioclorofila de fórmula II que contiene al menos un grupo cargado negativamente y/o al menos un grupo ácido que se convierte en un grupo cargado negativamente a pH fisiológico.

25 Tal y como se define en esta memoria, "un grupo cargado negativamente" es un anión obtenido a partir de un ácido e incluye carboxilato (COO⁻), tiocarboxilato (COS⁻), sulfonato (SO₃⁻) y fosfonato (PO₃²⁻), y el "grupo ácido que se convierte en un grupo cargado negativamente en condiciones fisiológicas" incluye los grupos de ácido carboxílico (-COOH), tiocarboxílico (-COSH), sulfónico (-SO₃H) y fosfónico (-PO₃H₂). Los derivados de BChl con grupos cargados negativamente o grupos convertidos a los mismos en condiciones fisiológicas se han descrito en el documento WO 2004/045492 del mismo solicitante.

30 En una realización más preferida, el fotosensibilizador en el conjugado de la invención es clorofila o bacterioclorofila de fórmula II, en donde R₆ es -NR₉R'₉, R₉ es H y R'₉ es alquilo C₁-C₁₀ sustituido por SO₃H o una sal alcalina del mismo. Lo más preferiblemente, el conjugado comprende un derivado de bacterioclorofila de fórmula II, en donde R₆ es -NH-(CH₂)₂-SO₃K o -NH-(CH₂)₃-SO₃K.

35 En otra realización de la invención, el fotosensibilizador del conjugado es una clorofila o una bacterioclorofila de fórmula II que contiene al menos un grupo cargado positivamente y/o al menos un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente a pH fisiológico.

40 Tal y como se define en esta memoria, "un grupo cargado positivamente" indica un catión obtenido a partir de un grupo que contiene N o de un grupo onio que no contiene N. Dado que el endotelio tumoral se caracteriza por un mayor número de sitios aniónicos, los grupos cargados positivamente o los grupos básicos que se han convertido a grupos cargados positivamente en condiciones fisiológicas, pueden mejorar la eficacia del direccionamiento de los conjugados de la presente invención.

45 Un "catión obtenido a partir de un grupo que contiene N" tal y como se emplea en esta memoria, indica, por ejemplo, pero no se limita a, un grupo amonio -N⁺(RR'R"), hidrazinio -(R)N-N⁺(R'R"), amonio-oxi O←N⁺(RR')-, iminio >C=N⁺(RR'), amidinio -C(=RN)-N⁺R'R" o guanidinio -(R)N-C(=NR)-N⁺R'R", en donde R, R' y R" son cada uno independientemente H, hidrocarbilo, preferiblemente alquilo C₁-C₆ tal y como se define en esta memoria, fenilo o bencilo, o heterociclilo, o en el grupo amonio uno de R, R' y R" puede ser OH, o dos de R, R' y R" en el grupo amonio o R y R' en los grupos hidrazinio, amonio-oxi, iminio, amidinio o guanidinio, junto con el átomo de N al que están fijados, forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que opcionalmente contiene uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en O, S o N y opcionalmente está sustituido adicionalmente en el átomo de N adicional, o dicho catión se obtiene a partir de un compuesto que contiene uno o varios átomos de N en un anillo heteroaromático.

50 En una realización más preferida, el conjugado de la presente invención contiene un grupo amonio de fórmula -N⁺(RR'R"), en donde cada uno de R, R' y R" es independientemente H o hidrocarbilo o heterociclilo opcionalmente sustituidos, tal y como se define en esta memoria, o uno de ellos puede ser OH. El grupo amonio -N⁺(RR'R") puede ser un amonio secundario, en el que cualquiera de los radicales R, R' o R" es H; un amonio terciario, en el que solo uno de R, R' o R" es H; o un amonio cuaternario, en el que cada uno de R, R' o R" es un grupo hidrocarbilo o heterociclilo opcionalmente sustituido como se define en esta memoria. Cuando uno de R, R' o R" es OH, el grupo es un grupo hidroxilamonio. Preferiblemente, el grupo amonio es un grupo amonio cuaternario en el que R, R' y R"

cada uno es alquilo C₁-C₆ tal como metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo. El grupo amonio puede ser un grupo terminal en la molécula o puede encontrarse dentro de una cadena de alquilo en la molécula.

5 En el hidrazinio -(R)N-N⁺(R'R''), amidinio -C(=NR)-N⁺R'R'' y guanidinio -(R)N-C(=NR)-N⁺R'R'', los grupos R, R' y R'' pueden ser cada uno independientemente H o hidrocarbilo o heterociclilo, o R' y R'' junto con el átomo de N al que están fijados forman un anillo saturado de 3-7 miembros, como se define en esta memoria. Los ejemplos de tales grupos incluyen aquellos en los que R es H y R' y R'' cada uno es alquilo C₁-C₆ tal como metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo.

10 En los grupos amonio-oxi O←N⁺(RR')- e iminio >C=N⁺(RR'), R y R' pueden ser cada uno independientemente H o hidrocarbilo, preferiblemente alquilo C₁-C₆, o heterociclilo, o R y R' junto con el átomo de N al que están fijados forman un anillo saturado de 3-7 miembros, como se define en esta memoria.

En otra realización preferida, el derivado de clorofila o bacterioclorofila contiene un grupo amonio cíclico de fórmula -N⁺(RR'R''), en el que dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N forman un anillo saturado de 3-7 miembros definido a continuación.

15 Tal y como se define en esta memoria, "un anillo saturado de 3-7 miembros" formado por dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N al que están fijados, puede ser un anillo que contiene solo N, tal como aziridina, pirrolidina, piperidina, piperazina o azepina, o puede contener un heteroátomo adicional seleccionado a partir de O y S tal como morfolina o tiomorfolina. El átomo de N adicional en el anillo de piperazina puede estar opcionalmente sustituido con alquilo, por ejemplo alquilo C₁-C₆, que puede estar sustituido con halo, OH o amino. Los grupos onio obtenidos a partir de dichos anillos saturados incluyen aziridinio, pirrolidinio, piperidinio, piperazinio, morfolinio, tiomorfolinio y azepinio.

20 Tal y como se define en esta memoria, "un catión obtenido a partir de un radical heteroaromático que contiene N" indica un catión obtenido a partir de un compuesto N-heteroaromático que puede ser un compuesto monocíclico o policíclico que opcionalmente contiene átomos de O, S o N adicionales. El anillo a partir del cual se obtiene el catión debe contener al menos un átomo de N y ser aromático, pero el o los otros anillos, si los hay, pueden estar parcialmente saturados. Los ejemplos de cationes N-heteroaromáticos incluyen pirazolio, imidazolio, oxazolio, tiazolilo, piridinio, pirimidinio, quinolinio, isoquinolinio, 1,2,4-triazinio, 1,3,5-triazinio y purinio.

25 El grupo cargado positivamente también puede ser un grupo onio que no contiene nitrógeno tal como fosfonio [-P⁺(RR'R'')], arsonio [-As⁺(RR'R'')], oxonio [-O⁺(RR')], sulfonio [-S⁺(RR')], selenonio [-Se⁺(RR')], teluronio [-Te⁺(RR')], estibonio [-Sb⁺(RR'R'')] o bismutonio [-Bi⁺(RR'R'')], en donde cada uno de R, R' y R'' independientemente, es H, hidrocarbilo o heterociclilo, preferiblemente alquilo C₁-C₆ tal como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o hexilo, o arilo, preferiblemente, fenilo.

30 Ejemplos de grupos fosfonio de fórmula -P⁺(RR'R'') incluyen grupos en los que R, R' y R'' son cada uno metilo, etilo, propilo, butilo o fenilo, o R es metilo, etilo, propilo, butilo o hexilo y R' y R'' son ambos fenilo. Ejemplos de grupos arsonio de fórmula -As⁺(RR'R'') incluyen grupos en los que R, R' y R'' son cada uno metilo, etilo, propilo, butilo o fenilo. Ejemplos de grupos sulfonio de fórmula -S⁺(RR') incluyen grupos en los que R y R' son cada uno metilo, etilo, propilo, butilo, fenilo, bencilo, fenetilo o un grupo hidrocarbilo sustituido.

35 Tal y como se define en esta memoria, "un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas" es, al menos teóricamente, cualquier grupo básico que generará en condiciones fisiológicas un grupo cargado positivamente tal y como se define en esta memoria. Debe observarse que las condiciones fisiológicas, tal y como se usan en esta memoria, no se refieren únicamente al suero, sino a diferentes tejidos y compartimentos celulares en el organismo.

40 Ejemplos de tales grupos básicos que contienen N incluyen, sin limitación, cualquier grupo amino que generará un grupo amonio, cualquier grupo imina que generará un grupo iminio, cualquier grupo hidrazina que generará un grupo hidrazinio, cualquier grupo aminoxi que generará un grupo amonio-oxi, cualquier grupo amidina que generará un grupo amidinio, cualquier grupo guanidina que generará un grupo guanidinio, todos como se han definido en esta memoria. Otros ejemplos incluyen grupos fosfino y mercapto.

45 Por lo tanto, los conjugados de la presente invención pueden contener al menos un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas tales como -NRR', -C(=NR)-NR'R'', -NR-NR'R'', -(R)N-C(=NR)-NR'R'', O←NR- o >C=NR, en donde cada uno de R, R' y R'' independientemente es H, hidrocarbilo, preferiblemente alquilo C₁-C₂₅, más preferiblemente alquilo C₁-C₁₀ o C₁-C₆, o heterociclilo, o dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que opcionalmente contiene un átomo de O, S o N y está opcionalmente sustituido adicionalmente en el átomo de N adicional, o el grupo básico es un radical heteroaromático que contiene N.

55 El anillo saturado de 3-7 miembros puede ser aziridina, pirrolidina, piperidina, morfolina, tiomorfolina, azepina o piperazina opcionalmente sustituidas en el átomo de N adicional por alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido por halo, hidroxilo o amino, y el radical heteroaromático que contiene N puede ser pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirimidilo, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo o purinilo.

Los derivados de BChl con grupos cargados positivamente o grupos convertidos a los mismos en condiciones fisiológicas se han descrito en el documento WO 2005/120573 del mismo solicitante.

5 En una realización, el fotosensibilizador es una clorofila o bacterioclorofila de fórmula II y R_6 es un grupo básico $-NR_9R'_9$ en donde R_9 es H y R'_9 es alquilo C_{1-6} sustituido por un grupo básico $-NRR'$ o $-NH-(CH_2)_{2-6}-NRR'$ en donde cada uno de R y R' independientemente es H, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con NH_2 o R y R' junto con el átomo de N forman un anillo saturado de 5-6 miembros, que opcionalmente contiene un átomo de O o N y está opcionalmente sustituido adicionalmente en el átomo de N adicional por $-(CH_2)_{2-6}-NH_2$.

En otra realización, el fotosensibilizador es una bacterioclorofila de fórmula II y R_6 es $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH_2$, $-NH-(CH_2)_2-1$ -morfolino o $-NH-(CH_2)_3$ -piperazino- $(CH_2)_3-NH_2$.

10 En una realización adicional, R_1 y R_6 juntos forman un anillo cíclico que comprende un péptido RGD o un peptidomimético de RGD.

En otra realización, R_8 , R_9 o R'_9 cada uno es un alquilo C_{1-6} sustituido con uno o varios grupos $-OH$. Por ejemplo, el fotosensibilizador es una clorofila o una bacterioclorofila de fórmula II y R_6 es $-NR_9R'_9$, R_9 es H y R'_9 es $HOCH_2-CH(OH)-CH_2-$.

15 En otra realización, el fotosensibilizador es una clorofila o una bacterioclorofila de fórmula II y R_6 es $-NR_9R'_9$, R_9 es H y R'_9 es alquilo C_{1-6} sustituido por un ligando polidentado o sus complejos quelantes con metales. Los ejemplos de ligandos polidentados incluyen EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) o el ligando macrocíclico DOTA. En una realización preferida, el ligando polidentado es DTPA, R_6 es $-NH-(CH_2)_3-NH-DTPA$, y el metal es Gd.

20 El catión R_8^+ puede ser un catión monovalente o divalente obtenido a partir de un metal alcalino o alcalinotérreo tal como K^+ , Na^+ , Li^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , más preferiblemente K^+ ; o R_8^+ es un catión orgánico obtenido a partir de una amina o de un grupo que contiene N.

25 Tal y como se define en esta memoria, el hidrocarbilo C_{1-25} definido para R_8 , R_9 y R'_9 puede estar sustituido opcionalmente por uno o varios grupos funcionales seleccionados a partir de halógeno, nitro, oxo, OR, SR, epoxi, epitio, aziridina, $-CONRR'$, $-COR$, $COOR$, $-OSO_3R$, $-SO_3R$, $-SO_2R$, $-NHSO_2R$, $-SO_2NRR'$, $-NRR'$, $=N-OR$, $=N-NRR'$, $-C(=NR)-NRR'$, $-NR-NRR'$, $-(R)N-C(=NR)-NRR'$, $O\leftarrow NR-$, $>C=NR$, $-(CH_2)_n-NR-COR'$, $-(CH_2)_n-CO-NRR'$, $-O-(CH_2)_n-OR$, $-O-(CH_2)_n-O-(CH_2)_n-R$, $-PRR'$, $-OPO_3RR'$, $-PO_2HR$, $-PO_3RR'$; uno o varios grupos cargados negativamente tales como COO^- , COS^- , $-OSO_3^-$, $-SO_3^-$, $-OPO_3R^-$, $-PO_2H^-$, $-PO_3^{2-}$ y $-PO_3R^-$; y/o uno o varios grupos cargados positivamente tales como $-P^+(RR'R'')$, $-As^+(RR'R'')$, $-O^+(RR')$, $-S^+(RR')$, $-Se^+(RR')$, $-Te^+(RR')$, $-Sb^+(RR'R'')$, $-Bi^+(RR'R'')$, $O\leftarrow N^+(RR')$, $>C=N^+(RR')$, $-N^+(RR'R'')$, $-(R)N-N^+(RR'R'')$, $-(R)N-C(=HN)-N^+(RR'R'')$, $-C(=NH)-N^+(RR'R'')$, o un catión N-heteroaromático tal como pirazolio, imidazolio, oxazolio, tiazolio, piridinio, quinolinio, pirimidinio, 1,2,4-triazinio, 1,3,5-triazinio y purinio; en donde n es un número entero de 1 a 6, R, R' y R'' cada uno es independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo, o dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N al que están fijados forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que contiene opcionalmente uno o varios heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en O, S o N y además está opcionalmente sustituido en el átomo de N adicional. El hidrocarbilo C_{1-25} definido para R_7 , R_8 , R_9 y R'_9 también puede estar sustituido con el residuo de un monosacárido, oligosacárido o polisacárido tal como glicosilo, o de un aminoácido, un péptido o una proteína, preferiblemente un péptido RGD. Además, R_8 , R_9 y R'_9 cada uno puede ser independientemente un residuo de un monosacárido, oligosacárido o polisacárido tal como glicosilo, o de un aminoácido, un péptido o una proteína, o un ligando polidentado tal como DTPA, DOTA, EDTA y similares y sus complejos quelantes con metales.

35 En los grupos OR y SR, cuando R es H, los grupos hidroxilo y mercapto están representados, respectivamente, y cuando R es distinto de H, los éteres y sulfuros están representados. En el grupo $-PRR'$, el grupo fosfino está representado cuando R y R' son H. En el grupo $-COR$, cuando R es H, el grupo formilo $-CHO$ de un aldehído está representado, mientras que cuando R es distinto de H, este es el residuo de una cetona tal como grupos alquilcarbonilo y arilcarbonilo. En el grupo $COOR$, cuando R no es H, este es un grupo éster de ácido carboxílico tal como los grupos alcóxicarbonilo y arilóxicarbonilo. Del mismo modo, los ésteres están representados en los grupos $-OSO_3R$, $-SO_3R$, $-SO_2R$, $-OPO_3RR'$, $-PO_2HR$ y $-PO_3RR'$ cuando R y R' son distintos de H.

40 En una realización preferida de la invención, el fotosensibilizador no está metalado, es decir, M es 2H. En otras realizaciones preferidas, el fotosensibilizador se metala tal y como se ha definido anteriormente, más preferiblemente M es Pd, Cu o Mn, lo más preferiblemente Pd o Cu.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el fotosensibilizador es una Bchl de fórmula II, y M es 2H, Cu, Mn o Pd. En otras realizaciones, el fotosensibilizador es una Chl de fórmula II, y M es 2H, Cu o Mn.

55 En algunas realizaciones preferidas, el conjugado comprende un fotosensibilizador de Bchl de fórmula II en donde M es Pd, Mn, Cu o 2H; m es 0; R_1 es $NH-P$, en donde P es el residuo de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD unido directamente al $NH-$ o mediante un espaciador; R'_2 es metoxi; R_4 en la posición 3 es acetilo y en la posición 8 es etilo; R'_4 es metilo; y R_6 es $-NH-(CH_2)_n-SO_3^+Me$, en donde n es 2 o 3 y Me^+ es Na^+ o K^+ .

En una realización, la invención se refiere al conjugado en el que: (i) cualquiera de los hidrocarbilos C_1-C_{25} es un alquilo, alqueno o alquino C_1-C_{25} , preferiblemente C_1-C_{10} , más preferiblemente C_2-C_3 ; (ii) M es 2H o un metal seleccionado a partir de Pd, Mn o Cu; y (iii) cada R_4 , independientemente, es un radical acetilo, vinilo, etilo o 1-hidroxietilo o un éter o éster de dicho radical 1-hidroxietilo; preferiblemente R_4 en la posición 3 es acetilo, R_4 en la posición 8 es etilo, R'_4 es metilo y el fotosensibilizador es una bacterioclorofila de fórmula II en la que las posiciones 7-8 están hidrogenadas y contiene al menos un grupo seleccionado a partir de:

(a) un grupo cargado negativamente seleccionado a partir de COO^- , COS^- , SO_3^- , or PO_3^{2-} ;

(b) un grupo ácido que se convierte en un grupo cargado negativamente a pH fisiológico, seleccionado a partir de $COOH$, $COSH$, SO_3H o PO_3H_2 o una sal de los mismos:

(c) un grupo onio seleccionado a partir de $-O^+(RR')$, $-S^+(RR')$, $-Se^+(RR')$, $-Te^+(RR')$, $-P^+(RR'R'')$, $-As^+(RR'R'')$, $-Sb^+(RR'R'')$ y $-Bi^+(RR'R'')$, en donde R, R' y R'' son cada uno independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo;

(d) un grupo cargado positivamente, preferiblemente un grupo final o un grupo ubicado dentro de una cadena de alquilo, seleccionado a partir de un catión obtenido a partir de un grupo que contiene N seleccionado a partir de un grupo $-N^+(RR'R'')$, $-(R)N-N^+(RR'R'')$, $O\leftarrow N^+(RR'R'')$, $>C=N^+(RR')$, $-C(=NR)-N^+RR'R''$ o $-(R)N-C(=NR)-N^+RR'R''$, preferiblemente $N^+(RR'R'')$, o un catión obtenido a partir de un compuesto heteroaromático que contiene uno o varios átomos de N y opcionalmente átomos de O o S tal como pirazolio, imidazolio, oxazolio, tiazolio, piridinio, quinolinio, isoquinolinio, pirimidinio, 1,2,4-triazinio, 1,3,5-triazinio o purinio, o

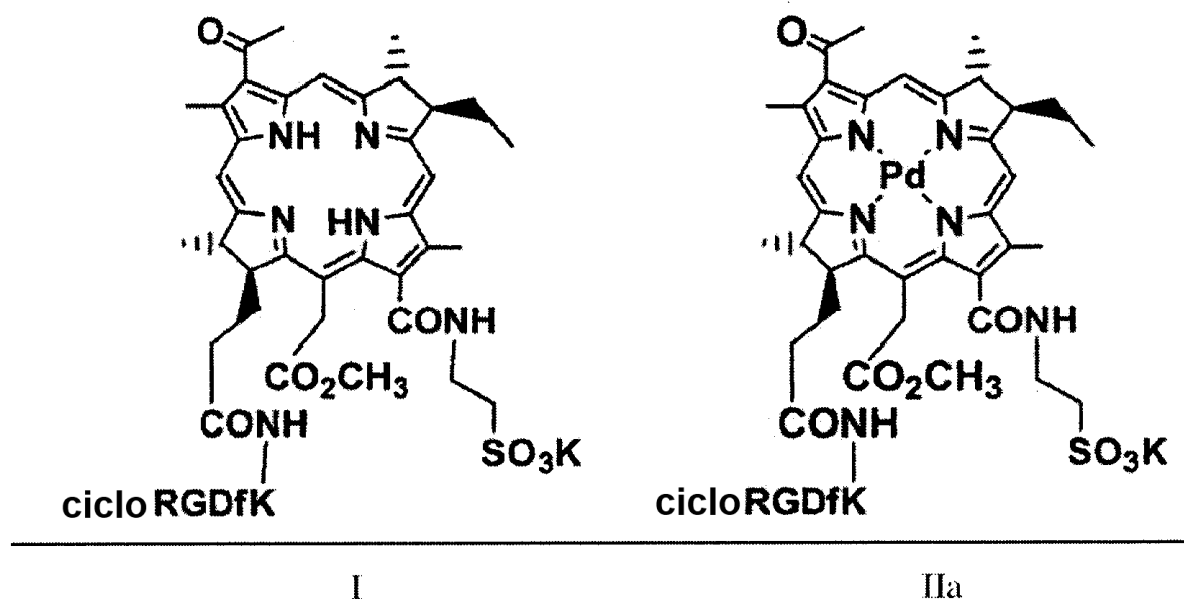
(e) un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas, dicho grupo básico es un grupo final o un grupo ubicado dentro de una cadena de alquilo, seleccionado a partir de un grupo $-NRR'$, $-C(=NR)-NR'R''$, $-NR-NR'R''$, $-(R)N-C(=NR)-NR'R''$, $O\leftarrow NRR'$ o $>C=NR$, o el grupo básico es un radical heteroaromático que contiene N seleccionado a partir de pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirimidilo, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo o purinilo, en donde R, R' y R'' cada uno es independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo, o heterociclilo, o dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N al que están fijados forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que opcionalmente contiene uno o varios heteroátomos seleccionado a partir de O, S o N, y además está opcionalmente sustituido en el átomo de N adicional.

En una realización preferida, el fotosensibilizador es una bacterioclorofila de fórmula II en la que R_6 es $-NR_9R'_9$, R_9 es H y R'_9 se selecciona a partir de: (i) alquilo C_1-C_{10} sustituido por SO_3H o una sal alcalina del mismo; o (ii) alquilo C_1-C_6 sustituido por un grupo básico $-NRR'$ o $-NH-(CH_2)_{2-6}-NRR'$, en donde cada uno de R y R' independientemente es H, alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con NH_2 , o R y R' junto con el átomo de N forman un anillo saturado de 5-6 miembros, que opcionalmente contiene un átomo de O o N y además está opcionalmente sustituido en el átomo de N adicional por $-(CH_2)_{2-6}-NH_2$. En realizaciones preferidas, R_6 es (i) $-NH-(CH_2)_2-SO_3K$ o $-NH-(CH_2)_3-SO_3K$; o (ii) $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH_2$, $-NH-(CH_2)_2-1$ -morfolino o $-NH-(CH_2)_3$ -piperazino- $(CH_2)_3-NH_2$.

En otra realización, el fotosensibilizador es una bacterioclorofila de fórmula II y R_1 y R_6 juntos forman un anillo cíclico que comprende un péptido RGD o un peptidomimético de RGD.

En ciertas realizaciones, el péptido que contiene RGD en el conjugado de la invención es un péptido cíclico seleccionado a partir de $c(RGDfK)$ (SEQ ID NO: 1), en donde f indica D-Phe, $c(RGDK)$ (SEQ ID NO: 3), $c(RGDf-n(Me)K)$ (SEQ ID NO: 4), $c(RGDyK)$ (SEQ ID NO: 5), en donde y es D-Tyr, o $CDCRGDCGC$ (SEQ ID NO: 9), preferiblemente el pentapéptido $c(RGDfK)$, o el péptido que contiene RGD es un péptido lineal seleccionado a partir del hexapéptido $GRGDSP$ (SEQ ID NO: 6), el heptapéptido $GRGDSPK$ (SEQ ID NO: 7), o el péptido de 25 unidades $(GRGDSf)_4K$ (SEQ ID NO: 8).

En las realizaciones más preferidas de la invención, el conjugado se selecciona a partir del compuesto **13**, en esta memoria también indicado como $c(RGDfK)$ -2H-MLT y el compuesto **24**, en esta memoria también indicado como $c(RGDfK)$ -Pd-MLT, con las fórmulas I y IIa, respectivamente:



En otras realizaciones preferidas, M es Mn, R₁, R'₂, R₄, R'₄ R₆ son como se han definido anteriormente, y P es c(RGDfK), en esta memoria indicado como compuesto **14** o c(RGDfK)-Mn-MLT, o M es Cu y el conjugado se indica en esta memoria como compuesto **15** o c(RGDfK)-Cu-MLT.

- 5 En una realización preferida adicional, M en la Bchl de fórmula II es 2H, R'₂, R₄, R'₄ y R₆ son como se han definido anteriormente, y R₁ es NH-P en donde P es c(RADfK) de SEQ ID NO: 2, en esta memoria indicado como compuesto **45** o c(RADfK)-2H-MLT, o P es c(RGDyK) de SEQ ID NO: 5.

- 10 En otras realizaciones preferidas, M es 2H, R₁, R'₂, R₄, R'₄ y R₆ son como se han definido anteriormente y P es un péptido lineal seleccionado a partir de GRGDSP de SEQ ID NO: 6, o GRGDSPK de SEQ ID NO: 7 o (GRGDSP)₄ de SEQ ID NO: 8, lo más preferiblemente P es GRGDSP y el conjugado se indica en esta memoria como compuesto **26** o GRGDSP-2H-MLT lineal.

En todavía otras realizaciones preferidas, en la Bchl de fórmula II, M es Pd, m es 0, R₁ es NH-P en donde P es c(RGDfK), R'₂ es metoxi, R₄ en la posición 3 es acetilo y en la posición 8 es etilo, R'₄ es metilo y R₆ es -NH-(CH₂)₃-SO₃ K, o P es el ciclopeptido RGDf-n(Me)K de SEQ ID NO: 4 y R₆ es -NH-(CH₂)₂-SO₃ K.

- 15 Realizaciones preferidas adicionales en las que el átomo metálico central de Bchl de fórmula II es Pd; m, R'₂, R₄, R'₄ son como se han definido anteriormente, R₁ es HH-P y R₆ es -NH-(CH₂)₂-SO₃ K, se refieren a conjugados con los péptidos lineales GRGDSPK de SEQ ID NO: 7 o (GRGDSP)₄ de SEQ ID NO: 8.

- 20 En todavía una realización más preferida, el conjugado comprende una Bchl de fórmula II en la que M es Pd; m, R'₂, R₄, R'₄ son como se han definido anteriormente, R₁ es NH-CH[(-(CH₂)₂-CO-NH-P)]₂, en donde P es el residuo del péptido que contiene RGD, c(RGDyK) de SEQ ID NO: 5, y R₆ es -NH-(CH₂)₂-SO₃K, en esta memoria indicado como compuesto **36** o c(RGDyK)₂-2H-MLT.

En otras dos realizaciones preferidas de la invención, en la Bchl de fórmula II M es Pd o 2H; m es 0; R₁ es NH-P, en donde P es el residuo de c(RGDfK) (SEQ ID NO: 1), R'₂ es metoxi; R₄ en la posición 3 es acetilo y en la posición 8 es etilo; R'₄ es metilo y R₆ es -NH-CH₂-CH(OH)-CH₂OH.

- 25 En todavía otras realizaciones preferidas, los conjugados comprenden un péptido RGD como se ha mencionado anteriormente, preferiblemente c(RGDfK) conjugado con una Bchl de fórmula II, en donde M es 2H; m, R₁, R'₂, R₄, R'₄ son como se han definido anteriormente y R₆ es NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₃-NH₂, -NH-(CH₂)₂-morfolino o -NH-(CH₂)₃-piperazino-(CH₂)₃-NH₂.

- 30 Otras realizaciones preferidas se refieren a conjugados que comprenden una Bchl de fórmula II en la que M es 2H; m es 0; R₁ es NH-c(RGDfK), R'₂ es metoxi, R₄ en la posición 3 es acetilo y en la posición 8 es etilo, R'₄ es metilo; y R₆ es -NH-(CH₂)₃-NH-CO-DTPA, o su complejo de quelato con Gd.

- 35 La invención se refiere además a conjugados preferidos que comprenden una Bchl fotosensibilizadora de fórmula II en donde M es Pd o 2H; m es 0; R₁ es NH-P, en donde P es el residuo de un peptidomimético de RGD unido directamente al NH- o a través de un espaciador; R'₂ es metoxi; R₄ en la posición 3 es acetilo y en la posición 8 es etilo; R'₄ es metilo; y R₆ es -NH-CH₂-CH(OH)-CH₂-OH o -NH-(CH₂)₂-SO₃K.

En otra realización, el conjugado comprende una Chl de fórmula II en donde M se selecciona a partir de Mn, Cu o 2H; R₁ es NH-P, en donde P es el residuo de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD unido directamente al NH- o a través de un espaciador; R₄ en la posición 3 es vinilo y en la posición 8 es etilo; R'₄ es metilo; y R₆ es -NH-(CH₂)₂-SO₃⁻Me⁺, en donde Me⁺ es Na⁺ o K⁺.

- 5 En realizaciones preferidas en la Chl de fórmula II, M es 2H o Cu o Mn, y R₄, R'₄ y R₆ son como se han definido anteriormente y el fotosensibilizador se conjuga con el péptido c(RGDfK) pentacíclico que contiene RGD de SEQ ID NO: 1.

En otra realización, R₁ y R₆ juntos forman un anillo cíclico que comprende -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-NH- o -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-piperazino-(CH₂)₂-NH-. En una realización, el conjugado comprende una Bchl de fórmula II en donde m es 0; R'₂ es metoxi; R₄ en la posición 3 es acetilo y en la posición 8 es etilo; R'₄ es metilo; y R₁ y R₆ juntos forman un anillo cíclico que comprende -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-NH- y M es Pd o M es 2H o R₁ y R₆ juntos forman un anillo cíclico que comprende -NH-RGD-CO-NH-(CH₂)₂-piperazino-(CH₂)₂-NH- y M es Pd.

Aplicabilidad industrial

15 Para uso en la presente invención, los conjugados se formulan en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición farmacéutica es para uso con fines de diagnóstico, para la visualización de tumores que comprenden dominios necróticos.

Se pueden aplicar diversas técnicas de diagnóstico de acuerdo con la invención, adaptando el átomo metálico central a la técnica en particular.

20 Para el diagnóstico de dominios necróticos tumorales mediante la formación de imágenes con fluorescencia dinámica, M en el fotosensibilizador es 2H o un metal seleccionado a partir de Pd y Zn.

Para el diagnóstico de dominios necróticos tumorales mediante una técnica de radiodiagnóstico, M en el fotosensibilizador es un radioisótopo seleccionado a partir de ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, ¹⁹⁵Pt, ⁶⁰Co, ¹¹¹In y ⁵¹Cr. En una realización, la técnica de radiodiagnóstico es la tomografía por emisión de positrones (PET) y M es ⁶⁴Cu o ⁶⁷Cu. En otra realización, la técnica de radiodiagnóstico es la tomografía por emisión de fotón único (SPET) y M es un radioisótopo seleccionado a partir de ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ¹⁹⁵Pt, ¹¹¹In, ⁵¹Cr y ⁶⁰Co.

30 Para el diagnóstico de dominios necróticos tumorales mediante la formación de imágenes por resonancia magnética molecular (MRI), M es un metal paramagnético seleccionado a partir de Mn³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺ y Dy³⁺, o el fotosensibilizador está sustituido por un complejo de quelato metálico de un ligando polidentado y el metal es como se ha definido anteriormente en esta memoria.

En una realización, la invención se refiere a un conjugado de la invención para uso en el diagnóstico de un tumor que comprende dominios necróticos, en donde el diagnóstico es mediante formación de imágenes con fluorescencia dinámica, mediante técnica de radiodiagnóstico o mediante formación de imágenes por resonancia magnética molecular (RMI).

35 En una realización, el conjugado es para uso en el diagnóstico de un tumor que comprende dominios necróticos, en donde:

el conjugado es para uso en el diagnóstico por formación de imágenes con fluorescencia dinámica,

40 (i) M es 2H o un metal seleccionado a partir de Pd y Zn y el sujeto se tiene que iluminar, y la fluorescencia se medirá en las áreas sospechosas durante al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado a intervalos de tiempo de 1-8 horas, en donde las áreas que muestran fluorescencia desde 24-48 horas o durante más tiempo, indican la presencia de un tumor dominio necrótico,

45 (ii) el conjugado es para uso en una técnica de radiodiagnóstico y M es un radioisótopo seleccionado a partir del grupo de ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, ¹⁹⁵Pt, ⁶⁰Co, ¹¹¹In o ⁵¹Cr, y el sujeto debe ser escaneado en un escáner de formación de imágenes durante al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado a intervalos de tiempo de 1-8 horas, y el nivel de radiación del área sospechosa se tiene que medir, en donde las áreas que muestran radiación después de 24-48 horas o durante más tiempo indican la presencia de un dominio necrótico tumoral, o

50 (iii) el conjugado es para uso en la formación de imágenes por resonancia magnética molecular (MRI) y M es un metal paramagnético seleccionado a partir de Mn³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺ o Dy³⁺ y el paciente es sometido a una formación de imágenes por resonancia magnética generando al menos una imagen por resonancia magnética de la región diana de interés dentro del cuerpo del paciente antes de la administración del conjugado y una o varias imágenes por resonancia magnética en un segundo momento o más puntos de tiempo al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado y los datos son procesados y analizados para diagnosticar la presencia o ausencia de un dominio necrótico tumoral.

Los conjugados para uso de la invención son útiles en la detección de tumores que comprenden dominios necróticos en los que el tumor es un tumor primario o metastásico tal como melanoma, tumores de próstata, cerebro, colon, ovario, mama, colorrectal, cabeza y cuello, pared torácica provenientes del cáncer de mama, cánceres y tumores de piel, pulmón, esófago y vejiga.

5 En una realización preferida, el tumor es cáncer de mama localizado, particularmente carcinoma ductal in situ (DCIS).

10 En ciertas realizaciones, el conjugado se selecciona a partir del compuesto 13 o el compuesto 24 de las fórmulas I o IIa, respectivamente, anteriores, para uso en el diagnóstico mediante la formación de imágenes por fluorescencia dinámica, el tumor es tumor mamario u ovárico, y los dominios necróticos se visualizan 3 a 8 días después de la administración del conjugado.

En otras realizaciones, el conjugado de la invención es para uso en el diagnóstico mediante una técnica de radiodiagnóstico tal y como se ha descrito anteriormente, en donde la técnica de radiodiagnóstico se selecciona a partir de tomografía por emisión de positrones (PET) y M es ^{61}Cu o ^{67}Cu , o tomografía por emisión de fotón único (SPET) y M es un radioisótopo seleccionado a partir de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{195}Pt , ^{111}In , ^{51}Cr y ^{60}Co .

15 La presente invención se refiere además a un método para visualizar un tumor con dominios necróticos.

(i) mediante la formación de imágenes por fluorescencia dinámica en donde dicho método comprende

20 (a) administrar un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila de fórmula II como se ha definido anteriormente, en donde M es 2H o un metal seleccionado a partir de Pd y Zn, a un sujeto sospechoso de tener un tumor con dominios necróticos, e

(b) iluminar al sujeto y medir la fluorescencia de las áreas sospechosas durante al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado a intervalos de tiempo de 1-8 horas, o

(ii) mediante una técnica de radiodiagnóstico en la que dicho método comprende

25 (a) administrar un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila de fórmula II como se ha definido anteriormente, en donde M es un radioisótopo seleccionado a partir de ^{64}Cu , ^{67}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{201}Tl , ^{195}Pt , ^{60}Co , ^{111}In o ^{51}Cr a un sujeto sospechoso de tener un tumor con dominios necróticos, y

30 (b) escanear al sujeto en un escáner de formación de imágenes durante al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado a intervalos de tiempo de 1-8 horas, y medir el nivel de radiación de las áreas sospechosas, o

(iii) mediante formación de imágenes por resonancia magnética molecular (MRI) en donde dicho método comprende

35 (a) administrar un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila de fórmula II como se ha definido anteriormente, en donde M es un metal paramagnético seleccionado a partir de Mn^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} o Dy^{3+} a un sujeto sospechoso de tener un tumor con dominios necróticos, y

40 (b) someter al paciente a MRI generando al menos una imagen de MR de la región diana de interés dentro del cuerpo del paciente antes de dicha administración (tiempo cero) y una o varias imágenes de MR en un segundo momento o más puntos de tiempo al menos 24-48 horas, preferiblemente 96, horas después de dicha administración.

En realizaciones preferidas, los conjugados usados en el método anterior son el compuesto **13** (fórmula I) o el compuesto **24** (fórmula IIa).

45 El método para visualizar se puede emplear para un tumor primario o un tumor metastásico con dominios necróticos, tal como melanoma, tumores de próstata, cerebro, colon, ovario, mama, colorrectal, cabeza y cuello, pared torácica provenientes del cáncer de mama, cánceres y tumores de piel, pulmón, esófago y vejiga. En una realización preferida, el tumor es cáncer de mama localizado, particularmente carcinoma ductal in situ (DCIS).

50 En un aspecto, la presente invención se refiere a un nuevo método para la detección de una necrosis tumoral que se basa en la captación selectiva y la acumulación prolongada de conjugados fluorescentes de Chl/Bchl-RGD en los dominios necróticos tumorales. El sensibilizador de Chl/Bchl se conjuga con ligandos que se dirigen a receptores específicos de las células endoteliales y tumorales. Después, se inicia una generación fotodinámica de ROS al iluminar el volumen del tumor y sus proximidades una vez que la Chl/Bchl se acumula a concentraciones suficientemente altas y se aclara del tejido circundante.

El componente de Bchl del compuesto **24** tiene una fluorescencia intrínseca en el infrarrojo cercano (NIR) que se puede detectar. Experimentos recientes, usando el compuesto **24**, mostraron una acumulación de hasta 4-8 μM en xenoinjertos de tumores primarios. El compuesto **24** permanece en el sitio del tumor durante un tiempo prolongado, lo que permite una acumulación de la señal y una buena relación señal/ruido. Esas habilidades de la molécula probablemente dependen de la interacción entre Bchl y la albúmina sérica, lo que hace que esta molécula sea un buen candidato para la obtención de imágenes dirigidas y, eventualmente una terapia dirigida. Otro derivado de Bchl, el compuesto **13**, tiene una capacidad de brillo que es tres órdenes de magnitud más alta y, por lo tanto, podría ser un candidato aún mejor para la obtención de imágenes dirigidas. Esas moléculas abren la posibilidad de detectar con precisión los márgenes tumorales y las necrosis en un modelo de adenocarcinoma de mama humano. La detección de los márgenes tumorales y las necrosis presenta hasta la fecha dos de los problemas más desafiantes en el tratamiento de tumores. Además, ambos son agentes de predicción fiables de un nuevo crecimiento tumoral después del tratamiento. Por lo tanto, en el futuro, cuando se aplique clínicamente, se espera que los derivados de RGD mencionados anteriormente sean adecuados para la detección de tumores y de necrosis en la mesa de operaciones.

La presente invención ha introducido un nuevo enfoque para lograr una acumulación prolongada de derivados de Chl/Bchl que se conjugan con péptidos RGD en dominios necróticos tumorales después de una residencia temporal en el tejido tumoral viable. Los compuestos acumulados se pueden usar para la obtención de imágenes *in vivo* de los dominios tumorales viables (en tiempos cortos después de la administración) o necróticos (en tiempos más largos). El nuevo enfoque ha sido ejemplificado por los compuestos **13** y **24**. El c(RGDfK) ya ha sido reconocido como un ligando altamente específico para las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ que están reguladas al alza en la angiogénesis. El resto del compuesto **25** proporciona al conjugado una fuerte autofluorescencia en NIR, lo que lo hace adecuado para la formación de imágenes fluorescentes después de la captación en el tejido.

Los datos experimentales muestran que el resto RGD es esencial para la acumulación específica de los compuestos **13** y **24** en tumores pequeños (no necróticos) y grandes (necróticos), ya que no se observó una acumulación a corto o largo plazo para el compuesto **25** sin conjuguar. Además, el aclaramiento total del compuesto **25** del ratón tratado, era significativamente más rápido que el del compuesto conjugado. El mecanismo dependiente de RGD se ve reforzado por el experimento de competencia descrito en este documento, en el que un exceso de c(RGDfK) libre, inyectado poco después o simultáneamente con el compuesto **13**, impedía la captación posterior en el tejido tumoral.

Se observó una gran diferencia en la acumulación del compuesto **13** entre los tumores necróticos y no necróticos. Por lo tanto, pequeños tumores MDA-MB-231-RFP ($\sim 0,5 \text{ cm}^3$), que aún no habían desarrollado una necrosis, mostraban una rápida acumulación de compuesto **13** en el tumor, 1-6,5 h después de la inyección del fármaco seguido de un aclaramiento rápido ($< 24 \text{ h}$). Solo se pudieron detectar cantidades muy pequeñas del fármaco en el tumor en momentos posteriores, cuando la mayor parte del fármaco restante estaba confinado en los órganos del aclaramiento (principalmente los riñones pero también el hígado). Tumores MDA-MB-231-RFP grandes ($> 1 \text{ cm}^3$) que habían desarrollado una necrosis, mostraron una acumulación más lenta que alcanzaba una proporción máxima de concentración tumoral, en comparación con otros órganos, a partir de 48 h después de la inyección de fármaco. La concentración promedio del fármaco en la masa tumoral solo se redujo ligeramente a partir de 24 h después de la inyección del fármaco. Estos resultados son generales para regiones tumorales necróticas, pero difieren según el tipo de tumor. Además, se observó una diferencia similar entre los patrones de acumulación en tumores necróticos y no necróticos para el compuesto **24**, excepto para las tasas de aclaramiento más lentas observadas en el hígado, lo que hacían que el compuesto **13** fuera un mejor candidato para las aplicaciones clínicas.

Posiblemente, la diferencia observada en esta memoria entre las tasas de acumulación del compuesto **13** en regiones necróticas y no necróticas en un modelo de cáncer de mama y un modelo de tumores de cáncer de ovario, está relacionada con la naturaleza diferente del microambiente en los dos tipos de tumores. Se encontró una relación inversa entre el volumen tumoral y la densidad de los microvasos en los tumores de mama: a medida que aumenta el volumen del tumor, hay una disminución fuerte de la densidad de microvasos por centímetro cúbico. Por lo tanto, la concentración de integrinas se vuelve proporcionalmente más baja y, por lo tanto, la tasa de acumulación de fármaco dependiente de integrina debería ser proporcionalmente más baja.

La característica más llamativa de los datos presentados es el claro desplazamiento de la fluorescencia del fármaco desde el volumen tumoral viable al necrótico, demostrado por la formación de imágenes fluorescentes de un tumor extirpado de los tumores necróticos MDA-MB-231-RFP en diferentes momentos después de la administración del compuesto **13**. Después de la dependencia de la acumulación de fármaco sobre el resto RGD, puede ser posible una acumulación en múltiples etapas, en donde la primera etapa implica la disociación del resto del compuesto **25** (2H-MLT) desde una molécula de albúmina sérica y una captación activa por las integrinas $\alpha_v\beta_3$ en el sistema microvascular, células tumorales viables y posiblemente, macrófagos o neutrófilos. Se sugiere que esta etapa venga seguida por una transferencia pasiva o migración por transcitosis del compuesto **13** de acceso al dominio necrótico y una falta de drenaje desde allí durante un tiempo prolongado. En los tumores no necróticos, el fármaco se acumula rápidamente, a través del área viable, que consiste en todo el tumor, pero como no hay necrosis el fármaco se aclara rápidamente. Cuando se inyectaba el compuesto **24**, los resultados de la fluorescencia del tumor extirpado eran similares a los obtenidos con el compuesto **13**.

Se han encontrado diferencias similares en la tasa de acumulación en los tumores necróticos y no necróticos en

otros modelos de tumores, es decir, MLS-mBanana, cáncer de ovario humano. Sin embargo, existe alguna variación en las tasas y el patrón de acumulación, lo que probablemente refleja los diferentes tipos de tumores. El compuesto **13** se acumula rápidamente en los tumores MLS-mBanana no necróticos y luego desaparece lentamente por aclaramiento. En los tumores necróticos, el fármaco alcanza la concentración máxima en los márgenes viables en la primera hora y luego se mueve hacia la zona necrótica en donde alcanza una concentración máxima 24 h después de la administración. La acumulación rápida en MLS-mBanana con concentraciones elevadas, en comparación con MDA-MB-231-RFP, posiblemente refleja una mayor concentración de receptores de integrina en las células de MLS-mBanana.

La histología de tumores grandes y pequeños de animales tratados con el compuesto **13** parece apoyar el patrón de acumulación sugerido y proporcionar algunas pistas sobre el mecanismo subyacente. Existe un solapamiento muy bueno entre el dominio tumoral viable y la fluorescencia del compuesto **13** en las primeras horas, y un solapamiento muy bueno entre la fluorescencia de **13** y los dominios necróticos a las 24 h y tiempos más prolongados después de la administración.

Existen muchos informes sobre la acumulación de fármacos y agentes de contraste en tumores, relacionados con un drenaje linfático deficiente y un retorno venoso lento. Este fenómeno, denominado efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR), se ha sugerido previamente como un medio para dirigirse a un tejido tumoral de una manera no específica. Es posible que el EPR represente el patrón de acumulación del compuesto **13** o compuesto **24** en el dominio necrótico y los tumores no necróticos. Recientemente se ha propuesto una permeación del complejo de albúmina sérica (SA) y fármaco a través del sistema vascular tumoral hacia el tejido intersticial del tumor, para explicar esa acumulación (Tanaka, Shiramoto et al. 2004). Hay varios ejemplos en las publicaciones que han mostrado que la conjugación de moléculas con SA daba como resultado la entrega de la molécula al tumor e incluso al dominio necrótico. De hecho, los presentes inventores mostraron previamente que los derivados de Bchl solubles en agua, cargados negativamente tienen una afinidad elevada hacia SA. Por lo tanto, el compuesto **13** o el compuesto **24** probablemente se asocian con SA a través del resto Bchl después de la administración, circulan en la sangre y se extravasan con la SA al tejido tumoral por el efecto EPR, como se ha explicado anteriormente. En ese caso, se espera una acumulación del compuesto **25** como entidad química independiente en el área necrótica, sin embargo, ya que la retención del compuesto **25** en los tumores estudiados es breve, la posible acumulación por el efecto EPR se puede descartar.

Alternativamente, cuando el derivado de Bchl-RGD encuentra las integrinas $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$, se debe desprender del vehículo SA y unirse a través de la parte RGD a la integrina con mayor afinidad que a la molécula de SA. Después de esta fijación primaria, el compuesto **13** o el compuesto **24** puede difundir por endocitosis a las células epiteliales, o por transcitosis a través de las células epiteliales. También es posible que el fármaco se mueva directamente a la matriz extracelular (ECM). En esos casos, el movimiento del fármaco según el gradiente de concentración, se inclinará hacia la región necrótica en donde el compuesto **13** o el compuesto **24** tienen inicialmente en su concentración más baja.

Las interacciones propuestas de c(RGDfK)-2H/Pd-MLT con integrina pueden implicar que la acumulación en el dominio necrótico tumoral depende de los neutrófilos/macrófagos. Se sabe desde hace bastante tiempo que los neutrófilos y los macrófagos activados expresan integrinas. Los resultados histológicos muestran que los neutrófilos residen en el dominio necrótico (aunque principalmente en los márgenes). Se sabe por las publicaciones que existe una infiltración elevada de macrófagos en el carcinoma invasivo de mama (Leek, Landers et al. 1999). Para los NACAs (agentes de contraste ávidos de necrosis) se descubrió que el aclaramiento final desde los focos necróticos tarda unos días después de la administración y se corresponde con el proceso de curación natural durante el cual los tejidos necróticos son infiltrados y fagocitados cada vez más por células inflamatorias, principalmente neutrófilos, monocitos y/o macrófagos, y reemplazados por tejidos de granulación. Por lo tanto, se cree que los NACAs retenidos en una necrosis se eliminan junto con los materiales necróticos por fagocitosis. Por lo tanto, la captación secundaria con macrófagos después de la unión de NACA-necrosis también puede explicar su enriquecimiento local. Por lo tanto, se sugiere que es posible que la atracción hacia el dominio necrótico y la retención en el mismo dependan de la atracción hacia los neutrófilos y/o macrófagos que pueblan el dominio necrótico.

El posible direccionamiento y la retención prolongada de Chls/Bchls fluorescentes en el dominio necrótico puede permitir su detección temprana y ayudar a predecir el pronóstico de un tumor y los modos de tratamiento. Además, abre el camino para la administración de fármacos activados por hipoxia.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Materiales y métodos

(i) *Compuestos* - Los derivados de Bchl, los péptidos RGD y sus conjugados se prepararon como se describe en el documento WO 2008/023378 de los mismos solicitantes. Estos conjugados y compuestos se presentan en este documento con los mismos números arábigos que en el documento WO 2008/023378 (excepto el compuesto **45**).

Compuesto **13** [c(RGDfK)-2H-MLT]: sal de potasio de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida-17³-c(RGDfK)amida.

Compuesto **14** [c(RGDfK)-Mn-MLT]: sal de potasio de manganeso (III) 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida-17³-(cicloRGDfK)amida.

5 Compuesto **15** [c(RGDfK)-Cu-MLT]: sal de potasio de cobre (II) 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida-17³-(cicloRGDfK)amida.

Compuesto **24** [c(RGDfK)-Pd-MLT]: sal de potasio de paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonil-metil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida-17³-c(RGDfK)amida.

10 Compuesto **25** [2H-MLT]: sal de potasio de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida.

Compuesto **26** [GRGDSP-2H-MLT lineal]: sal de potasio de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida-17³-(GRGDSP)amida.

Compuesto **36** [c(RGDyK)₂-2H-MLT]: sal de potasio de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida-17³-bis(cicloRGDfK)amida.

15 Compuesto **45** [c(RADfK)-2H-MLT]: sal de potasio de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida-17³-(cicloRADfK)amida.

(ii) *Líneas celulares* - Las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). El profesor Michal Neeman (Departamento de Regulación Biológica, Instituto de Ciencia Weizmann, Rehovot, Israel) nos proporcionó amablemente las células de cáncer de ovario humano transfectadas con MLS-pRSETB-mBanana.

20

(iii) *Transfección de MDA-MB-231 con proteína fluorescente roja (RFP)* - Se usaron dos plásmidos para la transfección: pDsRed2-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) (Fig. **1A**) que es portador del gen de resistencia a la neomicina, y un pDsRed-Monomer-Hyg-C1 modificado (Clontech, Palo Alto, CA) que es portador del gen de resistencia a la higromicina, en donde el gen DsRed-Monomer del plásmido que se muestra en la Fig. **1B**, fue reemplazado por pDsRed2 (procedente del plásmido pDsRed2-N1, Fig. **1C**) Para la transfección, se utilizó Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

25

(iv) *Cultivo de tejidos* - Las células MDA-MB-231-RFP se mantuvieron en medio RPMI 1640 complementado con 1 mmol/L de piruvato sódico, suero de ternera fetal al 10% (FCS), 250 µg/ml de higromicina, 0,06 mg/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina. Las células se cultivaron como monocapas a 37°C en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire). Las células MLS-mBanana se mantuvieron en medio MEM-α complementado con 1 mmol/L de piruvato sódico, suero de ternera fetal (FCS) al 10%, 10 µg/ml de puomicina, 0,06 mg/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina. Las células se cultivaron como monocapas a 37°C en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire).

30

(v) *Animales* - Ratones hembra CD1 sin pelo (7-8 semanas de edad, ~25 g) se alojaron y manipularon con acceso libre a alimentos y agua en la instalación animal de acuerdo con las directrices (1996) del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Ciencias Weizmann (Rehovot, Israel).

35

(vi) *Modelo de tumor de ratón* - Células de cáncer de mama humano fluorescentes MDA-MB-231-RFP y células de cáncer de ovario humano fluorescentes MLS-mBanana (5 × 10⁶ en 100 µl de solución salina) se tripsinizaron y se recogieron hasta subconfluencia y luego se inocularon en el lomo o en la almohadilla de grasa mamaria de ratones hembra. Se permitió que los tumores se desarrollaran hasta dos tamaños deseados: tumores necróticos (~1 cm³, en 3-4 semanas) y tumores no necróticos (~0,5 cm³ en 1-2 semanas).

40

(vii) *Formación de imágenes con fluorescencia del cuerpo entero* - Los ratones fueron anestesiados mediante inyección i.p. de 30 µl de mezcla 85:15 de ketamina:xilazina. Para controlar la acumulación de fármaco en la almohadilla de grasa mamaria, los ratones fueron inyectados i.v. en la vena de la cola con 15 mg de fármaco/kg de peso corporal de compuesto **13**, compuesto **25** o compuesto **24**. La proteína fluorescente roja (RFP), pRSETB-mBanana y la fluorescencia de los fotosensibilizadores se vigilaron mediante el sistema de formación de imágenes ópticas *in vivo*, IVIS®100 (Xenogen Corp., Alameda, CA). El conjunto de filtros principales para la formación de imágenes tumorales comprendía un filtro de excitación a 500-550 nm y un filtro de emisión a 575-650 nm; el conjunto de filtros para el ruido de fondo para restar la auto-fluorescencia del tejido, comprendía un filtro de excitación a 460-490 nm y un filtro de emisión a 575-650 nm. El conjunto de filtros principales para la formación de imágenes de fármacos comprendía un filtro de excitación a 665-695 nm y un filtro de emisión a 810-875 nm. Las imágenes se obtuvieron durante el mismo tiempo de exposición y se ilustran en la misma escala de color lineal para permitir una comparación cualitativa.

45

50

(viii) *Medición de la señal de fluorescencia en tumores necróticos* - Márgenes tumorales: la región de interés

(ROI), de las imágenes de todo el cuerpo *in vivo* se marcaron y la señal fluorescente encerrada en un círculo dentro de los márgenes se expresó en fotones/s. Se utilizó la misma ROI para medir los fotones/s en el lado colateral. Además, para las mediciones del ruido de fondo, se midieron las ROIs del tumor y del lado colateral en tres ratones no tratados y se promediaron. Los valores medidos de la fluorescencia de cada ROI se dividieron por el área para proporcionar una intensidad de la señal fluorescente normalizada en fotones/s/cm². Las mediciones de la señal se recogieron desde 15 min a 216 h después de la inyección del compuesto **13**. En cada punto de tiempo, se restó el ruido de fondo y se calculó el promedio como si fuera la relación entre la fluorescencia en los márgenes tumorales y el lado colateral.

(ix) *Ensayo de competencia entre el compuesto 13 y la unión de c(RGDfK) libre* - Se inyectó a los ratones un exceso (8,5 μmol) de péptido c(RGDfK) libre una hora antes de la inyección del compuesto **13** (140 nmol). Al grupo de control se le inyectó solo el compuesto **13** (140 nmol). Se tomaron imágenes fluorescentes 24 h después de la inyección del compuesto **13**. Se usó el conjunto de filtro principal de formación de imágenes con fluorescencia como se ha descrito en (vii).

(x) *Formación de imágenes con fluorescencia de un tumor extirpado* - A los ratones se les inyectó i.v. en la vena de la cola 15 mg/kg de compuesto **13**. Se sacrificaron los ratones, se extirparon los tumores, se cortaron por la mitad y se tomaron imágenes a diferentes intervalos de tiempo: 10 min, 1, 4 y 24 h, 3, 5 y 7 días para MDA-MB-231-RFP y 7 días para MLS-mBanana usando el sistema Xenogen IVIS[®]. Los conjuntos de filtros utilizados para la formación de imágenes con fluorescencia se describen en (vii).

(xi) *Histología* - Después de los experimentos de escisión, los tumores se fijaron en formaldehído al 3,7% y se incrustaron en bloques de parafina. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) en condiciones convencionales.

(xii) *Protocolo de PDT* - A los ratones anestesiados se les inyectó i.v. 7,5 o 15 mg/kg de compuesto **13**. Los tumores se iluminaron durante 10 o 30 minutos. El intervalo de luz del fármaco tenía lugar 8 o 24 h después de la inyección del fármaco. Se empleó una iluminación transdérmica con láser de diodo de 755 nm a 100 mW/cm² (CeramOptec, Alemania). En el grupo de control en la oscuridad, a los ratones se les inyectó el fármaco por vía i.v. y se colocaron en una jaula a oscuras durante 24 h. En el grupo de control con luz, a los ratones no se les inyectó el fármaco, sino que se iluminaron durante 10 minutos con 100 mW/cm². Durante los primeros dos días después de la PDT, los ratones recibieron analgésicos según fue necesario (2,5 mg/kg de flunexina diariamente).

Ejemplo 1. Transfección de células tumorales con proteínas fluorescentes

El procedimiento de transfección se realizó para crear una línea celular que expresaba RFP de manera estable. Esa línea celular se puede detectar mediante microscopía fluorescente y otros medios de formación de imágenes con fluorescencia *in vivo* e *in vitro* (tejidos/células). La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231, conocida por generar una necrosis central espontánea, fue elegida para este fin. Dos plásmidos (Figs. **1A**, **1C**) se utilizaron y se obtuvieron clones estables y se detectaron con un microscopio de fluorescencia (véanse las Figs. **2A-2B**). Los clones generados a partir del plásmido pDsRed-Monomer-Hyg-C1 modificado (Fig. **1C**) presentaban una fluorescencia más fuerte. El clon 3 (Fig. **2B**), transfectado con pDs-Monomer-Hyg-C1 modificado, fue elegido para un uso posterior.

Las células transfectadas expresaban RFP de forma constitutiva sin una reducción de la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo *in vitro* e *in vivo*. Las células no transfectadas no tenían autofluorescencia roja.

Ejemplo 2. Modelo de tumor necrótico - Análisis histopatológico

Con el fin de verificar si las células MDA-MB-231-RFP generan un modelo necrótico adecuado, se permitió que los tumores MDA-MB-231-RFP se desarrollaran en dos tamaños. El análisis histológico e histopatológico se realizó como se describe en la sección Materiales y métodos (xi). Los resultados se muestran en las Figs. **3A** y **3B**. Los tumores grandes de ~1 cm³ mostraban un dominio necrótico muy notable (Fig. **3A**) mientras que los tumores pequeños de ~0,5 cm³ no mostraban un dominio necrótico (Fig. **3B**).

Ejemplo 3. Formación de imágenes con fluorescencia *in vivo* de la captación del compuesto 13 en tumores necróticos primarios con xenoinjerto de MDA-MB-231-RFP

Se examinó el patrón de acumulación del compuesto **13** en los tumores necróticos MDA-MB-231-RFP (≥ 1 cm³) *in vivo*. Las Figs. **4A-4B** y **5A-5B** ilustran la acumulación de la señal fluorescente del compuesto **13** en un tumor primario ortotópico de mama humano MDA-MB-231-RFP en la almohadilla mamaria de ratones hembra CD-1 sin pelo, utilizando el sistema Xenogen IVIS[®]. Las imágenes de animales completos se registraron de forma concomitante, utilizando los conjuntos de filtros como se ha descrito en la sección Materiales y métodos (vii) anterior. Se obtuvieron imágenes con fluorescencia dinámica cada 1-1,5 h durante 9 h, y 24 h después de la inyección del compuesto **13** (Figs. **4A-4B**), y luego cada 24 h durante los 7 días siguientes (Figs. **5A-5B**). Poco después de la inyección del compuesto **13**, se pudo detectar fluorescencia NIR desde todo el cuerpo del animal, lo que reflejaba una alta concentración de fármaco en la circulación. Se observó un aclaramiento rápido desde la circulación,

acompañado de una acumulación en el hígado y, en cierta medida, en el tumor, en las primeras 9 h después de la inyección. (Fig. **4B**). Los días siguientes, el compuesto **13** siguió acumulándose en el tumor mientras que se aclaraba completamente del hígado, proporcionando una formación de imágenes selectivas del tumor desde los ≥ 3 días y hasta el final del período de seguimiento, 7 días después de la inyección (Fig. **5B**), y un aclaramiento extremadamente lento a partir de entonces. El tamaño y la ubicación del tumor no cambiaron a lo largo del experimento, como se observó en las imágenes en rojo *in vivo* de todo el cuerpo (Figs. **4A y 5A**). Se observaron resultados similares en 9 animales examinados con un tamaño de tumor de ≥ 1 cm³.

Ejemplo 4. Formación de imágenes con fluorescencia *in vivo* de la captación del compuesto **13** en tumores de xenoinjertos no necróticos primarios MDA-MB-231-RFP

A continuación se examinaron los mismos parámetros en tumores $\leq 0,5$ cm³, que no eran necróticos. Las Figs. **6A-6B y 7A-7B** presentan la señal de fluorescencia del compuesto **13** y RFP en ratones hembra CD-1 sin pelo que fueron injertados con MDA-MB-231-RFP. Se tomaron imágenes del patrón de acumulación de fármaco usando el sistema IVIS® como se ha descrito anteriormente, y a intervalos de tiempo similares a los del Ejemplo 3, pero limitados a 3 días debido a un aclaramiento completo del fármaco en ese momento. El patrón de acumulación en esos tumores no necróticos era notablemente diferente del observado en los tumores necróticos. La fluorescencia NIR del compuesto **13** alcanzaba valores máximos en el tumor ~ 2 h después de la inyección y poco después en el hígado (3,5 h después de la inyección del fármaco) (Fig. **6B**). En contraste con la fluorescencia observada del compuesto **13** procedente de tumores necróticos, prácticamente no se pudo observar fluorescencia 2 días después de la inyección en los tumores no necróticos (Fig. **7A**). En mediciones promedio de la fluorescencia de 16 animales, se detectó una fluorescencia máxima del tumor 1- 6,5 h después de la inyección del fármaco.

Ejemplo 5. Cinéticas de la captación y aclaramiento del compuesto **13** en tumores necróticos MDA-MB-231-RFP

Con el fin de evaluar semicuantitativamente el patrón de acumulación del compuesto **13** en tumores necróticos, se calculó y se realizó una gráfica de la señal fluorescente promedio para el compuesto **13** en tumores necróticos de 9 ratones durante 216 h, en varios puntos temporales (Fig. **8**). A partir de 12 h después de la inyección y de ahí en adelante, la señal fluorescente del tumor se volvió claramente más fuerte que la de una región de control equivalente en el lado colateral. La proporción de la fluorescencia entre el tumor y el lado colateral aumentó con el tiempo y alcanzó una meseta a ~ 8 de las 192 h.

Ejemplo 6. Captación del compuesto **24** en tumores ortotópicos de xenoinjerto necrótico primario MDA-MB-231-RFP

El patrón de acumulación *in vivo* del compuesto **24** del conjugado metalado (c(RGDfK)-Pd-MLT) en un tumor necrótico primario MDA-MB-231-RFP, se examinó utilizando el mismo conjunto de experimentos que se han descrito en el Ejemplo 3.

Resultados mostrados en las Figs. **9A-9B y 10A-10B**, demuestran que la fluorescencia se podía detectar poco después de la inyección del compuesto **24**, reflejando una alta concentración de fármaco en la circulación. Se observó un aclaramiento rápido desde la circulación acompañado de acumulación en el hígado y, en cierta medida, en el tumor, en las primeras 8 h después de la inyección (Fig. **9B**). En los días siguientes, el compuesto **24** siguió acumulándose en el tumor, sin embargo, no se observó un aclaramiento completo desde el hígado (Fig. **10B**). Parece que el compuesto **24** puede actuar como una molécula de formación de imágenes selectiva para el tumor desde aproximadamente 3 días después de la inyección con un aclaramiento extremadamente lento a partir de entonces. Sin embargo, es algo menos específico que el compuesto **13**. El tamaño y la ubicación del tumor no cambiaron a lo largo del experimento, como se observaba en las imágenes en rojo de todo el cuerpo *in vivo* (Figs. **9A y 10A**). Estos resultados, con un tamaño de tumor de ≥ 1 cm³, fueron observados en 3 animales.

Ejemplo 7. Captación del compuesto **24** en tumores ortotópicos de xenoinjerto primario no necrótico MDA-MB-231-RFP

La señal fluorescente del compuesto **24** y RFP se examinó más a fondo en tumores no necróticos MDA-MB-231-RFP ($\sim 0,5$ cm³) injertados en ratones hembra CD-1 sin pelo, como se ha descrito en el Ejemplo 4 anterior, utilizando intervalos de tiempo similares a los indicados en el Ejemplo 6, pero limitados a 2 días debido a un aclaramiento completo del fármaco del tumor en ese momento. Los resultados presentados en las Figs. **11A-11B y 12A-12B** demuestran que, como para el compuesto **13**, el patrón de acumulación en los tumores no necróticos era notablemente diferente del observado en los tumores necróticos. La fluorescencia NIR del compuesto **24** alcanzaba valores máximos en el tumor $\sim 2,5$ h después de la inyección y poco después en el hígado (5,5 h después de la inyección del fármaco, Fig. **11B**). En contraste con la fluorescencia observada del compuesto **24** procedente de tumores necróticos, prácticamente no se pudo observar ninguna fluorescencia, 24 horas después de la inyección a partir de los tumores no necróticos (Fig. **12B**). La fluorescencia máxima del tumor (mediciones promedio de la fluorescencia de 5 animales) se detectó 1- 4,5 h después de la inyección del fármaco.

Ejemplo 8. Captación del compuesto **13** en tumores necróticos primarios MLS-mBanana implantados en la almohadilla mamaria de ratones

Para establecer la generalidad de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, la acumulación de

compuesto **13** en el dominio necrótico se examinó adicionalmente en un tipo de tumor diferente, generado a partir de una línea celular de cáncer de ovario humano MLS-mBanana. Los resultados mostrados en las Figs. **13A-13B** y **14A-14B**, ilustran la acumulación de la señal fluorescente del compuesto **13** en tumores primarios subcutáneos (s.c.) de ovario MLS-mBanana humanos que se habían injertado en la almohadilla mamaria de ratones hembra CD-1 sin pelo, usando el sistema Xenogen IVIS[®] como se ha descrito en la sección Material y métodos (vii). El patrón de acumulación se controló a intervalos de tiempo similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 3, limitados a 4 días debido a un aclaramiento completo del fármaco en ese momento. Poco después de la inyección, la fluorescencia NIR del compuesto **13** se detectó principalmente en el hígado y el tumor. Un aclaramiento rápido desde la circulación acompañado de una acumulación en el hígado y el tumor, se producía en las primeras 8 h después de la inyección (Fig. **13B**). Después de 2 días, el compuesto **13** siguió acumulándose en el tumor mientras que se aclaraba completamente del hígado, proporcionando una formación de imágenes selectivas del tumor sin una interferencia circundante (Fig. **14B**). El aclaramiento desde los tumores necróticos MLS-mBanana era notablemente más rápido que el aclaramiento desde los tumores necróticos MDA-MB-231-RFP, y casi se completó el día 3. El tamaño y la ubicación del tumor no cambiaron durante todo el experimento, como se observaba por las imágenes en rojo de todo el cuerpo *in vivo* (Figs. **13A** y **14A**). Estos resultados se observaron en 3 animales con un tamaño de tumor $\geq 1 \text{ cm}^3$.

Ejemplo 9. Captación del compuesto **13** en tumores primarios MLS-mBanana no necróticos implantados en la almohadilla mamaria de ratón

En vista de los resultados con los tumores no necróticos MDA-MB-231-RFP que no mostraban una acumulación prolongada del fármaco, se examinó la acumulación prolongada en tumores no necróticos MLS-mBanana. Los resultados mostrados en las Figs. **15A-15B** y **16A-16B**, presentan la señal fluorescente del compuesto **13** en tumores MLS-mBanana no necróticos. El patrón de acumulación se controló como se ha descrito en Materiales y métodos, sección (vi) usando intervalos de tiempo similares a los descritos en el Ejemplo 4, limitados a 4 días debido al aclaramiento casi completo del fármaco en ese momento. El patrón de acumulación en los tumores no necróticos era algo similar al de los tumores necróticos. La fluorescencia NIR del compuesto **13** alcanzó valores máximos en el tumor ~ 1 h después de la inyección (Fig. **15B**). Se detectó una acumulación en el hígado desde la primera hora.

Cuando se comparaban los tumores necróticos y los no necróticos con la misma escala de fluorescencia lineal, la concentración del compuesto **13** en los tumores necróticos parecía ser mucho mayor que en la de los no necróticos, como se muestra en las Figs. **17A-17B**. La fluorescencia tumoral máxima (mediciones promedio de la fluorescencia de 4 animales) se detectó 1- 3,5 h después de la inyección del fármaco.

Ejemplo 10. Dependencia de la acumulación del compuesto **13** del resto c(RGDfK)

Se realizaron dos experimentos para determinar si la captación en el tumor del compuesto **13** y la acumulación resultante de la señal fluorescente NIR, están dirigidas por el resto RGD. En el primer experimento, la acumulación de la señal fluorescente en diferentes momentos después de la inyección del compuesto **13** se comparó con la de la inyección de 2H-MLT libre (compuesto **25**) a ratones CD1 sin pelo injertados con tumores MDA-MB-231-RFP no necróticos ($\leq 0,5 \text{ cm}^3$) y necróticos ($\sim 1 \text{ cm}^3$) en la almohadilla mamaria. El segundo experimento era un ensayo de competencia entre el compuesto **13** y c(RGDfK) libre.

10.1 Captación del compuesto **25** en tumores primarios, necróticos y no necróticos MDA-MB-231-RFP

Se obtuvieron imágenes fluorescentes dinámicas para tumores necróticos y no necróticos cada 1-1,5 h durante 8,5-9 h, y 24 h después de la inyección inicial del compuesto **25** (Figs. **18A-18B** y **20A-20B**) y cada 24 h durante los siguientes tres días (Figs. **19A-19B** y **21A-21B**). La señal de fluorescencia NIR del compuesto **25** alcanzaba una concentración máxima en el tumor 5-10 minutos después de la inyección, si se observaba en todo caso alguna concentración. Los valores de la señal de fluorescencia eran ~ 2 órdenes de magnitud más pequeños que los valores máximos observados para el compuesto **13** (a intervalos de tiempo mucho más largos). La señal fluorescente cayó a valores no significativos ya 20 minutos después de la inyección. Mientras tanto, la señal fluorescente se acumulaba principalmente en el hígado y en el corazón. Se observó el mismo comportamiento en 3 animales con tumores necróticos (Fig. **18B**) y en 2 animales con tumores no necróticos (Fig. **20B**).

10.2 Ensayo de competencia entre el compuesto **13** y c(RGDfK) libre que se une a tumores primarios no necróticos MDA-MB-231-RFP

Los experimentos que intentaban bloquear la acumulación del compuesto **13** mediante el ligando c(RGDfK) libre, se realizaron para demostrar una unión específica. El compuesto **13** se administró con o sin inyección previa de c(RGDfK) tal y como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en las Figs. **22A-22D**. Cuando el compuesto **13** se administraba después de la administración de c(RGDfK) libre, no se detectaba una acumulación en el tumor después de 24 h (Fig. **22C**), mientras que cuando el compuesto **13** se administraba solo, en el grupo de control, la acumulación en el tumor era detectable (Fig. **22D**), lo que indica una unión específica del compuesto **13** al tumor, a través del resto c(RGDfK).

Ejemplo 11. Acumulación específica del compuesto **13** en dominios tumorales necróticos MDA-MB-231-RFP

Los patrones de fluorescencia dinámica marcadamente diferentes de los xenoinjertos de tumores de mama necróticos y no necróticos, implantados en las almohadillas mamarias, motivaron una investigación de la correlación entre la histología del tumor y la acumulación de señal de fluorescencia del compuesto **13**. Por lo tanto, los tumores se extirparon en los momentos indicados después de la inyección del compuesto **13** y se cortaron por la mitad. Se tomaron imágenes en varios puntos de tiempo (10 min, 1, 4 y 24 h, 3, 5 y 7 días después de la inyección) utilizando el sistema Xenogen IVIS® como se ha descrito en Materiales y métodos, sección (vii). Los resultados mostrados en las Figs. **23-29** presentan la acumulación de fluorescencia del compuesto **13** en diferentes puntos de tiempo. Para cada punto de tiempo, se sometieron a ensayo 3 animales. De 10 min a 4 h después de la inyección de fármaco, la fluorescencia del fármaco se observó solo en el área viable (Figs. **23-25**). A las 4 h, había cierta difusión hacia el dominio necrótico. A partir de tres días después de la inyección, el patrón de acumulación revertía: la fluorescencia cambió completamente a la zona necrótica con algo de difusión de fluorescencia residual hacia las células viables circundantes (Figs. **27F**). Estos resultados también se observaron durante cinco y siete días (Figs. **28-29**). Es importante destacar que 24 h después de la inyección, la fluorescencia específica del tumor ya se observaba claramente con una mayor fluorescencia del fármaco desde el dominio necrótico, pero los límites del tumor estaban menos definidos en comparación con el intervalo de tres días (Fig. **26F**). En este conjunto de experimentos se mostró que a medida que con el paso del tiempo, el compuesto **13** se mueve a través del dominio viable hacia el dominio necrótico y se acumula allí específicamente durante un largo período de tiempo.

Ejemplo 12. Acumulación específica del compuesto **24** en dominios tumorales necróticos MDA-MB-231-RFP

En vista del patrón de acumulación observado para el compuesto **13**, se sometieron a ensayo otros derivados de Bchl. El patrón de acumulación del compuesto **24** se vigiló y se obtuvieron resultados similares. Los resultados para tumores extirpados 9 días después de la inyección del fármaco se presentan en las Figs. **30A-30F**. Las imágenes se tomaron usando el sistema Xenogen IVIS® como se ha descrito anteriormente. Como se había observado en la Fig. **30F** nueve días después de la inyección del fármaco, el fármaco estaba claramente presente en el dominio necrótico del tumor. Estos resultados se observaron en todos los animales examinados (N = 3). Se observaron resultados similares cuando los tumores se extirparon 3 y 5 días después de la inyección de fármaco (N = 3 para cada punto de tiempo).

Ejemplo 13. Acumulación específica del compuesto **13** en dominios tumorales necróticos de MLS-mBanana

La acumulación observada tanto del compuesto **13** como del compuesto **24** en el dominio necrótico de los tumores MDA-MB-231-RFP, proporcionó una motivación para examinar la generalidad de este fenómeno y su posible aplicación en la terapéutica y la formación de imágenes. Por lo tanto, se utilizó un tipo de tumor diferente: cáncer de ovario humano MLS-mBanana. En este caso, los resultados fueron algo diferentes. En la mayoría de los casos, el patrón de necrosis en ese tipo de tumor no era central, es decir, había una necrosis muy extendida que no estaba localizada específicamente en el centro del tumor o estaba generada desde un lugar en el tumor. En esos casos, la acumulación no era tan prolongada. En los pocos casos en que se observó una necrosis central, el patrón de acumulación era similar al de los tumores MDA-MB-231-RFP. Las Figs. **31-32** muestran los resultados obtenidos 7 días después de la inyección del fármaco. Como se observa, el fármaco estaba claramente presente en el dominio necrótico del tumor, cuando se observaba necrosis central (Fig. **31F**) y no estaba presente cuando no había necrosis central (Fig. **32F**).

Ejemplo 14. Imagen de tumor extirpado y secciones histológicas de tumores necróticos

Se extirpó un tumor necrótico MDA-MB-231-RFP y se tiñeron secciones histológicas del tumor (hematoxilina y eosina (H&E)). Las Figs. **33A-33D** muestran secciones histológicas de dominios viables y necróticos tumorales del tumor extirpado, 4 horas después de la inyección de fármaco. Estas observaciones deberían complementar la RFP y la formación de imágenes de la distribución tisular del compuesto **13** obtenidas previamente. Como se observa en la Fig. **33A**, el volumen de la masa está compuesto por tejido opaco, marrón y necrótico. A partir de la Fig. **33B**, se puede observar una correlación entre las características macroscópicas y microscópicas. El tejido necrótico en el centro era de eosinófilo a hipereosinófilo con cariólisis generalizada y menor picnosis y cariorrexis. Había una infiltración neutrofílica multifocal leve en el tejido necrótico, principalmente en los márgenes del dominio necrótico. Las áreas viables se limitaban a la periferia del tumor. Estaban compuestas por una proliferación desorganizada de células neoplásicas dispuestas en láminas densamente celulares (Fig. **33D**). Las células neoplásicas eran de redondas a irregulares con una relación nuclear:citoplasmática elevada y núcleos vesiculares irregulares. La fluorescencia del compuesto **13** 4 h después de la inyección se correspondía muy bien con los resultados histológicos, tanto para los dominios viables como necróticos (Fig. **25F**). Se obtuvo una correlación similar en todos los tumores necróticos examinados, incluidos los tumores de control que no se habían inyectado con el fármaco.

Ejemplo 15. Estudios de PDT *in vivo* empleando el compuesto **13**

En general, para los estudios de PDT *in vivo* se generan modelos de tumor de ratón inoculando células de cáncer de mama MDA-MB-231-RFP fluorescentes o células de cáncer de ovario MLS-mBanana, por vía subcutánea en el lomo o la almohadilla de grasa mamaria de ratones hembra como se ha descrito anteriormente, y se dejan crecer hasta que tienen un tamaño necrótico ($\geq 1 \text{ cm}^3$) o no necrótico ($\sim 0,5 \text{ cm}^3$). Se inyecta i.v. el fármaco a ratones anestesiados con diferentes concentraciones de fármaco entre 7,5-15 mg/kg. Los tumores se iluminan durante 10 o

30 min, y el intervalo luminoso del fármaco es de 4-24 h después de la inyección del fármaco.

Se aplicaron varios protocolos que examinan el efecto del compuesto **13** sobre tumores MDA-MB-231-RFP en ratones CD-1 sin pelo, para obtener condiciones de tratamiento óptimas, y los resultados se resumen en la Tabla 1.

5 Como se observa en la Tabla 1, parece que 7,5 mg de fármaco/kg de cuerpo y 10 minutos de iluminación proporcionan los mejores resultados de tratamiento fotodinámico para tumores necróticos y no necróticos. Los resultados mostrados en las Fig. **34A-34B** muestran una cura completa en un tumor no necrótico MDA-MB-231-RFP. Un día después del tratamiento se detectó un edema, seguido de necrosis leve y luego más extensa en los 4 días siguientes. El día 7 se observó un aplanamiento del tumor. La herida se curó y el animal se curó 90 días después de la PDT. Los resultados también se examinaron usando el sistema Xenogen IVIS® como se ha descrito
10 previamente para la fluorescencia de RFP. Después de 90 días no había señal de fluorescencia en el tumor.

Tabla 1: Resultados de los protocolos de PDT para el tratamiento de tumores MDA-MB-231-RFP.

Tipo de tumor	Tiempo de tratamiento (horas)	Dosis (mg/kg)	Duración de la iluminación (min)	Intensidad de la iluminación (mW)	Comentarios	Nº de animales
No necrótico	8	15	10	100	Muerte con tratamiento	5
	24	15	30	280	Ninguna respuesta	3
	8	7,5	10	100	Respuesta completa	4
					Necrosis limitada y rebrote	3
					Ninguna respuesta	1
Muerte con tratamiento					3	
Necrótico	8	7,5	10	100	Respuesta completa	1
					Necrosis limitada y rebrote	3

Ejemplo 16. Establecimiento del modelo de carcinoma ductal localizado in situ (DCIS) en la mama de ratones/ratas sin pelo

15 Se utilizan varias líneas celulares para establecer el modelo de DCIS en ratones y ratas. En primer lugar, las células MADB106 que son singénicas con ratas F-344 ya se han implantado con éxito (ortotópicas) en la almohadilla mamaria de la rata. Hasta el momento, este modelo se ha utilizado para evaluar la eficacia de la PDT con diferentes derivados de RGD-Bchl y el posterior desarrollo de una inmunidad antitumoral a largo plazo. El mismo protocolo que para los tumores de carcinoma mamario de rata se usa para implantar dos líneas celulares humanas y una línea celular de ratón adicional ortotópicamente y para obtener metástasis en los pulmones y los ganglios linfáticos. Las dos primeras, hT47D y HCC1395, son líneas celulares de carcinoma ductal (HCC1395 es un carcinoma ductal
20 primario en estadio 1, que está lo más cerca posible de DCIS) que se cultivan de acuerdo con las regulaciones de la ATCC y las publicaciones (Gazdar et al., 1998), y se inyectan como aloinjertos en la almohadilla mamaria de los animales sin pelo. La tercera (4T1) es una línea celular mamaria de ratón que genera metástasis pulmonares unas semanas después de la inyección de células en la vena de la cola. Esta variedad de líneas celulares nos permite estudiar el efecto de (derivados de Bchl/Bchl-RGD)-PDT sobre lesiones primarias, localmente recurrentes y metástasis remotas de carcinoma mamario como modelos de cáncer de mama. Las células 4T1 se transfectan con luciferasa, así como las otras dos líneas celulares. La transfección de 4T1 con pDsRed1-C1 está actualmente en curso. Esa fluorescencia permite: (1) una evaluación de la precisión de la detección utilizando fluorescencia basada
25 en Bchl-RGD o MRI; (2) realizar un seguimiento en línea del crecimiento tumoral y la regresión con Bchl-PDT en animales intactos con una sensibilidad muy alta.

Ejemplo 17. Establecimiento del concepto de acumulación de necrosis como concepto general

Existen tipos de tumores que desarrollan una necrosis central durante el desarrollo. Dos de esos tumores se seleccionan para un examen a partir de tumores desarrollados procedentes de las siguientes líneas celulares:
35 cáncer de mama DCIS MCF7 humano, DCIS MCF10DCIS humano (Tait et al., 2007), glioblastoma humano U87,

cáncer de mama inflamatorio humano (IBC) WIBC-9 (Shirakawa et al. 2001) y RCC.

Las líneas celulares seleccionadas se someten a una transfección usando el plásmido pDsRed-Monomer-Hyg-C1 modificado y el reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) como se ha descrito en Materiales y métodos, sección (iii) anterior. Las células se implantan ($1-5 \times 10^6$ células, de acuerdo con los requisitos para cada tipo de célula) ortotópicamente, si es posible, o s.c. en ratones CD-1 sin pelo, se les permite crecer hasta el tamaño límite deseado (aproximadamente 1 cm^3) y desarrollar necrosis. La región necrótica se vigila histológicamente. Se seleccionan dos modelos tumorales adecuados, desarrollados a partir de las líneas celulares anteriores para un estudio adicional, en función de los parámetros de la zona necrótica, la tasa de crecimiento y la formación de imágenes.

- 5 Para la formación de imágenes con fluorescencia del cuerpo entero, los ratones se anestesian como se ha descrito anteriormente y el compuesto **13** se inyecta i.v. en la vena de la cola (15 mg/kg). La fluorescencia del fármaco y el tumor se controlan mediante el sistema de imagen IVIS®100 (Xenogen) como se ha descrito anteriormente.

- 15 Para la formación de imágenes con fluorescencia de tumores extirpados, se inyecta i.v. a ratones en la vena de la cola 15 mg/kg de compuesto **13**. Los ratones se sacrifican después en diferentes momentos y los tumores se extirpan y se cortan por la mitad. La formación de imágenes de los tumores extirpados y su tinción histológica para evaluar los dominios necróticos, se realizan de acuerdo con Materiales y métodos, secciones (x) y (xi) más arriba. Se espera una acumulación de compuesto **13** en los dominios necróticos centrales de los tumores, independientemente del origen de la línea celular.

Ejemplo 18. Patrón de acumulación del compuesto **25** conjugado con diferentes restos RGD

- 20 Para establecer aún más la relevancia del direccionamiento de RGD, se utilizan diferentes péptidos RGD y controles negativos para examinar el patrón de acumulación en los tumores MDA-MB-231-RFP.

- 25 Se implantan células MDA-MB-231-RFP (5×10^6 células) ortotópicamente en ratones hembra CD-1 sin pelo y se les permite crecer hasta un tamaño necrótico de 1 cm^3 . Los ratones se anestesian y se inyectan i.v. en la vena de la cola, 15 mg/kg de compuesto **26** (GRGDSP-2H-MLT lineal), compuesto **45** (c(RADfK)-2H-MLT) y compuesto **36** (c(RGDyK)₂-2H-MLT). La fluorescencia del fármaco *in vivo* en el animal intacto y la histología y la formación de imágenes con fluorescencia del tumor extirpado se llevan a cabo como se ha descrito anteriormente en Materiales y métodos, secciones (vii), (x) y (xi), respectivamente.

Ejemplo 19. Acumulación de otros derivados de Bchl-RGD en el área necrótica

- 30 Se examinan derivados adicionales de Bchl-RGD para investigar si el patrón de acumulación en la necrosis es un paradigma general para todos los derivados de Bchl-RGD que tienen potencial terapéutico y/o de formación de imágenes. Específicamente, se examinan los derivados del compuesto **15** (c(RGDfK)-Cu-MLT) y del compuesto **14** (c(RGDfK)-Mn-MLT).

Las células MDA-MB-231-RFP (5×10^6 células) se implantan ortotópicamente, en ratones hembra CD-1 sin pelo y se permite que crezcan hasta un tamaño de tumor de 1 cm^3 .

- 35 En caso de que la fluorescencia de Bchl se agote debido a una metalación (por ejemplo, Cu y Mn), las concentraciones de los compuestos en los tejidos tumorales y no tumorales se determinan por espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), utilizando un instrumento ELAN-6000 (Perkin Elmer, CT) según lo descrito por Brandis et al. (Brandis et al., 2005).

Ejemplo 20. Ensayos de biodistribución

- 40 Este experimento tiene como objetivo cuantificar el curso de la propagación y acumulación de un fármaco en varios órganos del cuerpo, y demostrar de manera imparcial que el fármaco se acumula eventualmente en el tumor.

- 45 A ratones anestesiados que eran portadores de tumores MDA-MB-231-RFP, se les inyecta i.v. el compuesto **13**, 15 mg/kg. Los ratones se sacrifican en varios puntos de tiempo después de la inyección. Los tejidos (sangre, riñones, hígado, piel, grasa, músculo, bazo, intestino, cerebro, corazón, pulmones y tumor) se recogen en viales ponderados previamente y se congelan. Las muestras de tejido se homogenizan y el fármaco se extrae en metanol (~1 ml de metanol por 100 mg de tejido). Las muestras se analizan entonces para determinar el contenido en fármaco mediante análisis fluorescente.

- 50 La cuantificación de la acumulación en los diversos tejidos del compuesto **13** se realiza mediante mediciones de la intensidad de la fluorescencia y evaluando la concentración de fármaco utilizando, como referencia, una curva de calibración obtenida midiendo la intensidad de la fluorescencia de diferentes concentraciones de compuesto **13** en etanol. Las imágenes de fluorescencia NIR *in vivo* obtenidas en el Ejemplo 3 anterior en diversos puntos temporales, se comparan con la intensidad de la fluorescencia de los extractos procedentes del ensayo de biodistribución. Los resultados se utilizan para validar las mediciones *in vivo*.

Se espera encontrar una correlación lineal entre las mediciones de la fluorescencia *in vitro* e *in vivo*. También se

espera que el análisis cuantitativo muestre con mayor precisión las diferentes acumulaciones y el aclaramiento desde el tumor y los tejidos normales. Una determinación de ese tipo puede ser muy útil para el ámbito clínico.

Ejemplo 21. Derivados de RGD-bacterioclorofila metalados con un radioisótopo para la formación de imágenes y la terapia

5 Otra opción terapéutica es reemplazar el metal central del fármaco por uno radiactivo. La acumulación de un derivado de RGD-M-Bchl de ese tipo, en donde M tiene una vida útil relativamente larga (para la terapia) se puede usar para la radioterapia del tumor. El fármaco también se podría administrar con los intervalos en los que el fármaco permanece a bajas concentraciones en el cuerpo pero se acumula cada vez más en la región necrótica.

10 La incorporación de Cu en el fármaco se realiza mediante un método desarrollado en el laboratorio de los presentes inventores que permite una metalación cuantitativa de 2H-Bchl-RGD al cabo de 10-20 minutos a temperatura ambiente. El compuesto obtenido es muy estable y no se produce una desmetalación en condiciones fisiológicas.

Se espera demostrar una acumulación del compuesto radiactivo en el tejido tumoral y observar una regresión tumoral después de uno o dos tratamientos.

Referencias

- 15 Alfsen, A., H. Yu, et al. (2005). "HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer". *Mol Biol Cell* 16(9): 4267-79.
- Becker, A., B. Riefke, et al. (2000). "Macromolecular contrast agents for optical imaging of tumors: comparison of indotricarbocyanine-labeled human serum albumin and transferrin". *Photochem Photobiol* 72(2): 234-41.
- Berton, G. and C. A. Lowell (1999). "Integrin signalling in neutrophils and macrophages". *Cell Signal* 11(9): 621-35.
- 20 Bijker N et al. (2006) "Breast-conserving treatment with or without radiotherapy in ductal carcinoma-in-situ: ten-year results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized phase III trial 10853"--a study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. *J Clin Oncol.* 24(21):3381-7
- Boehm-Viswanathan T. (2000) "Is angiogenesis inhibition the Holy Grail of cancer therapy?" *Curr Opin Oncol.* 12(1):89-94.
- 25 Brandis A., Mazor O., Gross S., Koudinova N., Hami R., Kalin-Kammhuber N., Rosenbach-Belkin V., Greenwald M., Bondon A., Simonneaux G., Scheer H., Salomon Y. and Scherz A. (2003) "Novel palladium-bacteriochlorophyll derivatives for antivascular Photodynamic therapy: synthesis, phototoxicity, pharmacokinetics and efficacy", *J. Med. Chem.* submitted.
- Brandis, A., O. Mazor, et al. (2005). "Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: synthesis, solubility, phototoxicity and the effect of serum proteins". *Photochem Photobiol* 81(4): 983-93.
- 30 Britton MM. (2006) "Nuclear magnetic resonance studies of convection in the 1,4-cyclohexanedione-bromate-acid reaction. *J Phys Chem A*". 110(15):5075-80.
- Brown, J. M. and A. J. Giaccia (1998). "The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy". *Cancer Res* 58(7): 1408-16.
- 35 Brown, J. M. and W. R. Wilson (2004). "Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment". *Nat Rev Cancer* 4(6): 437-47.
- Brown, N. S. and R. Bicknell (2001). "Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer". *Breast Cancer Res* 3(5): 323-7.
- Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. (2004) "Ductal carcinoma in situ of the breast". *N Engl J Med.* 350(14): 1430-41. Review
- 40 Bussolati, G., M. Bongiovanni, et al. (2000). "Assessment of necrosis and hypoxia in ductal carcinoma in situ of the breast: basis for a new classification". *Virchows Arch* 437(4): 360-4.
- Cao, Y. (2005). "Tumor angiogenesis and therapy". *Biomed Pharmacother* 59 Suppl 2: S340-3.
- 45 Cellini C, Huston TL, Martins D, Christos P, Carson J, Kemper S, Simmons RM. (2005) "Multiple re-excisions versus mastectomy in patients with persistent residual disease following breast conservation surgery". *Am J Surg.* 189(6):662-6.
- Cutuli, B., C. Cohen-Solal-le Nir, et al. (2002). "Breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ of the breast: the French Cancer Centers' experience". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53(4): 868-79.

- Dean, M., T. Fojo, et al. (2005). "Tumour stem cells and drug resistance". *Nat Rev Cancer* 5(4): 275-84.
- Dewhirst, M. W. (1998). "Concepts of oxygen transport at the microcirculatory level". *Semin Radiat Oncol* 8(3): 143-50.
- Dougherty, T. J., C. J. Gomer, et al. (1998). "Photodynamic therapy". *J Natl Cancer Inst* 90(12): 889-905.
- 5 Edwards, J. G., D. E. Swinson, et al. (2003). "Tumor necrosis correlates with angiogenesis and is a predictor of poor prognosis in malignant mesothelioma". *Chest* 124(5): 1916-23.
- Folkman J. (1996) "Endogenous inhibitors of angiogenesis". *Harvey Lect.* 92:65-82.
- Folkman J. (1997) "Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview". *EXS.* 79:1-8. Review.
- Folkman J. (2004) "A novel anti-vascular therapy for cancer". *Cancer Biol Ther.* 3(3):338-9.
- 10 Gazdar AF, Kurvari V, Virmani A, Gollahon L, Sakaguchi M, Westerfield M, Kodagoda D, Stasny V, Cunningham HT, Wistuba II, Tomlinson G, Tonk V, Ashfaq R, Leitch AM, Minna JD, Shay JW. (1998) "Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer". *Int J Cancer.* 78(6):766-74.
- Gross S., Brandis A., et al. (1997). "Protein-A-mediated targeting of bacteriochlorophyll-IgG to *Staphylococcus aureus*: a model for enhanced site-specific photocytotoxicity". *Photochem Photobiol* 66(6): 872-8.
- 15 Gross S., Gilead A., Brandis A., Schreiber S., Machluf Y., Neeman M., Scherz A. and Salomon Y. (2003a) "Selective vascular and tumor responses of photodynamic therapy (PDT) with Pd bacteriopheophorbide (TOOKAD®): online and offline analyses", *Proceedings of the 94th annual meeting of the American association for cancer research (AACR), Toronto, April 5-9, 44: 27.*
- Gross S, Gilead A, Scherz A, Neeman M, Salomon Y. (2003b) Monitoring photodynamic therapy of solid tumors online by BOLD-contrast MRI. *Nat Med.* 9(10): 1327-31
- 20 Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. (1994) "Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast". *J Natl Cancer Inst.* 86(8):614-9.
- Guidi AJ, Schnitt SJ, Fischer L, Tognazzi K, Harris JR, Dvorak HF, Brown LF. (1997) "Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast". *Cancer.* 80(10): 1945-53.
- 25 Guinebretière JM, Lê Monique G, Gavaille A, Bahi J, Contesso G (1994) "Angiogenesis and risk of breast cancer in women with fibrocystic disease". *J Natl Cancer Inst.* 86(8):635-6.
- He, X., P. E. Brenchley, et al. (2004). "Hypoxia increases heparanase-dependent tumor cell invasion, which can be inhibited by antiheparanase antibodies". *Cancer Res* 64(11): 3928-33.
- 30 Hendey, B., M. Lawson, et al. (1996). "Intracellular calcium and calcineurin regulate neutrophil motility on vitronectin through a receptor identified by antibodies to integrins α v and β 3". *Blood* 87(5): 2038-48.
- Hofmann, B., A. Bogdanov, Jr., et al. (1999). "Mechanism of gadophrin-2 accumulation in tumor necrosis". *J Magn Reson Imaging* 9(2): 336-41.
- Holland R, Hendriks JH, Vebeek AL, Mravunac M, Schuurmans Stekhoven JH (1990) "Extent, distribution, and mammographic/histological correlations of breast ductal carcinoma in situ". *Lancet.* 335(8688):519-22.
- 35 Iyer, A. K., G. Khaled, et al. (2006). "Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting". *Drug Discov Today* 11(17-18): 812-8.
- Kamel, I. R., D. A. Bluemke, et al. (2003). "Role of diffusion-weighted imaging in estimating tumor necrosis after chemoembolization of hepatocellular carcinoma". *AJR Am J Roentgenol* 181(3): 708-10.
- 40 Kato, T., T. Kimura, et al. (1997). "Clinicopathologic study of angiogenesis in Japanese patients with breast cancer". *World J Surg* 21(1): 49-56.
- Kennan, R. P., B. E. Scanley, et al. (1997). "Physiologic basis for BOLD MR signal changes due to hypoxia/hyperoxia: separation of blood volume and magnetic susceptibility effects". *Magn Reson Med* 37(6): 953-6.
- Kepple J, Van Zee KJ, Dowlatshahi K, Henry-Tillman RS, Israel PZ, Klimberg VS. (2004) "Minimally invasive breast surgery". *J Am Coll Surg.* 199(6):961-75. Review
- 45 Kieran MW, Folkman J, Heymach J. (2003) "Angiogenesis inhibitors and hypoxia". *Nat Med.* 9(9): 1104; author reply 1104-5

- Koudinova, N. V., J. H. Pinthus, et al. (2003). "Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts". *Int J Cancer* 104(6): 782-9.
- 5 Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, Paulweber B, Haas J, Samonigg H. (2003) "A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk". *Int J Cancer*. 106(4):468-71.
- Lang, P., M. F. Wendland, et al. (1998). "Osteogenic sarcoma: noninvasive in vivo assessment of tumor necrosis with diffusion-weighted MR imaging". *Radiology* 206(1): 227-35.
- Lee, A. H., L. C. Happerfield, et al. (1997). "Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast". *J Clin Pathol* 50(8): 669-73.
- 10 Lee, K., R. A. Roth, et al. (2007). "Hypoxia, drug therapy and toxicity". *Pharmacol Ther* 113(2): 229-46.
- Lee, S. E., S. K. Hong, et al. (2007). "Prognostic significance of tumor necrosis in primary transitional cell carcinoma of upper urinary tract". *Jpn J Clin Oncol* 37(1): 49-55.
- Leek, R. D., R. J. Landers, et al. (1999). "Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast". *Br J Cancer* 79(5-6): 991-5.
- 15 Lehtio, K., O. Eskola, et al. (2004). "Imaging perfusion and hypoxia with PET to predict radiotherapy response in head-and-neck cancer". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59(4): 971-82.
- Lyons, S. K. (2005). "Advances in imaging mouse tumour models in vivo". *J Pathol* 205(2): 194-205.
- Maeda, H., J. Wu, et al. (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review". *J Control Release* 65(1-2): 271-84.
- 20 Maeshima, Y., P. C. Colorado, et al. (2000). "Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties". *J Biol Chem* 275(31): 23745-50.
- Marugan, J. J., C. Manthey, et al. (2005). "Design, synthesis, and biological evaluation of novel potent and selective alphavbeta3/alphavbeta5 integrin dual inhibitors with improved bioavailability. Selection of the molecular core". *J Med Chem* 48(4): 926-34.
- 25 Mazor, O., A. Brandis, et al. (2005). "WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution and vascular-targeted photodynamic activity using melanoma tumors as a model". *Photochem Photobiol* 81(2): 342-51.
- Metz, S., H. E. Daldrop-Unk, et al. (2003). "Detection and quantification of breast tumor necrosis with MR imaging: value of the necrosis-avid contrast agent Gadophrin-3". *Acad Radiol* 10(5): 484-90.
- 30 Minchinton, A. I. and I. F. Tannock (2006). "Drug penetration in solid tumours". *Nat Rev Cancer* 6(8): 583-92.
- Ni, Y., G. Bormans, et al. (2005). "Necrosis avid contrast agents: functional similarity versus structural diversity". *Invest Radiol* 40(8): 526-35.
- Nyberg, P., M. Ylipalosaari, et al. (2006). "Trypsins and their role in carcinoma growth". *Exp Cell Res* 312(8): 1219-28.
- 35 Patan S, Munn LL, Jain RK. (1996) "Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis". *Microvasc Res*. 51(2):260-72.
- Patterson, A. V., D. M. Ferry, et al. (2007). "Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104". *Clin Cancer Res* 13(13): 3922-32.
- 40 Plaks V, Kalchenko V, Dekel N, Neeman M. (2006) "MRI analysis of angiogenesis during mouse embryo implantation". *Magn Reson Med*. 55(5): 1013-22.
- Preise D., Mazor O., Koudinova N., Liscovitch M., Scherz A. and Salomon Y. (2003) "Bypass Of Tumor Drug Resistance By Antivascular Therapy", *Neoplasia* 5(6):475-80
- Rankin SC. (2000) "MRI of the breast". *Br J Radiol*. 73(872):806-18. Review.
- 45 Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. (1997) "Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis". *Cancer Res*. 57(5):963-9.

- Rosenbach-Belkin V, Chen L, Fiedor L, Tregub I, Paviotsky F, Brumfeld V, Salomon Y, Scherz A. (1996) "Serine conjugates of chlorophyll and bacteriochlorophyll: photocytotoxicity in vitro and tissue distribution in mice bearing melanoma tumors". *Photochem Photobiol.* 64(1):174-81.
- 5 Rubinstein, E., A. Brandis, et al. "Vascular-Targeted Photodynamic Therapy (VTP), Imaging (VTI) and localization of primary lesions and metastases by novel Bacteriochlorophyll (BCL)-RGD conjugates". In preparation.
- Sanders ME, Schuyler PA, Dupont WD, Page DL. (2005) "The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up". *Cancer.* 103(12):2481-4
- Schaffner, P. and M. M. Dard (2003). "Structure and function of RGD peptides involved in bone biology". *Cell Mol Life Sci* 60(1): 119-32.
- 10 Schneider BP, Miller KD. (2005) "Angiogenesis of breast cancer". *J Clin Oncol.* 23(8): 1782-90. Review
- Schreiber S., Gross S., Brandis A., Harmelin A., Rosenbach-Belkin V., Scherz A. and Salomon Y. (2002) "Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery", *Int. J. Cancer*, 99: 279-285.
- 15 Sengupta, S., C. M. Lohse, et al. (2005). "Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness". *Cancer* 104(3): 511-20.
- Shimizu K, Asai T, Oku N. (2005) "Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic approach". *Expert Opin Ther Targets.* 9(1):63-76.
- Shirakawa, K., H. Tsuda, et al. (2001). "Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer". *Cancer Res* 61(2): 445-51.
- 20 Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jager U, Wagner O, Schwarzingler I. (v) "Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas". *N Engl J Med.* 351(3):250-9.
- Tait, L. R., R. J. Pauley, et al. (2007). "Dynamic stromal-epithelial interactions during progression of MCF10DCIS.com xenografts". *Int J Cancer* 120(10): 2127-34.
- 25 Takagi, J. (2004). "Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins". *Biochem Soc Trans* 32(Pt3): 403-6.
- Tanaka, T., S. Shiramoto, et al. (2004). "Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME)". *Int J Pharm* 277(1-2): 39-61.
- Tannock, I. (1978). "Cell kinetics and chemotherapy: a critical review". *Cancer Treat Rep* 62(8): 1117-33.
- 30 Tannock, I. F. and D. Rotin (1989). "Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation". *Cancer Res* 49(16): 4373-84.
- Temming, K., R. M. Schiffelers, et al. (2005). "RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature". *Drug Resist Updat* 8(6): 381-402.
- Thorpe PE (2004) "Vascular targeting agents as cancer therapeutics". *Clin Cancer Res.* 10(2):415-27. Review.
- 35 Tomes, L., E. Emberley, et al. (2003). "Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma". *Breast Cancer Res Treat* 81(1): 61-9.
- Vaupel, P., D. K. Kelleher, et al. (2001). "Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy". *Semin Oncol* 28(2 Suppl 8): 29-35.
- Wapnir, I. L., N. Barnard, et al. (2001). "The inverse relationship between microvessel counts and tumor volume in breast cancer". *Breast J* 7(3): 184-8.
- 40 Weersink RA, Bogaards A, Gertner M, Davidson SR, Zhang K, Netchev G, Trachtenberg J, Wilson BC. (2005) "Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: clinical experience and practicalities". *J Photochem Photobiol B.* 79(3):211-22.
- Weinmann, M., C. Belka, et al. (2004). "Tumour hypoxia: impact on biology, prognosis and treatment of solid malignant tumours". *Onkologie* 27(1): 83-90.
- 45 Yang, M., E. Baranov, et al. (2000). "Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1206-11.
- Zilberstein J., Bromberg A., Frantz A., Rosenbach-Belkin V., Kritzmann A., Pfefermann R., Salomon Y. and Scherz A.

(1997) "Light-dependent oxygen consumption in bacteriochlorophyll-serine-treated melanoma tumors: on-line determination using a tissue-inserted oxygen microsensor", Photochem Photobiol., 65(6): 1012-1019.

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

Listado de secuencias

<110> Yeda Research and Development Co.Ltd Scherz, AVIGDOR Salomon, YORAM Goldshaid, Liat

10 <120> CONJUGADOS DE RGD-(BACTERIO)CLOROFILA PARA USO EN EL DIAGNÓSTICO DE TUMORES QUE COMPRENDEN DOMINIOS NECRÓTICOS

<130> STEBA-011 PCT

<150> 61/064,298
<151> 27-02-2008

15 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> sintético

<220>
<221> Cíclico
<222> (1)..(5)

30 <220>
<221> ÁCIDO D-AMINO
<222> (4)..(4)

35 <400> 1
Arg Gly Asp Phe Lys
1 5

40 <210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> sintético

<220>
<221> Cíclico
<222> (1)..(4)

50 <220>
<221> D-aminoácido
<222> (3)..(3)

55 <400> 2
Arg Ala Phe Lys
1

<210> 3
<211> 4
<212> PRT

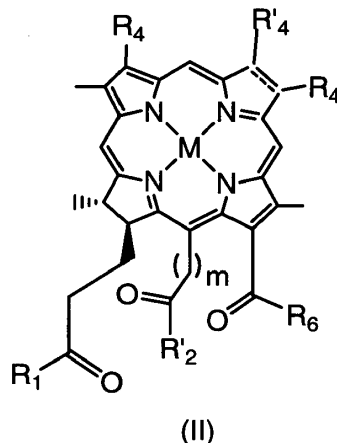
<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 5
 <220>
 <221> Cíclico
 <222> (1)..(4)
 10 <400> 3
 Arg Gly Asp Lys
 1
 <210> 4
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 20
 <220>
 <221> CÍCLICO
 <222> (1)..(5)
 25 <220>
 <221> METILAMIDA
 <222> (4)..(4)
 30 <220>
 <221> D-Aminoácido
 <222> (4)..(4)
 <400> 4
 Arg Gly Asp Phe Lys
 1 5
 35 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221> CÍCLICO
 <222> (1)..(5)
 45 <220>
 <221> ÁCIDO D-AMINO
 <222> (4)..(4)
 50 <400> 5
 Arg Gly Asp Tyr Lys
 1 5
 55 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> sintético
 <220>

ES 2 764 781 T3

<221> Lineal
 <222> (1)..(6)
 <400> 6
 5 Gly Arg Gly Asp Ser Pro
 1 5
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 15 <220>
 <221> Lineal
 <222> (1)..(7)
 <400> 7
 20 Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
 1 5
 <210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 30 <220>
 <221> Lineal
 <222> (1)..(25)
 <400> 8
 Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
 20 25
 35
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 45 <220>
 <221> CÍCLICO
 <222> (1)..(9)
 <223> enlace disulfuro Cys 1 - Cys9
 50 <220>
 <221> CÍCLICO
 <222> (3)..(7)
 <223> enlace disulfuro Cys 3 - Cys7
 55 <400> 9
 Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila para uso en el diagnóstico de tumores que comprenden dominios necróticos, en donde dicho conjugado es una clorofila o una bacterioclorofila de fórmula II:



5

en donde

M representa 2H o un átomo seleccionado a partir del grupo que consiste en Mg, Pd, Pt, Co, Ni, Sn, Cu, Zn, Mn, In, Eu, Fe, Au, Al, Gd, Dy, Er, Yb, Lu, Ga, Y, Rh, Ru, Si, Ge, Cr, Mo, P, Re, Tc y Tl e isótopos y radioisótopos de los mismos;

10 R_1 , R'_2 y R_6 son cada uno independientemente Y- R_8 , - $NR_9R'_9$ o - $N^+R_9R'_9R''_9A^-$; o R_1 y R_6 juntos forman un anillo que comprende un residuo de péptido RGD o de peptidomimético de RGD;

Y es O o S;

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

R'_4 es metilo o formilo;

R_8 , R_9 , R'_9 y R''_9 cada uno es independientemente:

20 (a) H;

(b) hidrocarbilo C_1-C_{25} ;

25 (c) hidrocarbilo C_1-C_{25} sustituido por uno o varios grupos funcionales seleccionados a partir del grupo que consiste en halógeno, nitro, oxo, OR, SR, epoxi, epitio, -CONRR', -COR, COOR, -OSO₃R, -SO₃R, -SO₂R, -NHSO₂R, -SO₂NRR', -NRR', =N-OR, =N-NRR', -C(=NR)-NRR', -NR-NRR', -(R)N-C(=NR)-NRR', O←NR-, >C=NR, -(CH₂)_n-NR-COR', -(CH₂)_n-CO-NRR', -O-(CH₂)_n-OR, -O-(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-R, -PRR', -OPO₃RR', -PO₂HR y -PO₃RR', en donde R y R' son cada uno independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo, R' puede ser además un residuo de un péptido RGD o de un peptidomimético de RGD, o R y R' junto con el átomo de N al que están fijados forman un anillo saturado de 5-7 miembros que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado a partir de O, S y N, en donde el átomo de N adicional puede estar

30 sustituido, y R'' es H, un catión, hidrocarbilo o heterociclilo;

(d) hidrocarbilo C_1-C_{25} sustituido por uno o varios grupos funcionales seleccionados a partir del grupo que consiste en grupos cargados positivamente, grupos cargados negativamente, grupos básicos que se convierten en grupos cargados positivamente en condiciones fisiológicas y grupos ácidos que se convierten en grupos cargados negativamente en condiciones fisiológicas;

35 (e) hidrocarbilo C_1-C_{25} que contiene uno o varios heteroátomos y/o uno o varios restos carbocíclicos o heterocíclicos;

(f) hidrocarbilo C_1-C_{25} que contiene uno o varios heteroátomos y/o uno o varios restos carbocíclicos o heterocíclicos y está sustituido por uno o varios grupos funcionales tal y como se ha definido en (c) y (d) anteriormente;

(g) hidrocarbilo C₁-C₂₅ sustituido por un residuo de un aminoácido, un péptido RGD, una proteína, un monosacárido, un oligosacárido, un polisacárido o un ligando polidentado y su complejo quelante con metales; o

5 (h) un residuo de un aminoácido, un péptido, preferiblemente un péptido RGD o un peptidomimético de RGD, una proteína, un monosacárido, un oligosacárido, un polisacárido o un ligando polidentado y su complejo quelante con metales;

R₈ puede ser además H⁺ o un catión R⁺₁₀ cuando R₁, R'₂ y R₆ cada uno es independientemente Y-R₈;

R⁺₁₀ es un metal, un grupo amonio o un catión orgánico;

A⁻ es un anión fisiológicamente aceptable;

10 m es 0 o 1;

la línea punteada en las posiciones 7-8 representa un doble enlace opcional; y

sales farmacéuticamente aceptables e isómeros ópticos de los mismos;

y dicho derivado de clorofila o bacterioclorofila de fórmula II contiene al menos un residuo de péptido que contiene RGD.

15 2. El conjugado para uso según la reivindicación 1, en el que: (i) cualquiera de los hidrocarbilo C₁-C₂₅ es un alquilo, alqueno o alquino C₁-C₂₅, preferiblemente C₁-C₁₀, más preferiblemente C₂-C₃; (ii) M es 2H o un metal seleccionado a partir de Pd, Mn o Cu; y (iii) cada R₄, independientemente, es un radical acetilo, vinilo, etilo o 1-hidroxietilo o un éter o éster de dicho radical 1-hidroxietilo; preferiblemente R₄ en la posición 3 es acetilo, R₄ en la posición 8 es etilo, R'₄ es metilo y el fotosensibilizador es una bacterioclorofila de fórmula II en la que las posiciones 7-8 están

20 hidrogenadas y contiene al menos un grupo seleccionado a partir de:

(a) un grupo cargado negativamente seleccionado a partir de COO⁻, COS⁻, SO₃⁻ o PO₃²⁻;

(b) un grupo ácido que se convierte en un grupo cargado negativamente a pH fisiológico, seleccionado a partir de COOH, COSH, SO₃H o PO₃H₂ o una sal de los mismos;

25 (c) un grupo onio seleccionado a partir de -O⁺(RR'), -S⁺(RR'), -Se⁺(RR'), -Te⁺(RR'), -P⁺(RR'R''), -As⁺(RR'R''), -Sb⁺(RR'R'') y -Bi⁺(RR'R''), en donde R, R' y R'' son cada uno independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo;

(d) un grupo cargado positivamente, preferiblemente un grupo final o un grupo situado dentro de una cadena de alquilo, seleccionado a partir de un catión obtenido a partir de un grupo que contiene N seleccionado a partir de un grupo -N⁺(RR'R''), -(R)N-N⁺(RR'R''), O←N⁺(RR'R''), >C=N⁺(RR'), -C(=NR)-N⁺RR'R'' o -(R)N-C(=NR)-N⁺RR'R'', preferiblemente N⁺(RR'R''), o un catión obtenido a partir de un compuesto heteroaromático que

30 contiene uno o varios átomos de N y opcionalmente átomos de O o S tal como pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridinio, quinolinio, isoquinolinio, pirimidinio, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo o purinio; o

(e) un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas, dicho grupo básico es un grupo final o un grupo situado dentro de una cadena de alquilo, seleccionado a partir de un grupo -NRR', -C(=NR)-NR'R'', -NR-NR'R'', -(R)N-C(=NR)-NR'R'', O←NRR'- o >C=NR, o el grupo básico es un radical heteroaromático que contiene N seleccionado a partir de pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirimidilo, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo o purinilo,

35

en donde R, R' y R'' cada uno es independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo, o dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N al que están fijados forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que contiene opcionalmente uno o

40 varios heteroátomos seleccionado a partir de O, S o N, y además está opcionalmente sustituido en el átomo de N adicional.

3. El conjugado para uso según la reivindicación 2, en donde el fotosensibilizador es una bacterioclorofila de fórmula II en donde R₆ es -NR₉R'₉, R₉ es H y R'₉ se selecciona a partir de: (i) alquilo C₁-C₁₀ sustituido por SO₃H o una sal alcalina del mismo; o (ii) alquilo C₁-C₆ sustituido por un grupo básico -NRR' o -NH-(CH₂)₂₋₆-NRR', en donde cada uno de R y R' independientemente es H, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido por NH₂ o R y R' junto con el átomo de N

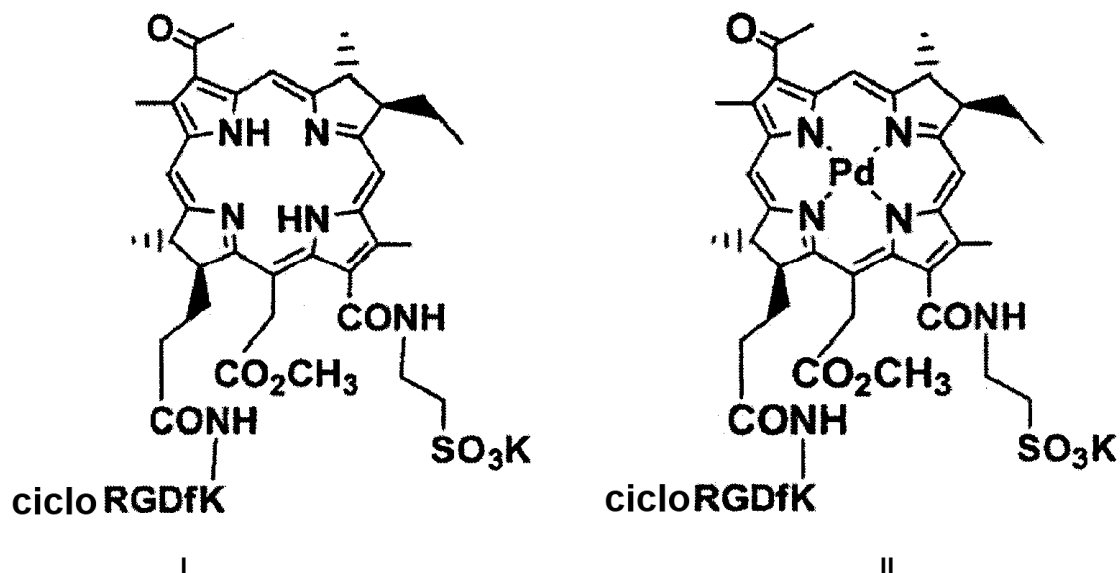
45 forman un anillo saturado de 5-6 miembros, que contiene opcionalmente un átomo de O o N y además está opcionalmente sustituido en el átomo de N adicional por -(CH₂)₂₋₆-NH₂.

4. El conjugado para uso según la reivindicación 3, en donde R₆ es (i) -NH-(CH₂)₂-SO₃K o -NH-(CH₂)₃-SO₃K; o (ii) -NH-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₃-NH₂, -NH-(CH₂)₂-1-morfolino o -NH-(CH₂)₃-piperazino-(CH₂)₃-NH₂.

5. El conjugado para uso según la reivindicación 1, en donde el fotosensibilizador es una bacterioclorofila de fórmula II y R₁ y R₆ juntos forman un anillo cíclico que comprende un péptido RGD o un peptidomimético de RGD.

50

6. El conjugado para uso según la reivindicación 5, en donde el péptido que contiene RGD es un péptido todo L, todo D o L,D lineal o cíclico compuesto por 4-100, preferiblemente 5-50, 5-30, 5-20, más preferiblemente, 5-10 aminoácidos naturales, naturales modificados o no naturales, en donde los aminoácidos naturales se seleccionan a partir de Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, His, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val, y la modificación de dichos aminoácidos naturales modificados o no naturales incluye una modificación D, una alquilación o una acilación del grupo amino terminal o del grupo amino libre de lisina, una esterificación o una amidación del grupo carboxilo terminal o del grupo carboxilo libre de ácido aspártico o glutámico, y una eterificación o una esterificación del grupo hidroxilo libre de serina o tirosina.
7. El conjugado para uso según la reivindicación 6, en donde el péptido que contiene RGD es un péptido cíclico seleccionado a partir de c(RGDfK) (SEQ ID NO: 1), en donde f indica D-Phe, c(RGDK) (SEQ ID NO: 3), c(RGDf-n(Me)K) (SEQ ID NO: 4), c(RGDyK) (SEQ ID NO: 5), en donde y es D-Tyr o CDCRGDCGC (SEQ ID NO: 9), preferiblemente el pentapéptido c(RGDfK), o el péptido que contiene RGD es un péptido lineal seleccionado a partir del hexapéptido GRGDSP (SEQ ID NO: 6), el heptapéptido GRGDSPK (SEQ ID NO: 7) o el péptido de 25 unidades (GRGDSP)₄K (SEQ ID NO: 8).
8. El conjugado para uso según la reivindicación 7, en donde el conjugado se selecciona a partir del compuesto **13**, en esta memoria también indicado como c(RGDfK)-2H-MLT (I) y el compuesto **24**, en esta memoria también indicado como c(RGDfK)-Pd-MLT (II), con las fórmulas:



9. El conjugado para uso en el diagnóstico de un tumor que comprende dominios necróticos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el diagnóstico es mediante una formación de imágenes con fluorescencia dinámica, mediante una técnica de radiodiagnóstico o mediante una formación de imágenes por resonancia magnética molecular (MRI).
10. El conjugado para uso según la reivindicación 9, en donde
- (i) el conjugado es para uso en diagnóstico mediante formación de imágenes con fluorescencia dinámica, M es 2H o un metal seleccionado a partir de Pd y Zn y el sujeto se tiene que iluminar y la fluorescencia se tiene que medir en las áreas sospechosas durante al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado a intervalos de tiempo de 1-8 horas, en donde las áreas que muestran fluorescencia desde 24-48 horas o durante más tiempo, indican la presencia de un dominio necrótico tumoral,
- (ii) el conjugado es para uso en una técnica de radiodiagnóstico y M es un radioisótopo seleccionado a partir del grupo de ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, ¹⁹⁵Pt, ⁶⁰Co, ¹¹¹In y ⁵¹Cr, y el sujeto debe ser escaneado en un escáner con formación de imágenes durante al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado a intervalos de tiempo de 1-8 horas, y el nivel de radiación del área sospechosa se tiene que medir, en donde las áreas que muestran radiación después de 24-48 horas o durante más tiempo, indican la presencia de un dominio necrótico tumoral, o
- (iii) el conjugado es para uso en la formación de imágenes por resonancia magnética molecular (MRI) y M es un metal paramagnético seleccionado a partir de Mn³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺ o Dy³⁺ y el paciente se tiene que someter a una formación de imágenes por resonancia magnética generando al menos una imagen por resonancia magnética de la región diana de interés dentro del cuerpo del paciente antes de la administración del conjugado y una o varias imágenes por resonancia magnética en un segundo momento o más puntos de

tiempo al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado y los datos se procesan y se analizan para diagnosticar la presencia o ausencia de un dominio necrótico tumoral.

- 5 11. El conjugado para uso según la reivindicación 10, en donde el tumor es un tumor primario o un tumor metastásico con dominios necróticos, tal como un melanoma, tumores de próstata, cerebro, colon, ovario, mama, colorrectal, cabeza y cuello, pared torácica del cáncer de mama y cánceres y tumores de piel, pulmón, esófago y vejiga.
12. El conjugado para uso según la reivindicación 11, en donde el tumor es un cáncer de mama localizado, particularmente carcinoma ductal in situ (DCIS).
- 10 13. El conjugado según la reivindicación 8 para uso según la reivindicación 10, en donde el diagnóstico es mediante la formación de imágenes con fluorescencia dinámica, el tumor es un tumor mamario u ovárico, y los dominios necróticos se visualizan 3 a 8 días después de la administración del conjugado.
- 15 14. El conjugado para uso según la reivindicación 10, en donde el diagnóstico mediante una técnica de radiodiagnóstico se selecciona a partir de tomografía por emisión de positrones (PET) y M es ^{64}Cu o ^{67}Cu , o tomografía por emisión de fotón único (SPET) y M es un radioisótopo seleccionado a partir de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{195}Pt , ^{111}In , ^{51}Cr y ^{60}Co .
15. Un método para visualizar un tumor con dominios necróticos
- (i) mediante la formación de imágenes con fluorescencia dinámica en donde dicho método comprende
- 20 (a) administrar un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila de fórmula II tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde M es ^2H o un metal seleccionado a partir de Pd y Zn, a un sujeto sospechoso de tener un tumor con dominios necróticos, e
- (b) iluminar al sujeto y medir la fluorescencia de las áreas sospechosas durante al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado a intervalos de tiempo de 1-8 horas, o
- (ii) mediante una técnica de radiodiagnóstico en donde dicho método comprende
- 25 (a) administrar un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila de fórmula II tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde M es un radioisótopo seleccionado a partir de ^{64}Cu , ^{67}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{201}Tl , ^{195}Pt , ^{60}Co , ^{111}In o ^{51}Cr a un sujeto sospechoso de tener un tumor con dominios necróticos, y
- 30 (b) escanear al sujeto en un escáner con formación de imágenes durante al menos 24-48 horas después de la administración del conjugado a intervalos de tiempo de 1-8 horas, y medir el nivel de radiación de las áreas sospechosas, o
- (iii) mediante formación de imágenes por resonancia magnética molecular (MRI) en donde dicho método comprende
- 35 (a) administrar un conjugado de un péptido que contiene RGD o un peptidomimético de RGD y un fotosensibilizador de clorofila o bacterioclorofila de fórmula II tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde M es un metal paramagnético seleccionado a partir de Mn^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} o Dy^{3+} a un sujeto sospechoso de tener un tumor con dominios necróticos, y
- 40 (b) someter al paciente a MRI generando al menos una imagen de MR de la región diana de interés dentro del cuerpo del paciente antes de dicha administración (tiempo cero) y una o varias imágenes de MR en un segundo momento o más puntos de tiempo al menos 24-48 horas, preferiblemente 96 horas después de dicha administración.
16. El método según la reivindicación 15, en donde el conjugado es el compuesto **13** o el compuesto **24** de las fórmulas identificadas en la reivindicación 8.
- 45 17. El método según la reivindicación 15 o 16, en donde el tumor es un tumor primario o un tumor metastásico con dominios necróticos, tal como un melanoma, tumores de próstata, cerebro, colon, ovario, mama, colorrectal, cabeza y cuello, pared torácica provenientes de un cáncer de mama, cánceres y tumores de piel, pulmón, esófago y vejiga.
18. Método según la reivindicación 17, en donde el tumor es cáncer de mama localizado, particularmente carcinoma ductal in situ (DCIS).

Fig. 1A

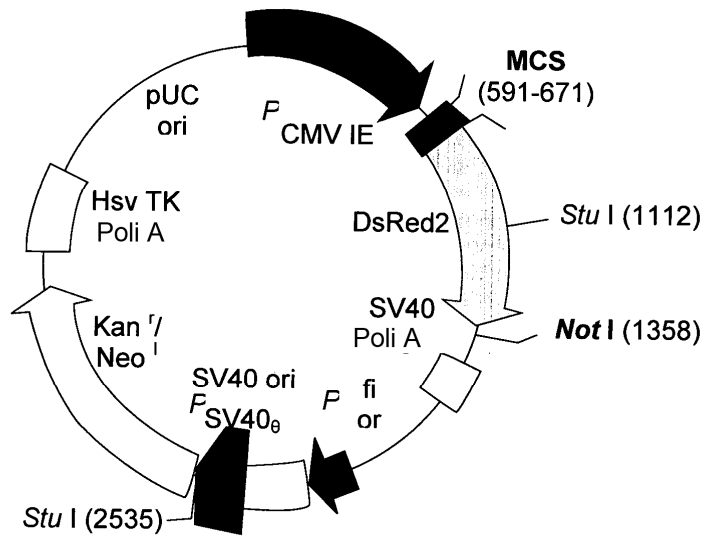


Fig. 1B

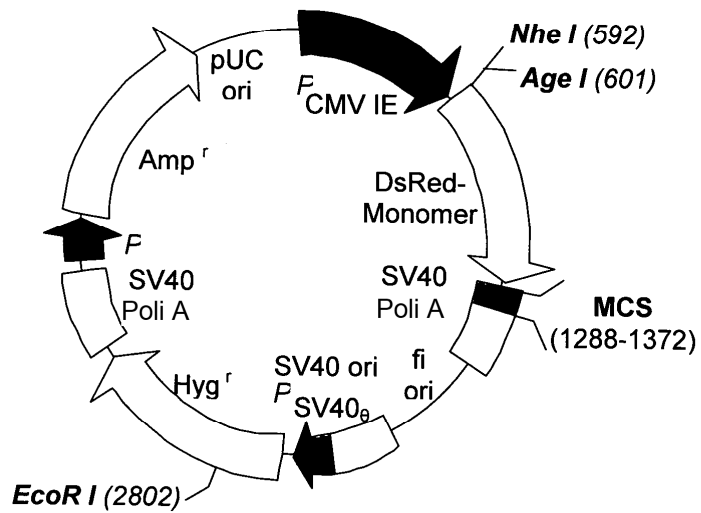


Fig. 1C

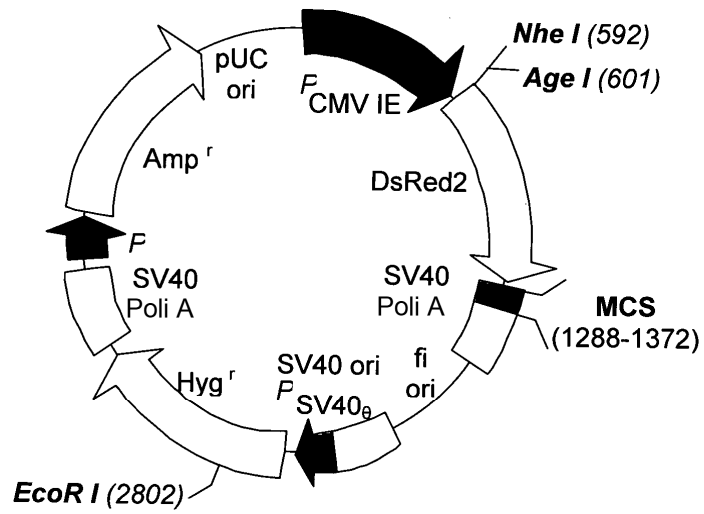


Fig. 2A



Fig. 2B

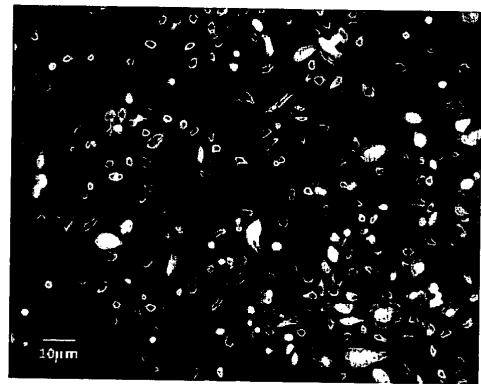


Fig. 3A

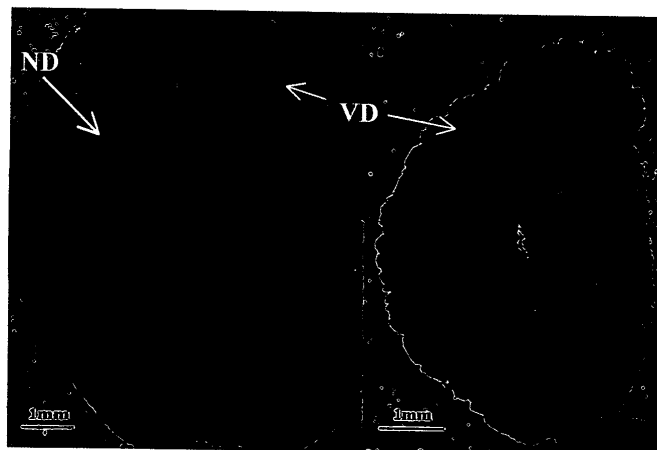
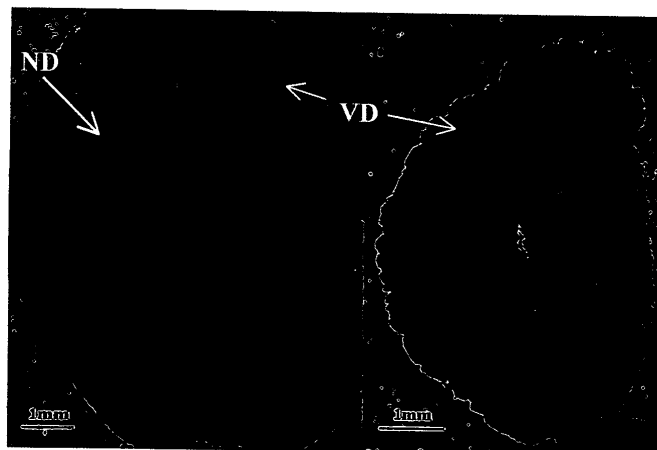


Fig. 3B



Tiempo después de
la inyección de
fármaco

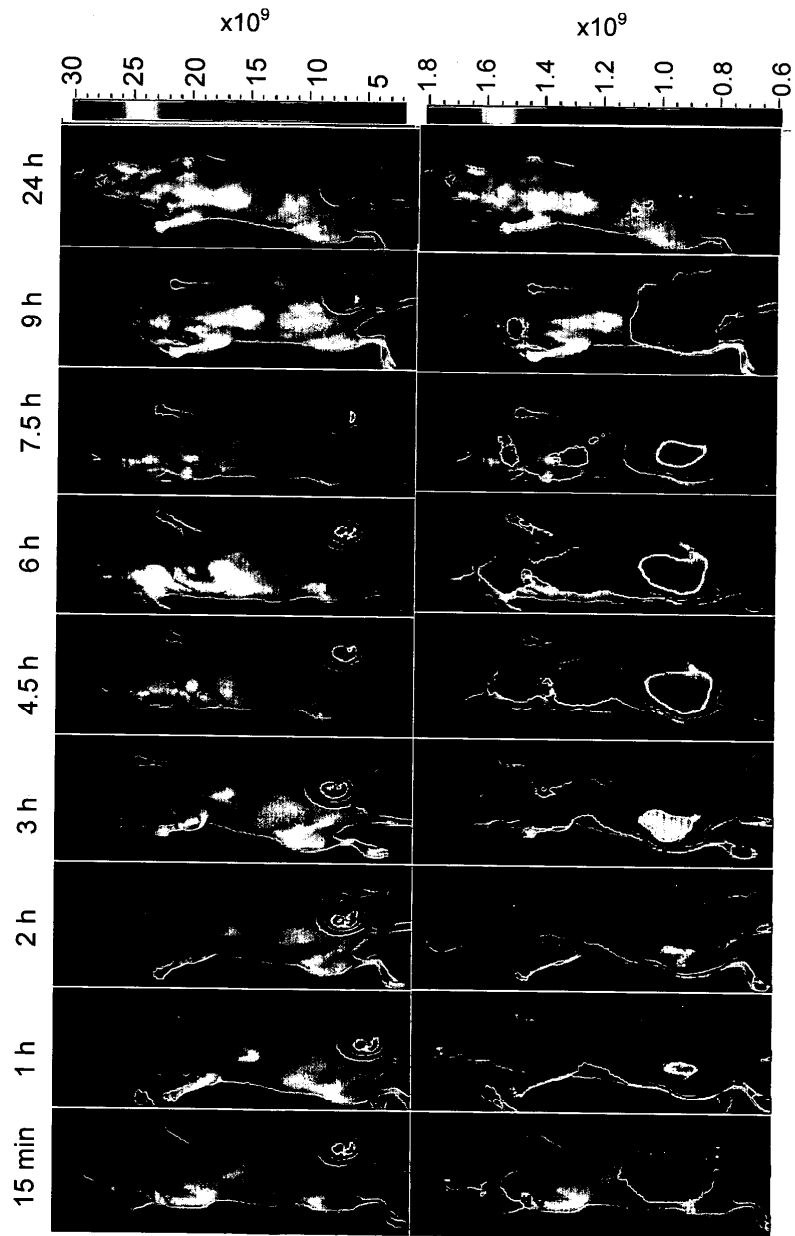


Fig. 4A

Fig. 4B

Tiempo después de
la inyección de
fármaco

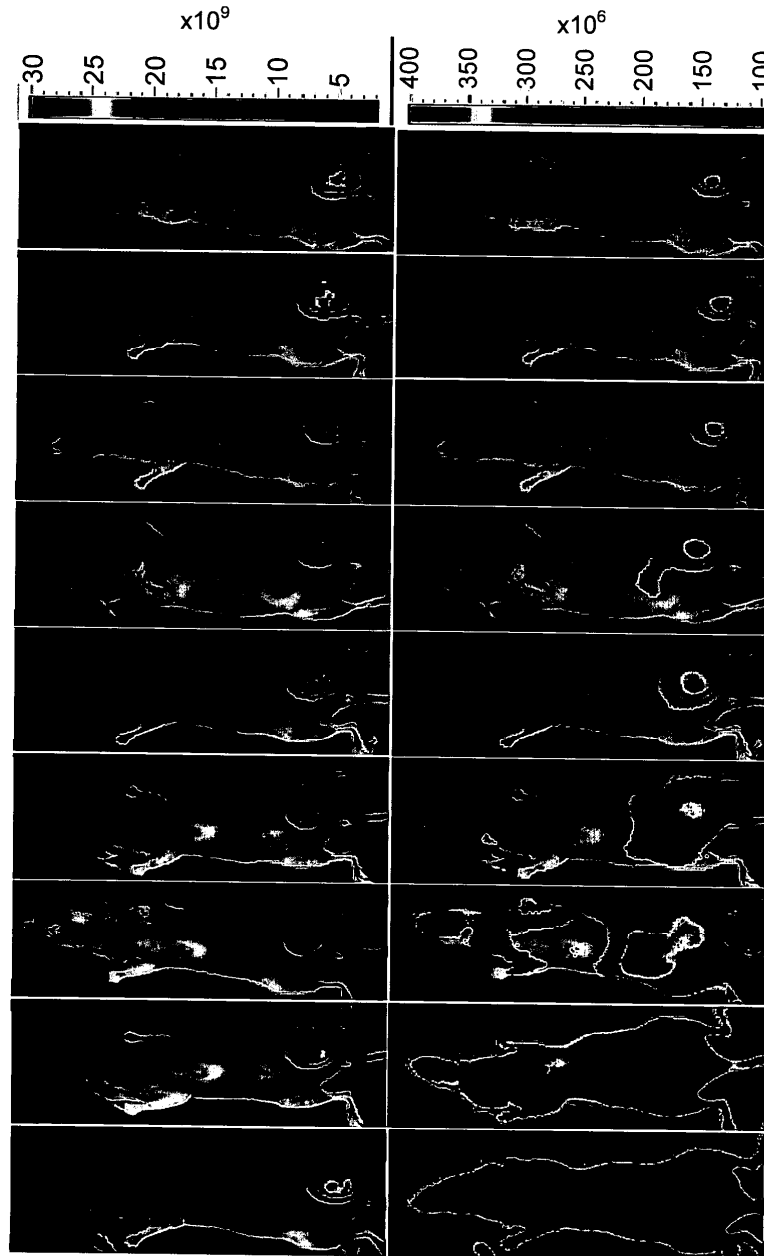
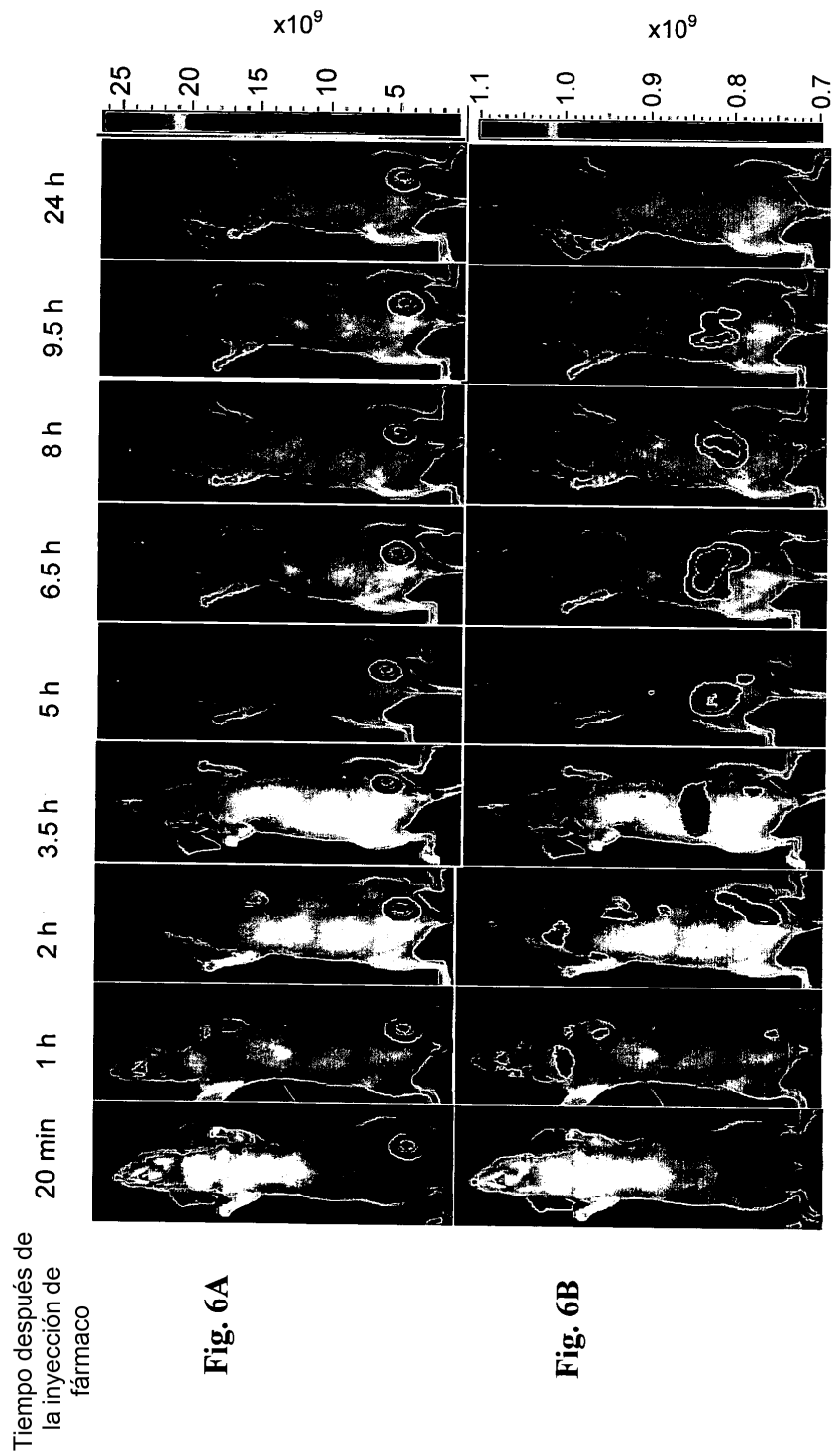


Fig. 5A

Fig. 5B



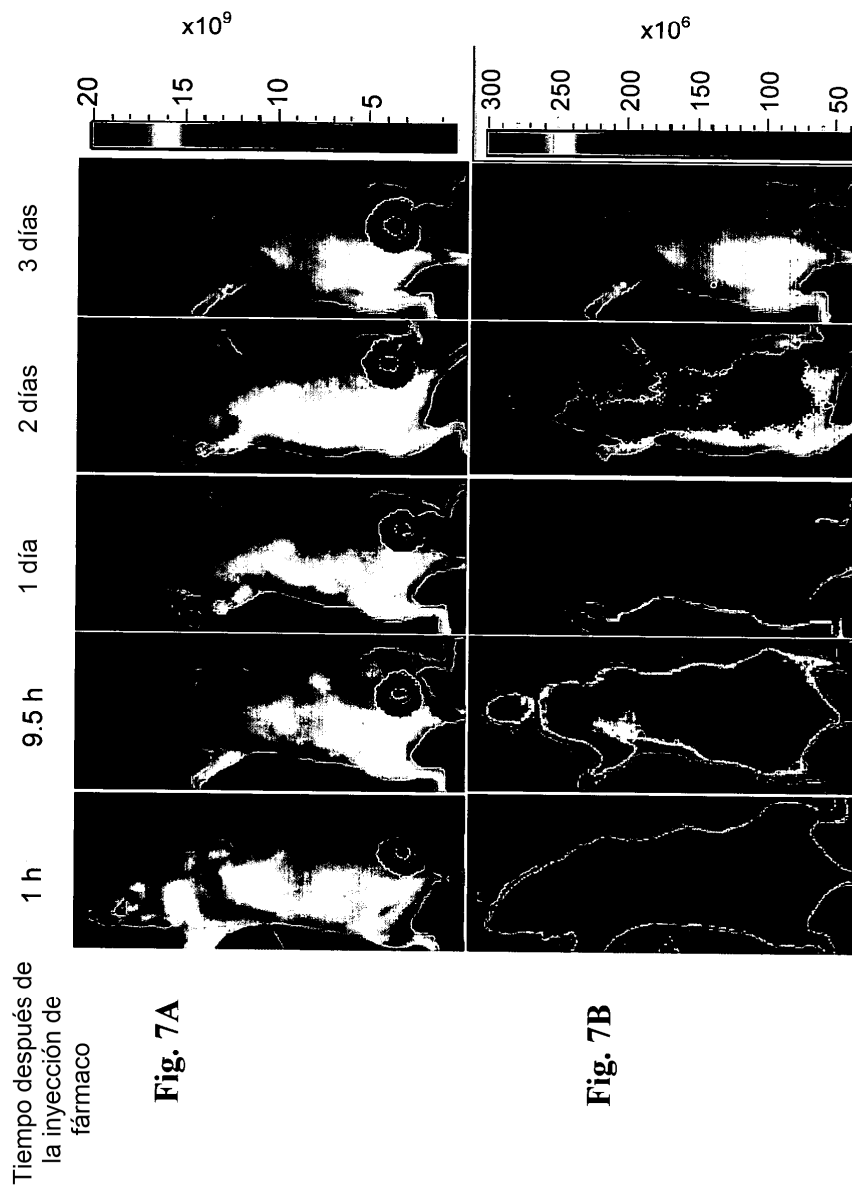
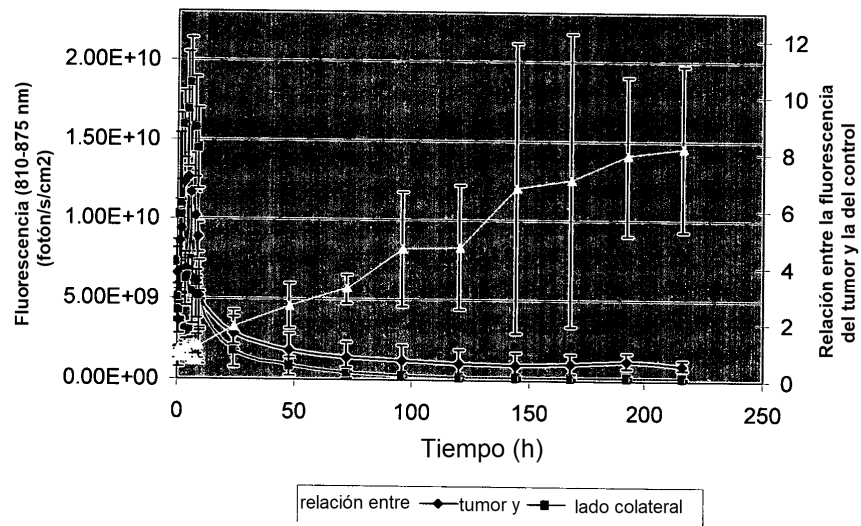
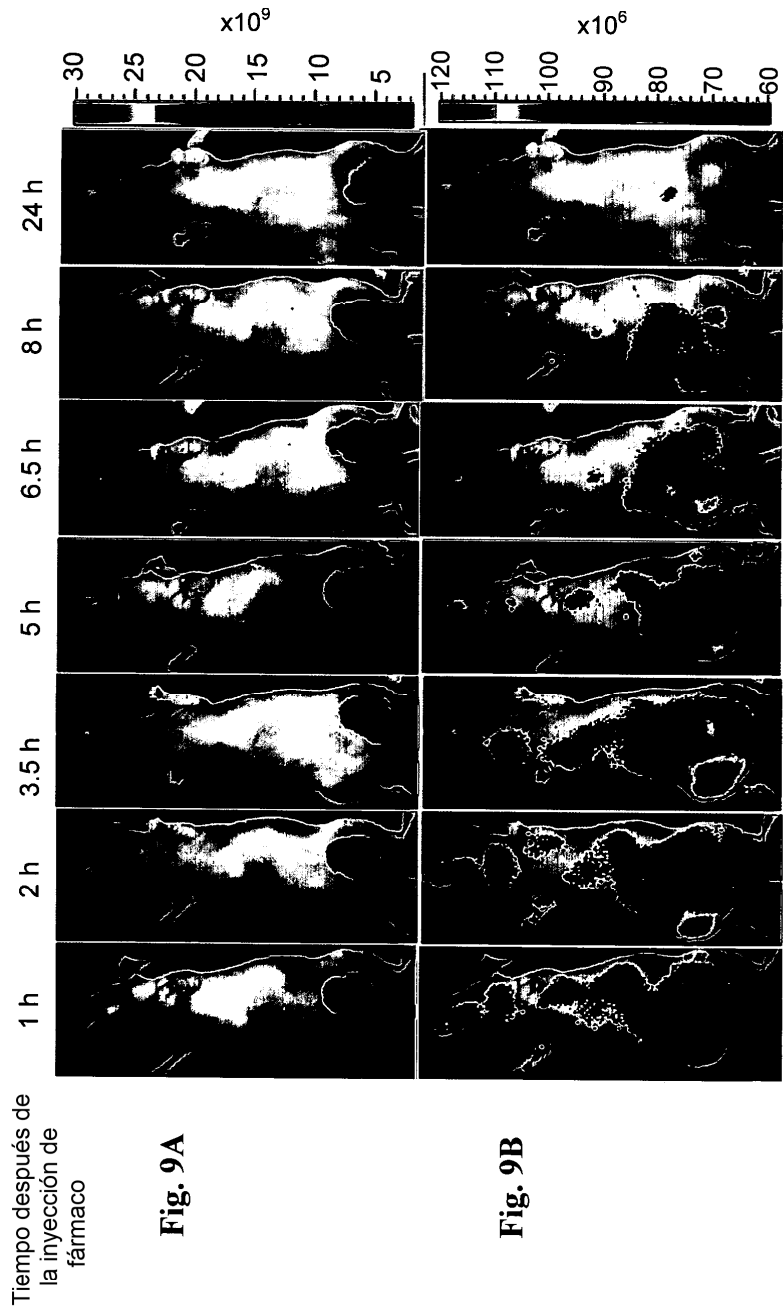
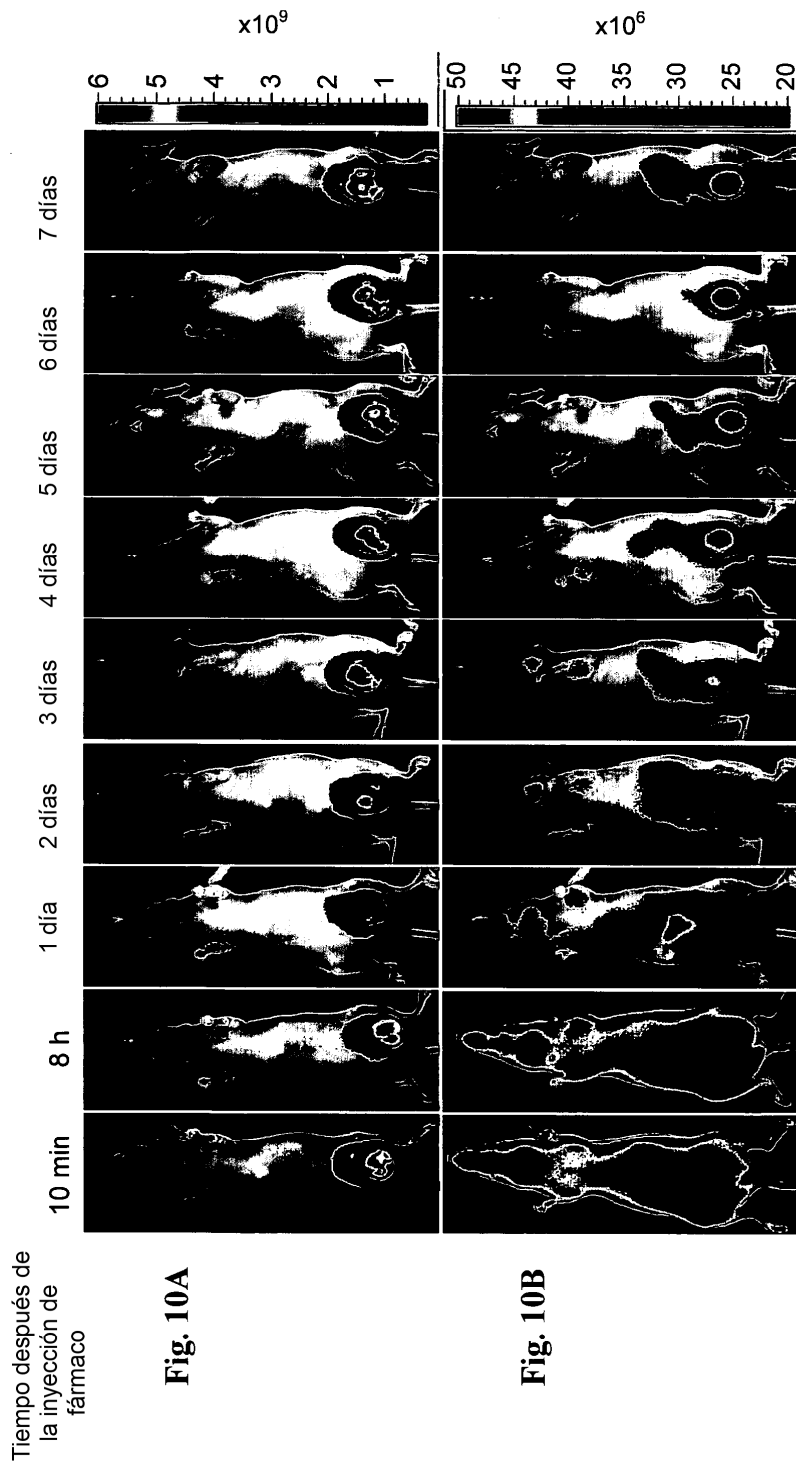


Fig. 8







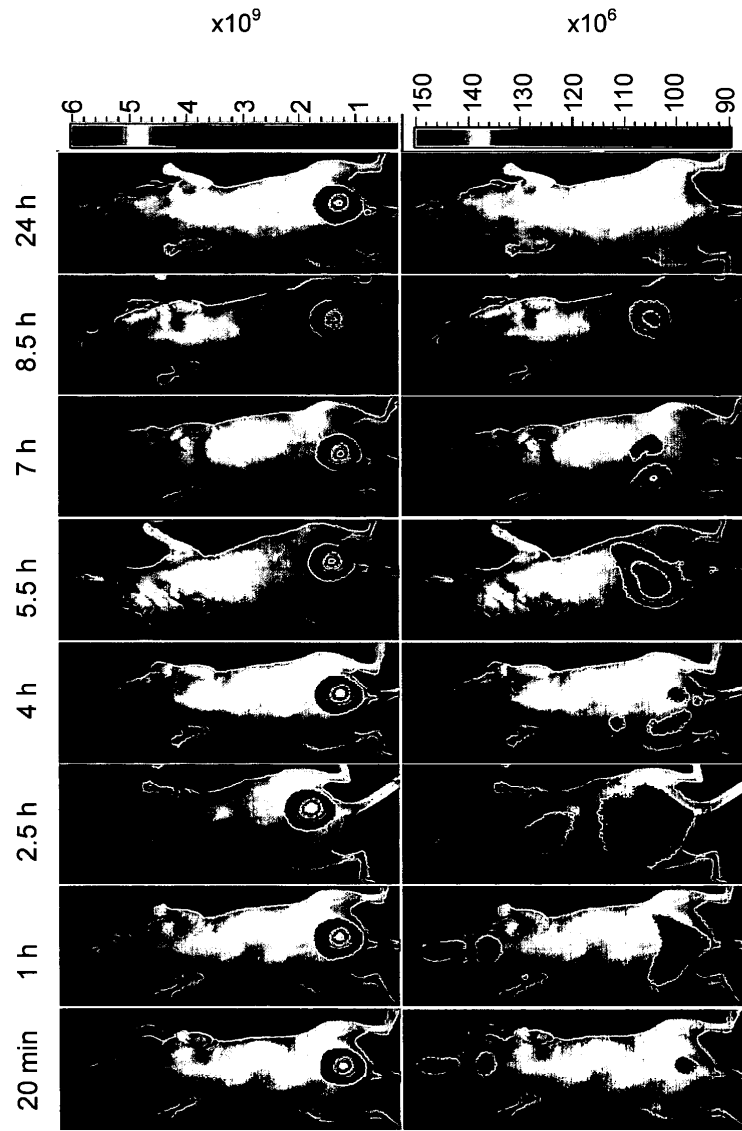


Fig. 11A

Fig. 11B

Tiempo después de
la inyección de
fármaco

Tiempo después de
la inyección de
fármaco

1 h

8.5 h

1 día

2 días

Fig. 12A

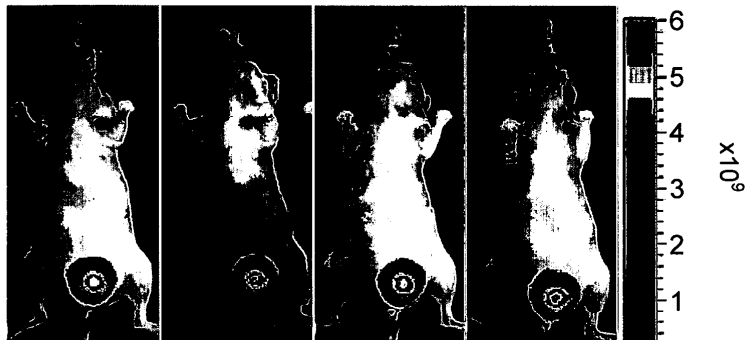
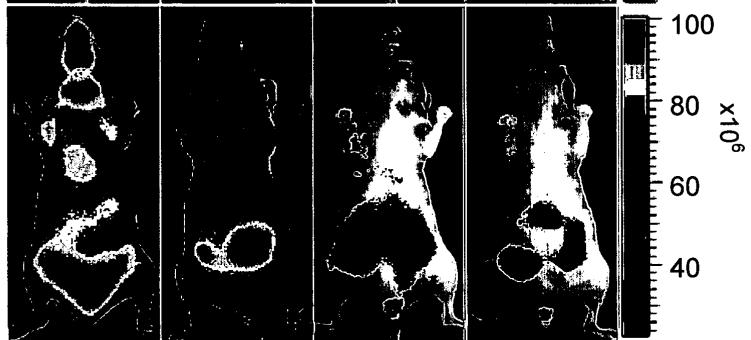
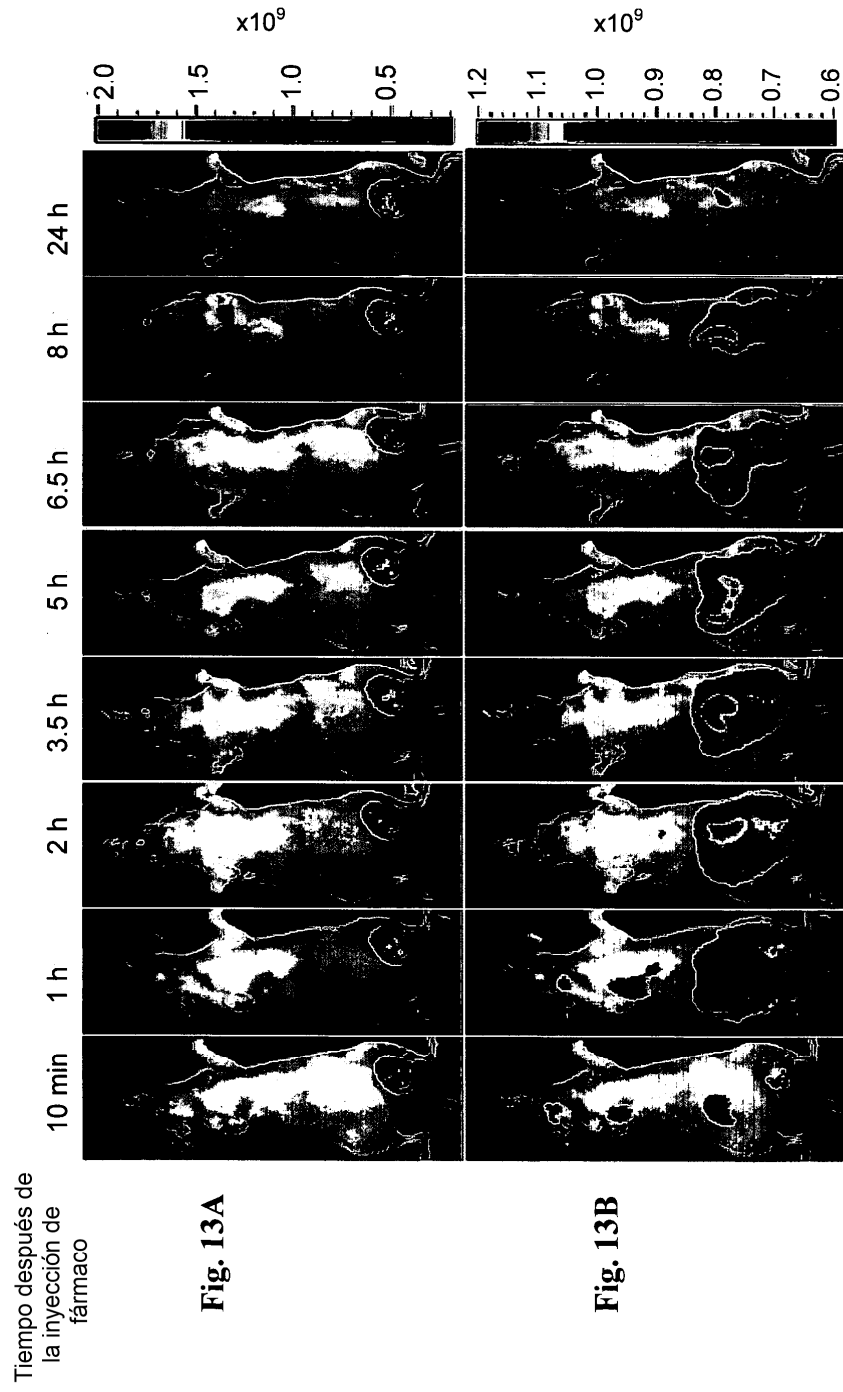


Fig. 12B





Tiempo después de
la inyección de
fármaco

1 h 9 h 1 día 2 días 3 días 4 días

Fig. 14A

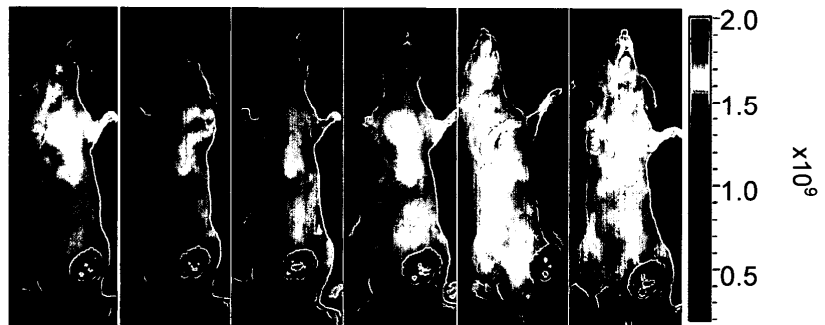
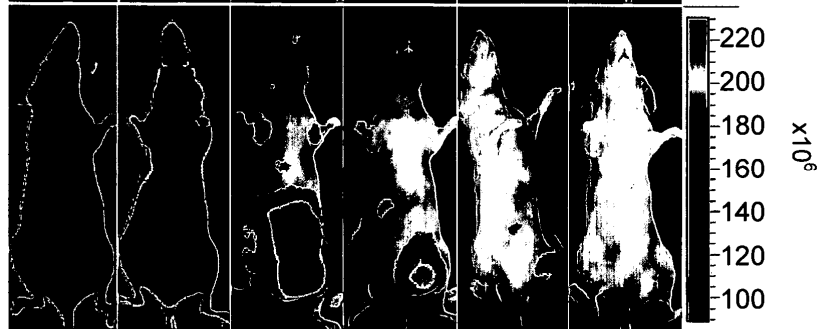
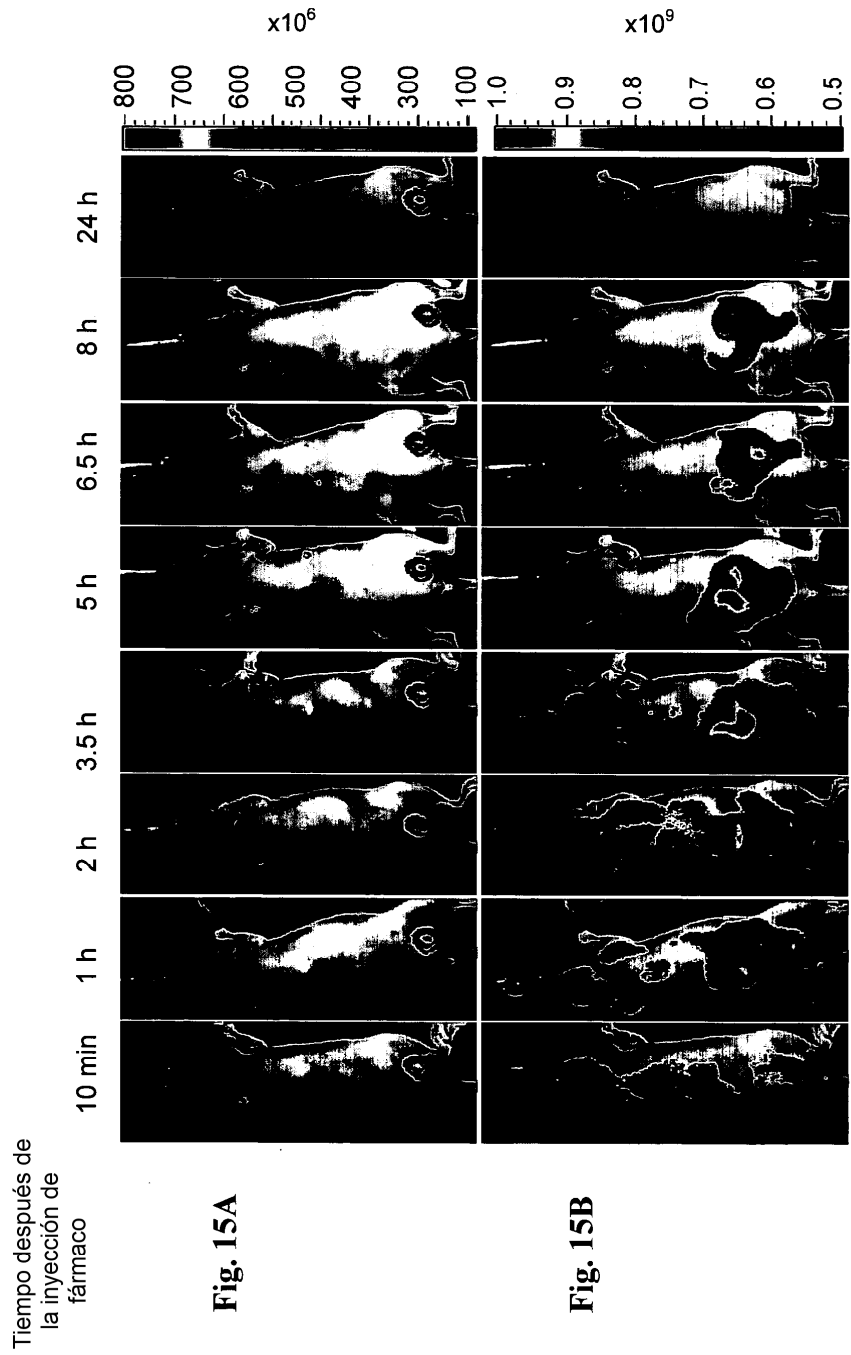


Fig. 14B





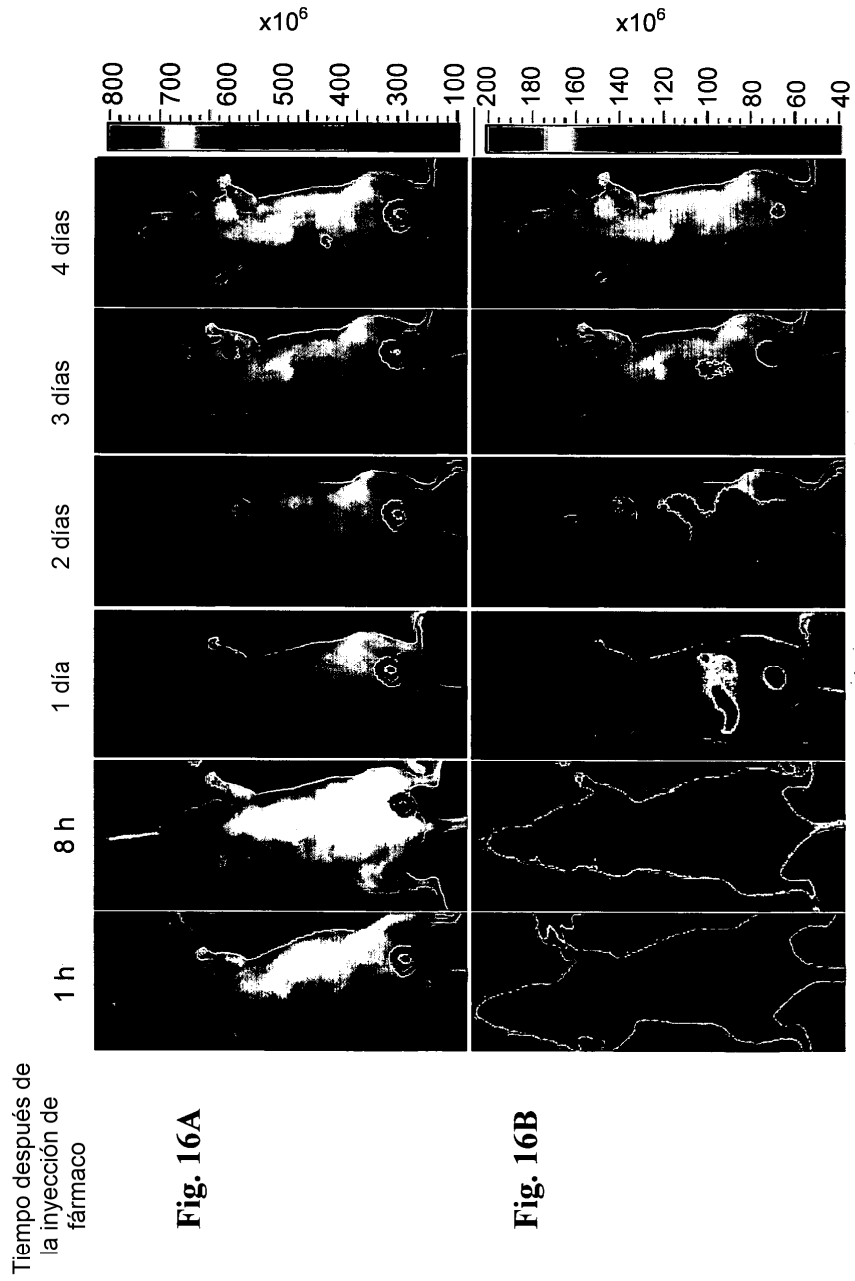


Fig. 17B

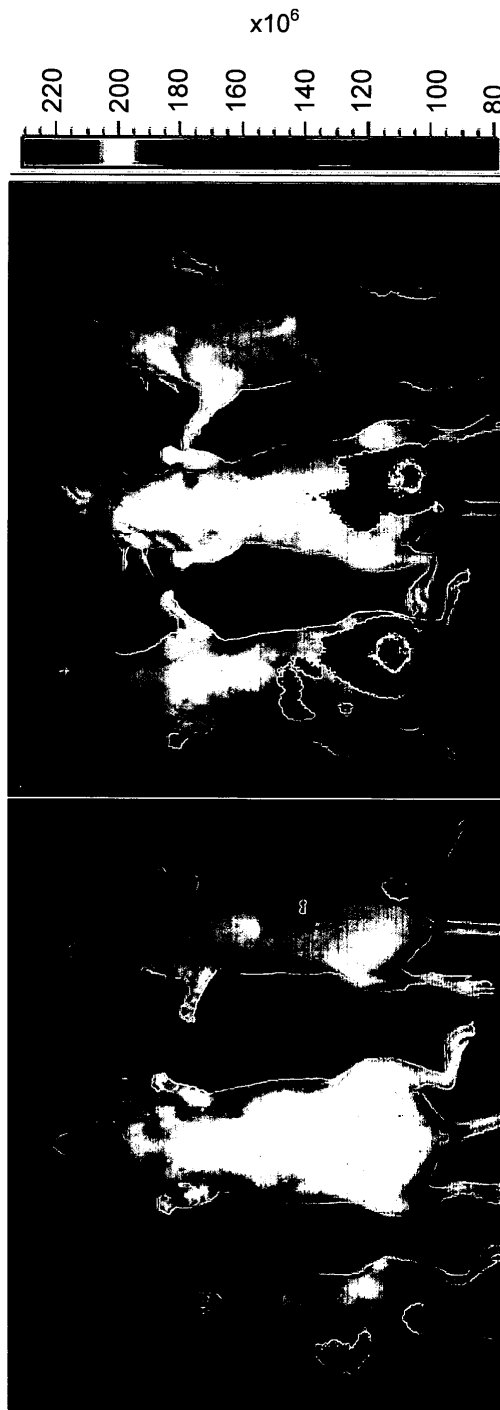
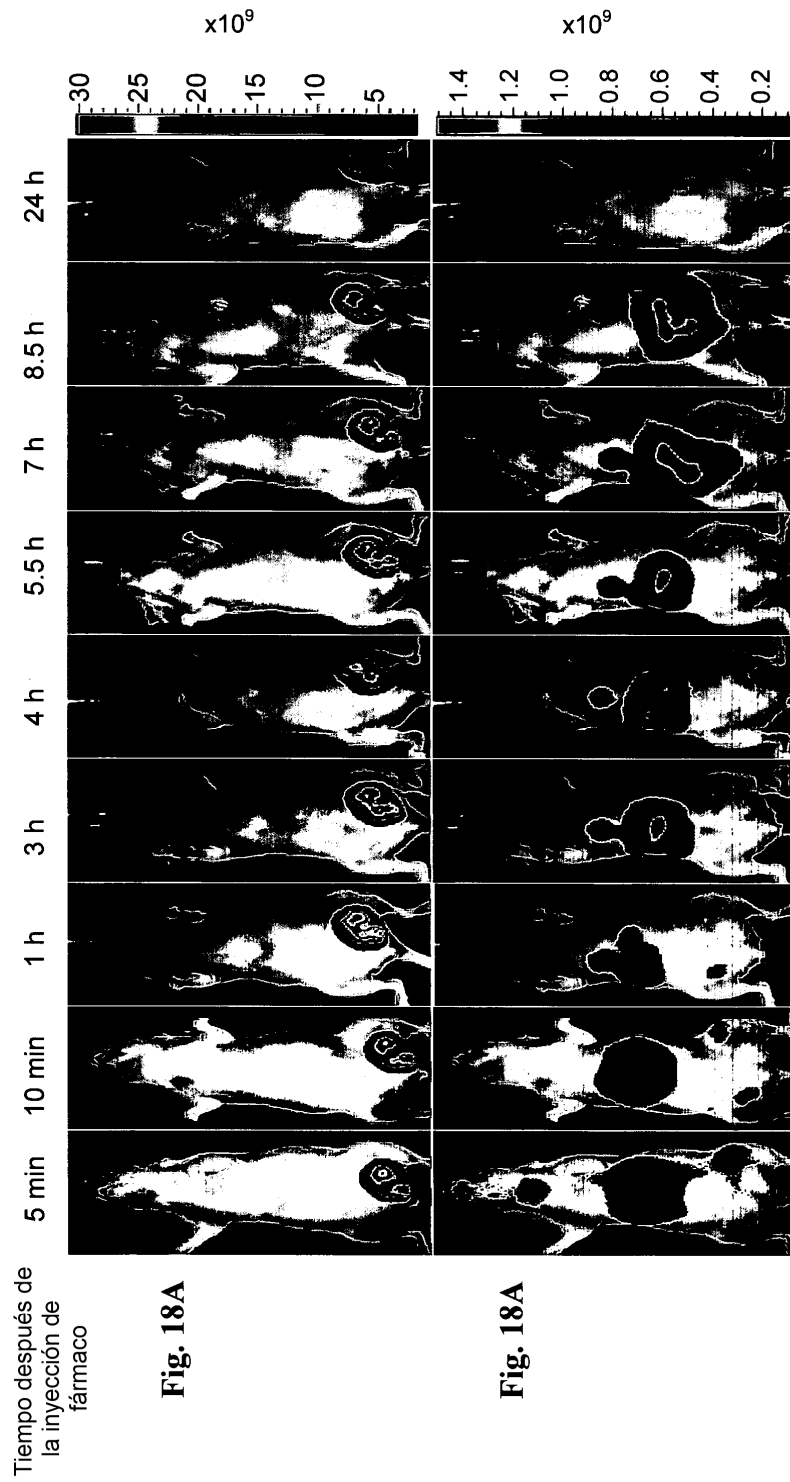


Fig. 17A





Tiempo después de
la inyección de
fármaco

1 h

8.5 h

1 día

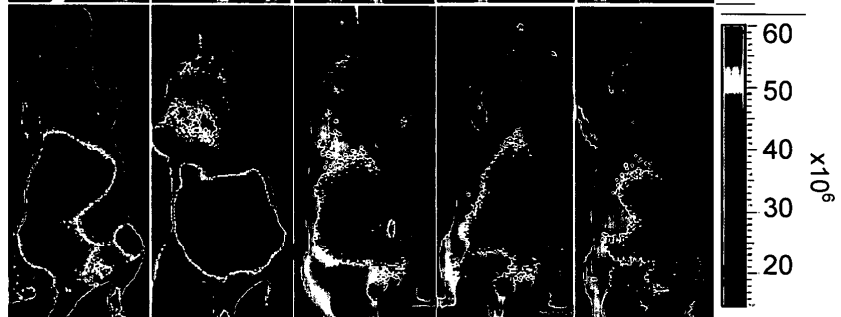
2 días

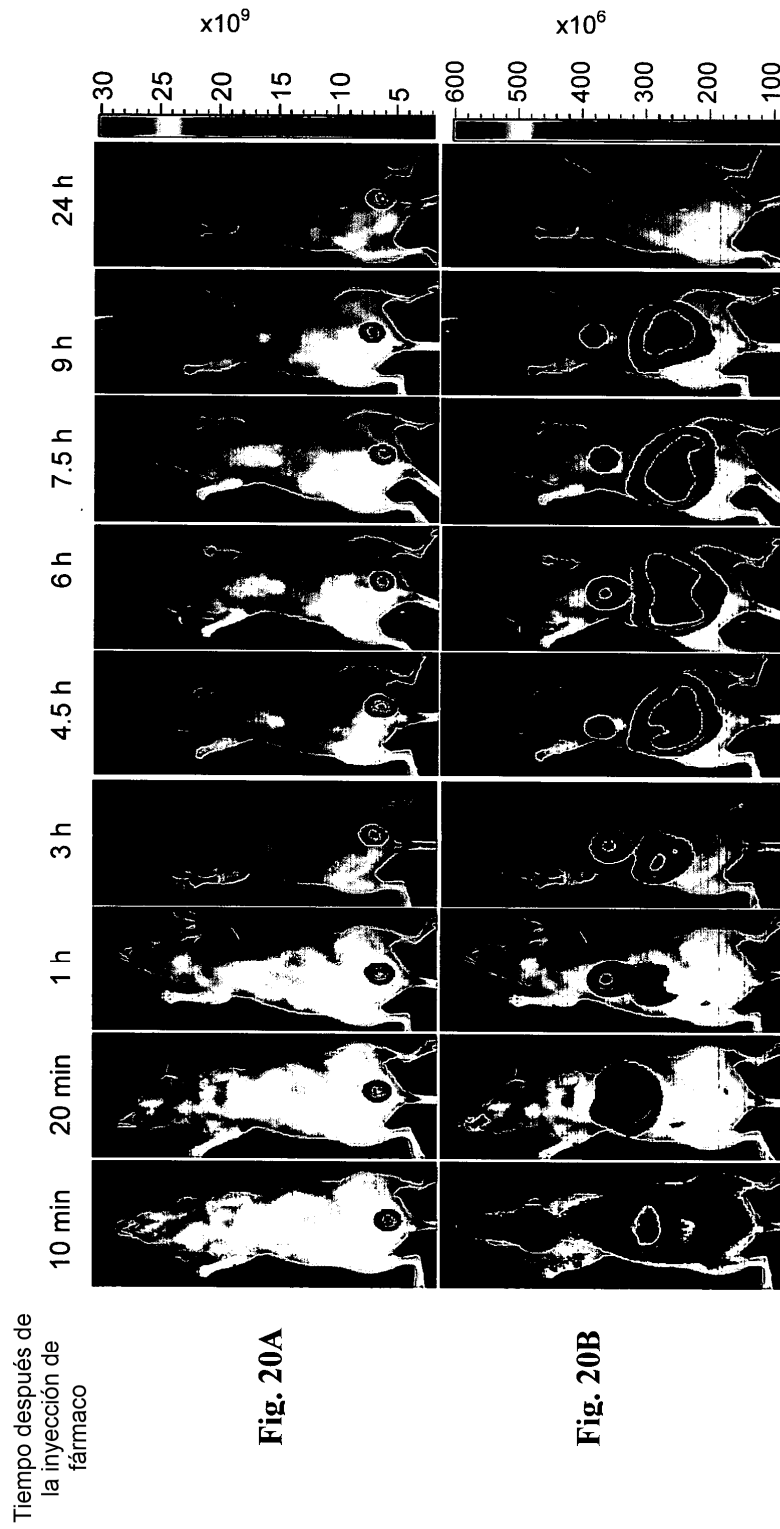
3 días

Fig. 19A



Fig. 19B





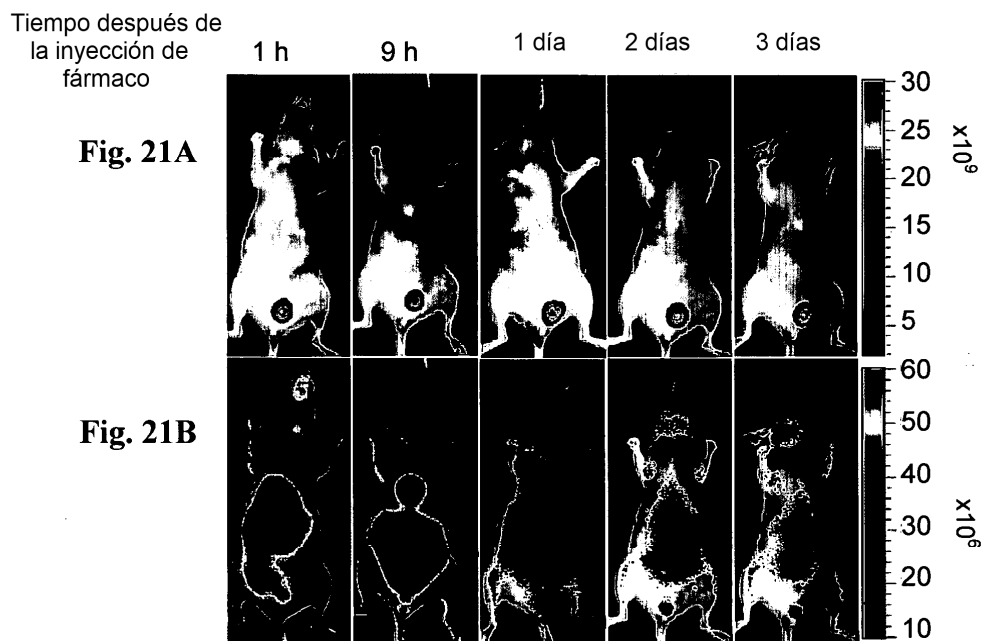


Fig. 22A

Fig. 22B

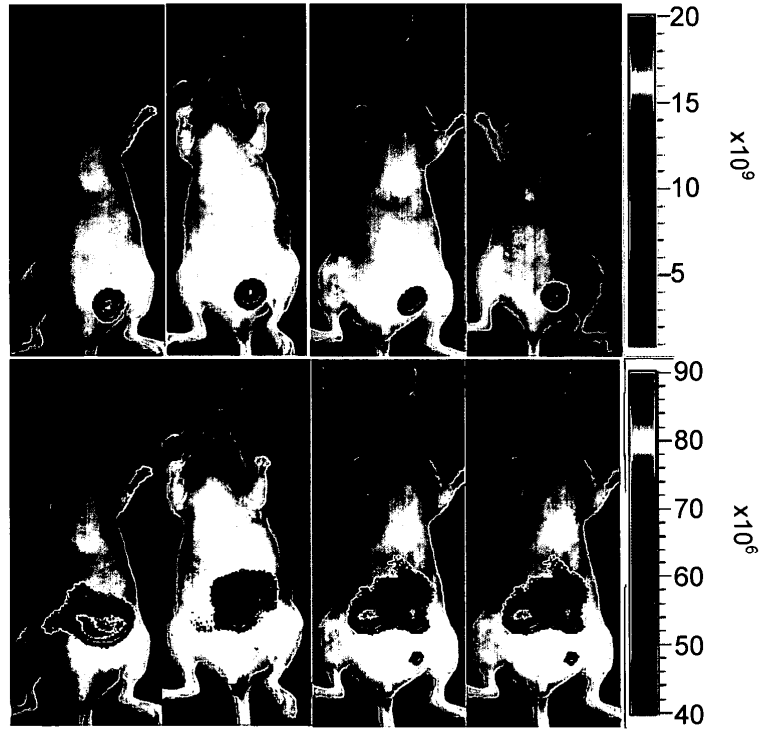


Fig. 22C

Fig. 22D

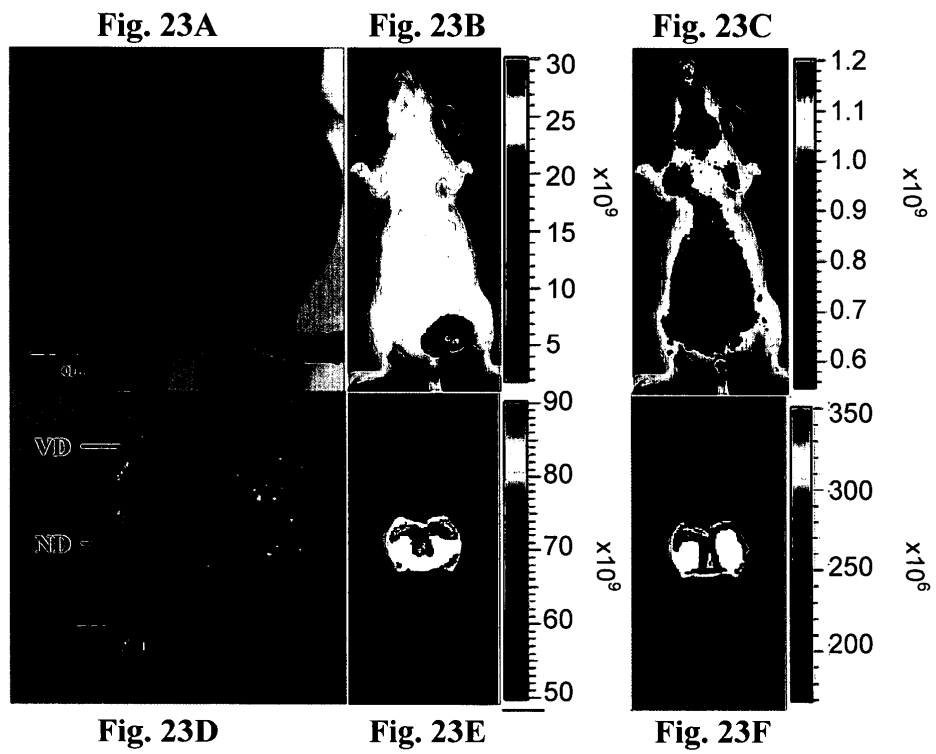


Fig. 24A

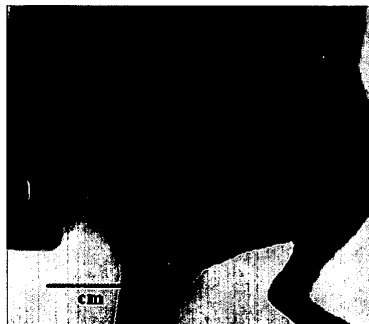


Fig. 24B

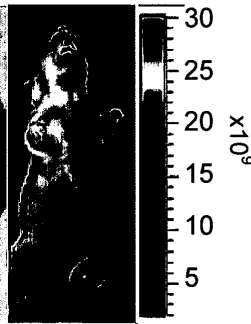


Fig. 24C

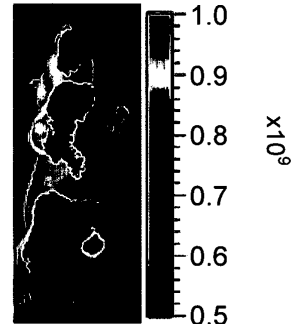


Fig. 24D

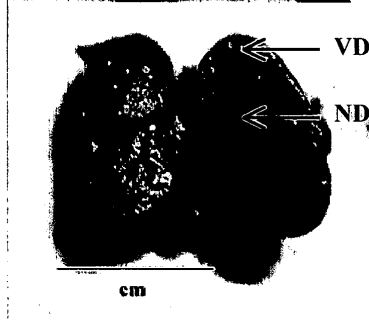


Fig. 24E

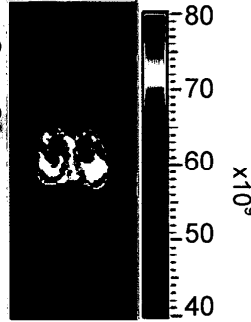
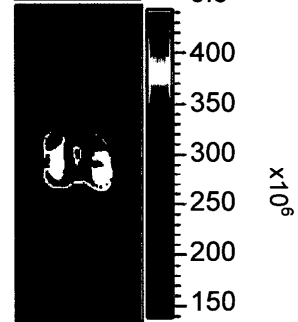
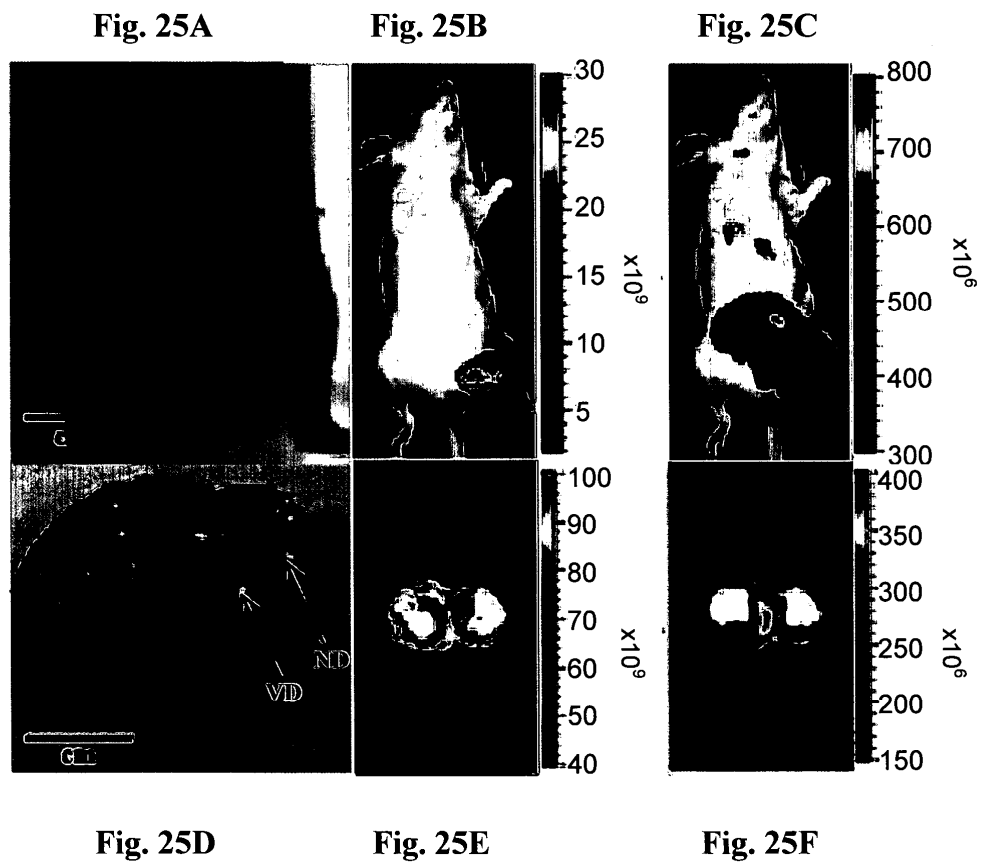
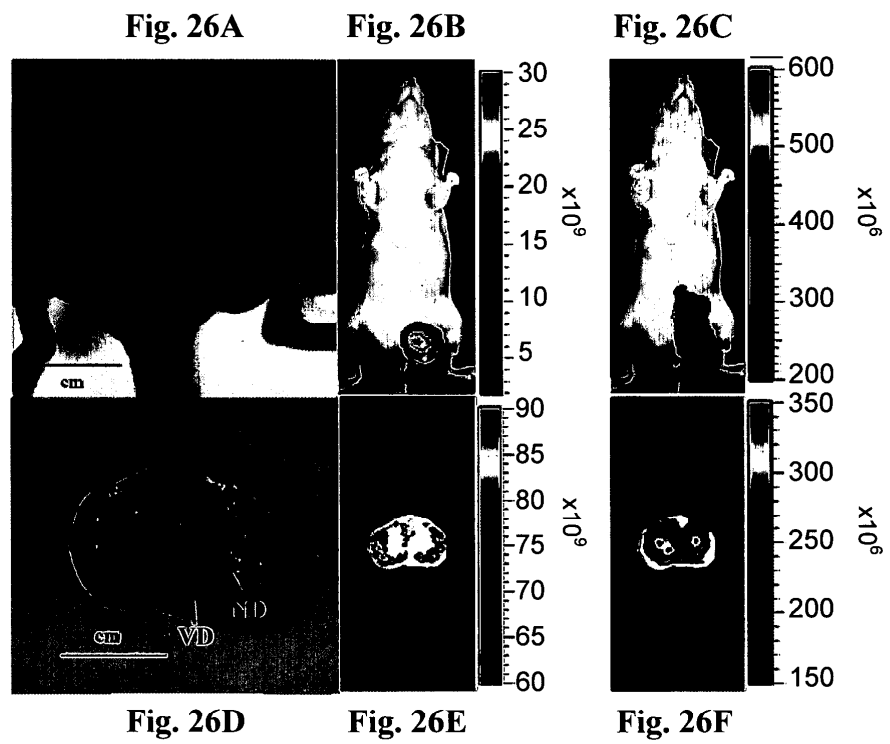
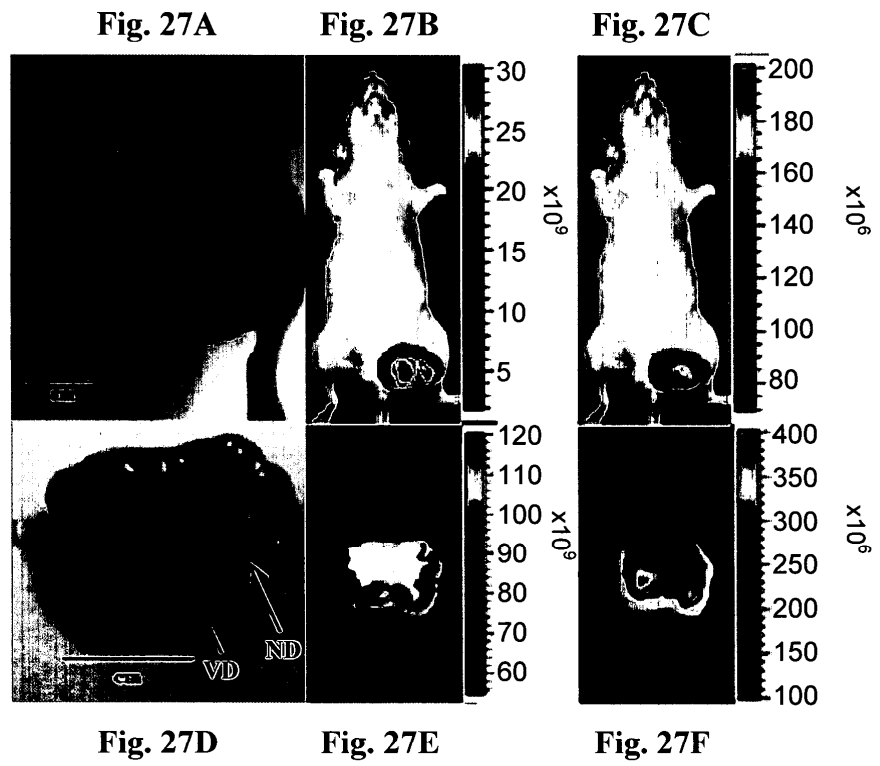


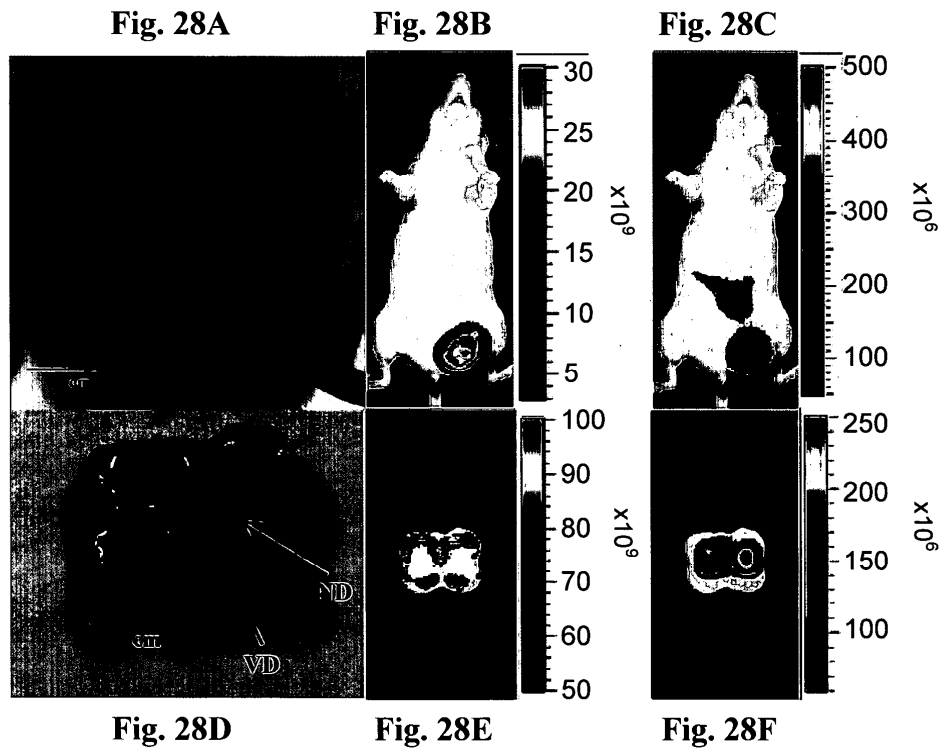
Fig. 24F

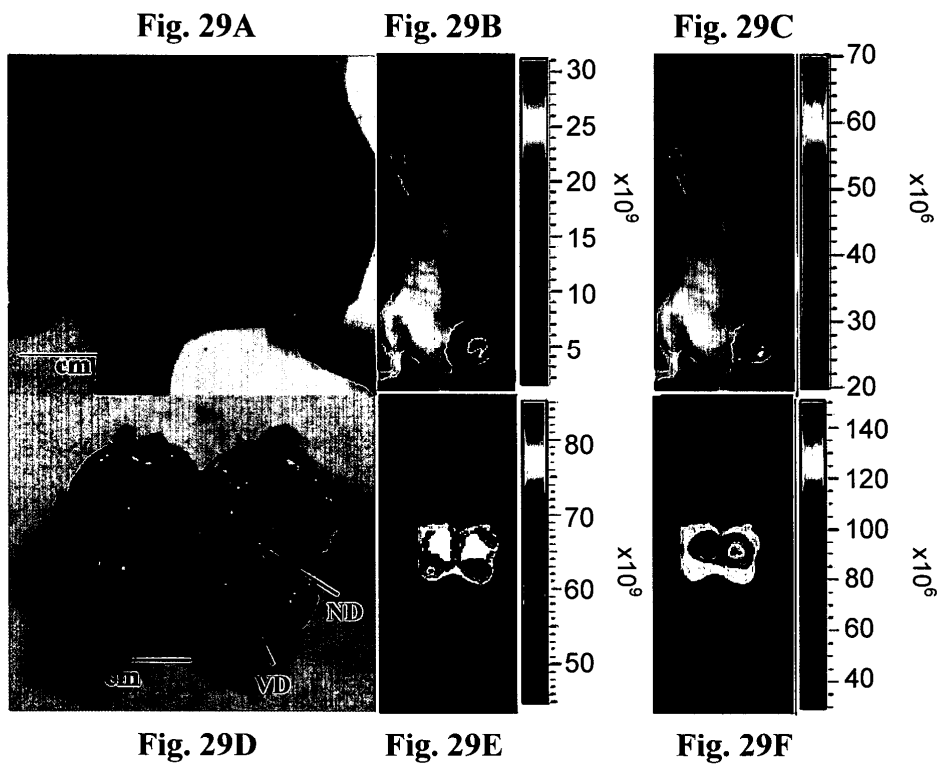


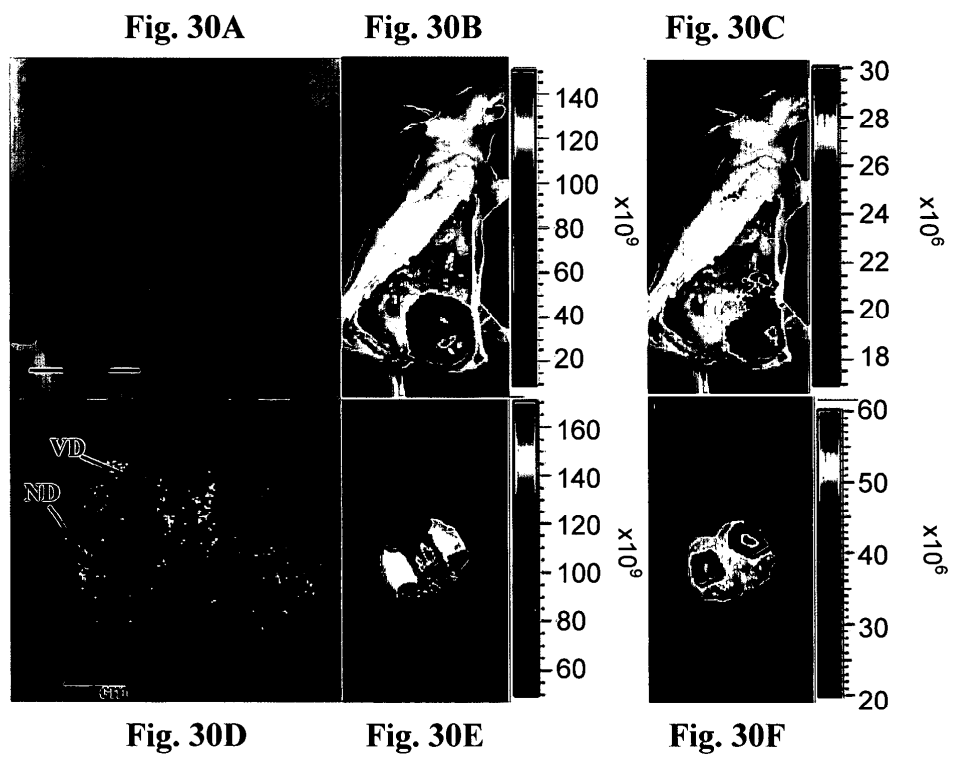


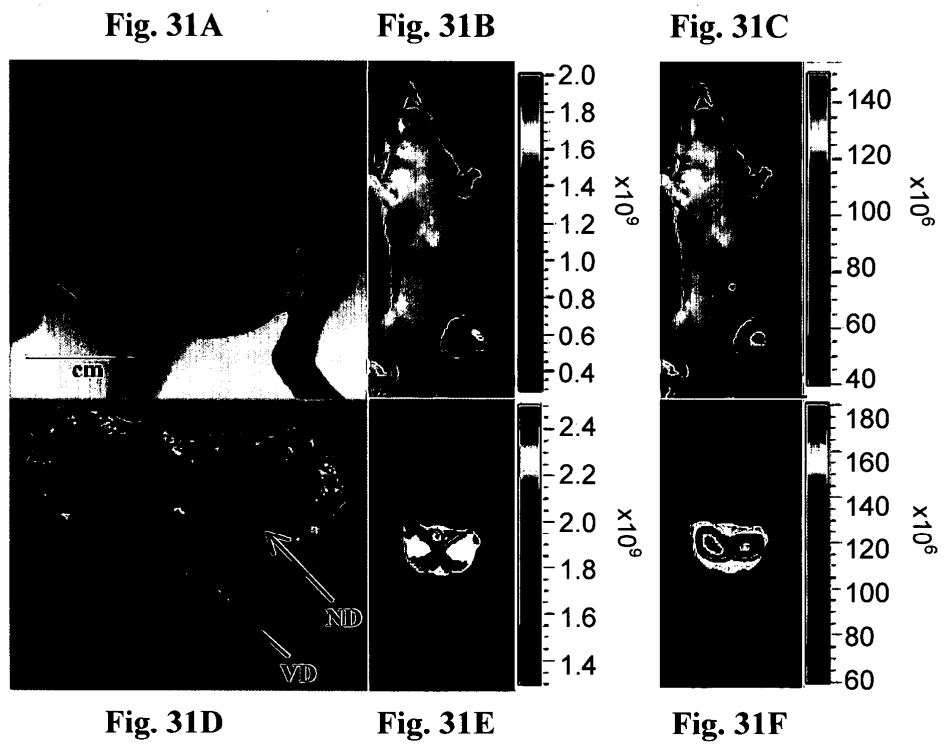












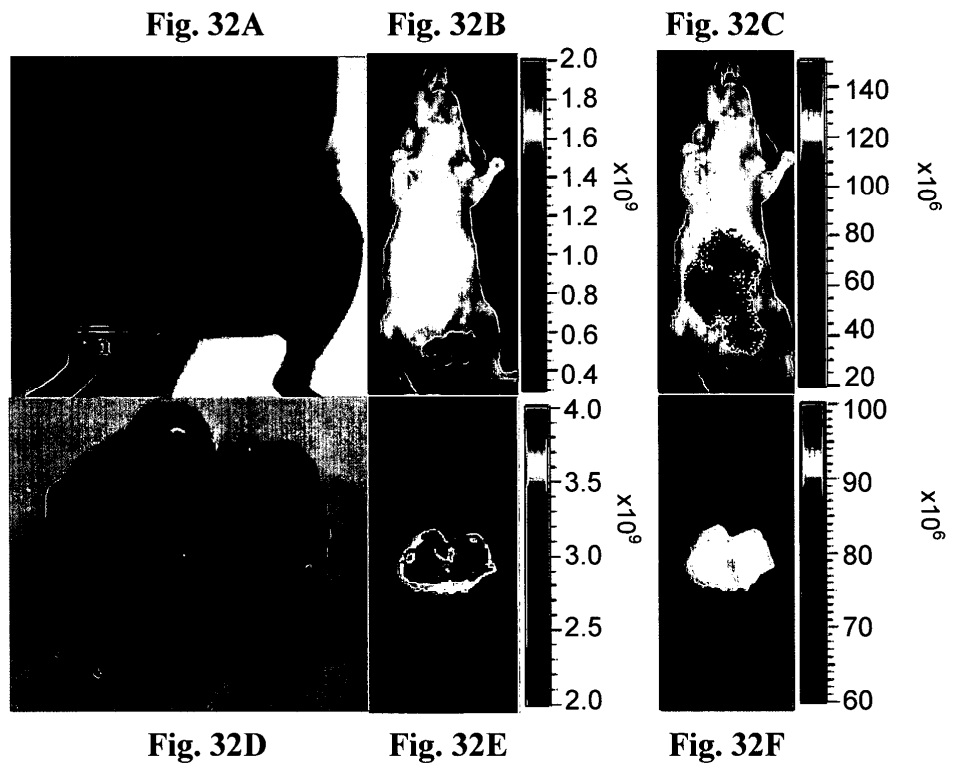


Fig. 33A

Fig. 33B

Fig. 33C

Fig. 33D

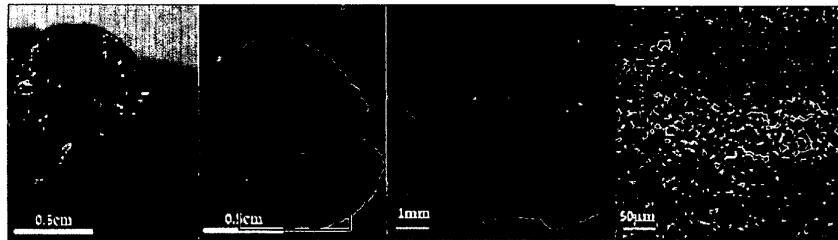


Fig. 34A

Fig. 34B

