



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61B 18/28 (2021.01); A61B 2218/00 (2021.01); A61B 2562/08 (2021.01); G01N 33/48 (2021.01); G01N 2800/00 (2021.01); A61N 5/0601 (2021.01)

(21)(22) Заявка: 2020102495, 08.10.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.10.2019

Дата регистрации:
01.03.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.10.2019

(45) Опубликовано: 01.03.2021 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр.,
49, лит.А, Университет ИТМО, ОИС и НТИ

(72) Автор(ы):

Набиев Игорь Руфаилович (RU),
Самохвалов Павел Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Национальный
исследовательский университет ИТМО"
(Университет ИТМО) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2638446 C1, 13.12.2017. RU
2007122479 A, 20.12.2008. US 20020127224 A1,
12.09.2002. US 20100183504 A1, 22.07.2010. US
2011/0022129 A1, 27.01.2011. US 20170021040 A1,
26.01.2017.

(54) Комплекс для детекции и направленного разрушения клеток

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинских исследований. Раскрыт комплекс для детекции и направленного разрушения клеток, содержащий активный компонент, состоящий из объединенных молекул фотосенсибилизатора, хотя бы одной плазмонной наночастицы и хотя бы одной биологической распознающей молекулы, отличающийся тем, что активный компонент дополнительно включает хотя бы одну объединенную молекулу органического флуоресцентного красителя, и комплекс включает вспомогательный детектирующий компонент, состоящий из хотя бы одной квантовой точки, объединенной с хотя бы одним однодоменным антителом, причем спектр флуоресценции квантовых точек находится в оптическом диапазоне поглощения молекул

фотосенсибилизатора и молекул органического флуоресцентного красителя, при этом биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела обладают свойством специфически связывать различные эпитопы заданного онкомаркера, экспрессирующегося клетками, причем активный и вспомогательный детектирующий компоненты являются отдельными компонентами, которые после введения в организм пространственно разделены до связывания с различными эпитопами заданного онкомаркера. Изобретение обеспечивает снижение фоновой токсичности фотосенсибилизаторов для здоровых клеток, а также увеличение специфичности детекции раковых клеток. 7 з.п. ф-лы, 1 пр., 1 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61B 18/28 (2021.01); *A61B 2218/00* (2021.01); *A61B 2562/08* (2021.01); *G01N 33/48* (2021.01); *G01N 2800/00* (2021.01); *A61N 5/0601* (2021.01)

(21)(22) Application: **2020102495, 08.10.2019**

(24) Effective date for property rights:
08.10.2019

Registration date:
01.03.2021

Priority:

(22) Date of filing: **08.10.2019**(45) Date of publication: **01.03.2021** Bull. № 7

Mail address:

**197101, Sankt-Peterburg, Kronverkskij pr., 49,
lit.A, Universitet ITMO, OIS i NTI**

(72) Inventor(s):

**Nabiev Igor Rufailovich (RU),
Samokhvalov Pavel Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Natsionalnyj issledovatel'skij
universitet ITMO" (Universitet ITMO) (RU)**

(54) **COMPLEX FOR THE DETECTION AND TARGETED DESTRUCTION OF CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: medical research.

SUBSTANCE: complex for the detection and targeted destruction of cells is disclosed, containing an active component consisting of combined photosensitizer molecules, at least one plasmon nanoparticle and at least one biological recognition molecule, characterized in that the active component additionally includes at least one combined organic fluorescent dye molecule, and the complex includes an auxiliary detecting component, consisting of at least one quantum dot combined with at least one single-domain antibody, and the fluorescence spectrum of quantum dots is in the optical absorption range of

photosensitizer molecules and organic fluorescent dye molecules, while biological recognition molecules and single-domain antibodies have the trait to specifically bind different epitopes of a given tumor marker expressed by cells, and the active and auxiliary detecting components are separate components that, after being introduced into the body are spatially separated before binding to different epitopes of a given tumor marker.

EFFECT: invention provides decrease in the background toxicity of photosensitizers for healthy cells, as well as increase in the specificity of detection of cancer cells.

8 cl, 1 ex, 1 dwg

Изобретение относится к области медицинских исследований, и предназначено для визуализации и специфического разрушения клеток и может быть использовано для высокоспецифичной детекции, оптической визуализации и разрушения клеток, в том числе раковых, методами фотодинамической терапии, путем генерации синглетных форм кислорода и свободных радикалов.

Известен комплексный фотосенсибилизатор (ФС) для реализации способа диагностики и терапии рака методами фотодинамической терапии (ФДТ), описанный в заявке (WO №2010151074 A2, МПК А61К 41/00, дата приоритета 26.06.2009, дата публикации 29.12.2010). Комплексный ФС представляет собой конъюгат квантовых точек (КТ) и производных хлорина (собственно ФС). Для проведения ФДТ данный комплексный ФС вводят в организм и облучают излучением с длиной волны, соответствующей длине волны поглощения КТ, которые затем передают возбуждение по механизму Ферстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ) на молекулы производных хлорина, вследствие чего образуются синглетные формы кислорода и свободные радикалы, вызывающие гибель клеток. При этом для специфического накопления комплексного ФС в раковых клетках, на их поверхности содержатся биологические распознающие молекулы, в частности антитела. Кроме того, излучение КТ используется для детекции и визуализации раковых клеток. Благодаря применению КТ, флуоресцирующих в инфракрасной области спектра, описанный комплексный ФС может использоваться не только для проведения ФДТ, но и визуализации раковых клеток в глубине тканей организма, что обусловлено более низким поглощением излучения ИК диапазона биологическими тканями. К недостаткам данного решения стоит отнести то, что данный комплексный ФС генерирует синглетные формы кислорода и свободные радикалы даже без дополнительного облучения внешним излучением, из-за эффективного поглощения оптического излучения КТ. Кроме того, данный комплексный ФС, благодаря входящим в его состав КТ, флуоресцирует вне зависимости от наличия или отсутствия раковых клеток, что позволяет судить о детекции КТ исключительно по локальному накоплению комплексного ФС, около раковых клеток.

Известен комплекс, используемый для реализации способа направленного разрушения раковых клеток (Патент RU №2638446, МПК А61В 18/20 А61N 5/06, дата приоритета 14.12.2016, дата публикации 13.12.2017), который выбран в качестве прототипа предлагаемого изобретения. Известный комплекс состоит из объединенных молекул фотосенсибилизатора, КТ, флуоресцирующих в инфракрасной области спектра, плазмонных наночастиц и биологических распознающих молекул, что позволяет проводить визуализацию и направленное разрушение раковых клеток, локализованных на большой глубине от поверхности исследуемого организма. Применение плазмонных наночастиц в составе комплекса, позволяет усилить флуоресценцию, использованных КТ, что позволяет, во-первых, с высокой чувствительностью детектировать флуоресцентный сигнал на большой глубине от поверхности исследуемого объекта, для визуализации на большой глубине, а во-вторых, усилить процесс активации молекул фотосенсибилизатора, для более эффективного разрушения клеточных компонент по механизму фото динамической терапии. Однако известное решение имеет ряд недостатков, включая постоянную фоновую активность фотосенсибилизатора, обусловленную эффективным сбором излучения с помощью КТ, даже без внешнего излучения, и возбуждением ФС. Кроме того, известное решение не может использоваться для специфической детекции клеток, так как входящие в состав комплекса КТ, флуоресцируют в независимости от того, связан комплекс с раковыми клетками, или нет, а детекция раковых клеток происходит только по накоплению используемого

комплекса на поверхности раковых клеток.

Предлагаемое изобретение направлено на решение задачи снижения фоновой токсичности фотосенсибилизаторов, применяемых для направленного разрушения клеток методами фотодинамической терапии, и увеличения специфичности их детекции, за счет применения двухкомпонентного комплекса, обеспечивающего детекцию целевого флуоресцентного сигнала и активацию фотосенсибилизатора только при пространственном объединении обоих компонентов.

Сущность заключается в том, что предложен комплекс для детекции и направленного разрушения клеток, содержащий активный компонент, состоящий из объединенных молекул фотосенсибилизатора, хотя бы одной плазмонной наночастицы и хотя бы одной биологической распознающей молекулы, при этом активный компонент дополнительно включает хотя бы одну объединенную молекулу органического флуоресцентного красителя, и дополнительно включает вспомогательный детектирующий компонент, состоящий из хотя бы одной квантовой точки объединенной с хотя бы одним однодоменным антителом, причем спектр флуоресценции квантовых точек находится в оптическом диапазоне поглощения молекул фотосенсибилизатора и молекул органического флуоресцентного красителя, при этом биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела обладают свойством специфически связывать различные эпитопы заданного онкомаркера, экспрессирующегося клетками, причем активный и вспомогательный детектирующие компоненты являются отдельными компонентами, которые после введения в организм пространственно разделены до связывания с различными эпитопами заданного онкомаркера.

Технический результат достигается тем, что предложен комплекс для детекции и направленного разрушения клеток, включающий активный компонент состоящий из объединенных одной и более молекул фотосенсибилизатора, одной и более молекул органического флуоресцентного красителя, одной и более плазмонной наночастицы и одной и более биологических распознающих молекул, а также включающий вспомогательный детектирующий компонент, состоящий из одной и более квантовых точек объединенных с одним и более однодоменным антителом, причем спектр флуоресценции квантовых точек находится в оптическом диапазоне поглощения молекул фотосенсибилизатора и молекул органического флуоресцентного красителя, при этом биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела способны связывать различные эпитопы заданного онкомаркера, экспрессирующегося клетками, причем активный и вспомогательный детектирующие компоненты являются отдельными компонентами, которые после введения в организм пространственно разделены до связывания с различными эпитопами заданного онкомаркера.

Данный комплекс может применяться для детекции и направленного разрушения раковых клеток методами ФДТ. Использование двух отдельных компонентов позволяет добиться того, что после введения компонентов комплекса в организм они оказываются пространственно разделены, что не позволяет осуществить эффективную передачу энергии возбуждения от КТ на молекулы фотосенсибилизатора и тем самым позволяет снизить токсическую активность фотосенсибилизатора, до того момента пока он не достиг раковых клеток. Кроме того, отсутствие вблизи вспомогательного детектирующего компонента эффективного донора для безызлучательного переноса энергии позволяет повысить интенсивность флуоресценции КТ, что позволяет повысить чувствительность обнаружения вспомогательного детектирующего компонента, при его перемещении внутри организма или связывания с онкомаркерами на поверхности раковых клеток. При этом, когда оба компонента комплекса, за счет специфического

взаимодействия однодоменных антител и биологических распознающих молекул, связались с различными эпитопами (участками) заданного онкомаркера на поверхности одной и той же раковой клетки, происходит пространственное сближение активного и вспомогательного детектирующего компонента, в результате чего КТ и комплекс фотосенсибилизатора, органического флуоресцентного красителя и плазмонной наночастицы оказываются на расстояниях, при которых возможен эффективный перенос возбуждения от КТ на фотосенсибилизатор и молекулы органического флуоресцентного красителя по механизму ФРПЭ. Это позволяет повысить специфичность детекции, так как молекулы органического флуоресцентного красителя начинают светиться, только в момент связывания компонента с целевыми онкомаркерами (до этого светятся только КТ, входящие в состав вспомогательного детектирующего компонента), а также увеличить специфичность и снизить токсичность метода, так как фотосенсибилизатор активируется только в момент контакта компонентов с онкомаркерами раковых клеток. Кроме того, входящие в состав активного компонента плазмонные наночастицы усиливают флуоресценцию КТ, что приводит к увеличению эффективности активации молекул фотосенсибилизатора, а также увеличению эффективности образованию синглетных форм кислорода путем передачи энергии от возбужденных КТ на молекулы триплетных форм кислорода, находящихся в раковых клетках и окружающих биологических жидкостях, что, в свою очередь, приводит к направленному разрушению раковых клеток за счет окисления их компонент синглетными формами кислорода. При этом, сами плазмонные наночастицы нагреваются, поглощая энергию излучения от полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов и внешнего излучения, вследствие чего также происходит разрушение опухолевых клеток под действием локального повышения температуры. Так как КТ обладают большим сечением мультифотонного поглощения, то можно проводить их возбуждение несколькими фотонами, например, в инфракрасной области спектра, для уничтожения раковых клеток, находящихся на большой глубине от поверхности тела.

Существует первый частный случай, в котором в качестве фотосенсибилизатора применяют молекулы фотосенсибилизаторов, активирующиеся излучением инфракрасной области оптического спектра.

Существует второй частный случай, в котором в качестве плазмонных наночастиц применяют наночастицы золота, серебра, платины и других благородных металлов.

Существует третий частный случай, в котором в качестве плазмонных наночастиц применяют плазмонные наночастицы в форме сфер, колец, торов, стержней, треугольников, или их комбинации.

Существует четвертый частный случай, в котором в качестве биологических распознающих молекул используют нативные белки и/или модифицированные белки, и/или поликлональные антитела, и/или моноклональные антитела, и/или высокоаффинные биологические компоненты, и/или пептиды, и/или нуклеиновые кислоты.

Существует пятый частный случай, в котором в качестве квантовых точек применены полупроводниковые нанокристаллы состава PbS/CdS/ZnS и/или $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, и/или Ag_2S .

Существует шестой частный случай, в котором одна и более молекула фотосенсибилизатора, одна и более молекула органического флуоресцентного красителя, одна и более плазмонная наночастица, одна и более биологическая распознающая молекула объединены с помощью функциональных групп, например, аминогрупп и/или карбоксильных групп, и/или высокоаффинных биологических компонентов, например, биотина и стрептавидина.

Существует седьмой частный случай, в котором одна и более квантовая точка и одно и более однодоменное антитело объединены с помощью функциональных групп, например, аминогрупп и/или карбоксильных групп, и/или высокоаффинных биологических компонентов, например, биотина и стрептавидина.

5 Сущность поясняется чертежом, где на фиг. представлен конкретный пример комплекса, используемого для детекции и направленного разрушения раковых клеток. Цифрами обозначены следующие элементы: фотосенсибилизатор - 1; органический флуоресцентный краситель - 2; плазмонная наночастица в форме кольца - 3; биологические распознающие молекулы - 4; квантовая точка - 5; однодоменные антитела
10 - 6; раковая клетка - 7; онкомаркер на поверхности клетки - 8. Элементы 1-4 ковалентно связаны между собой и представляют собой активный компонент, элементы 5 и 6 ковалентно связаны и представляют собой вспомогательный детектирующий компонент. Активный и вспомогательный компоненты связаны с онкомаркером раковых клеток за счет специфического взаимодействия между биологическими распознающими
15 молекулами и однодоменными антителами с эпитопами онкомаркера за счет водородных связей, электростатических взаимодействий и сил Ван-дер-Ваальса.

Конкретный пример, поясняющий принцип работы комплекса показан на примере детекции и направленного разрушения раковых клеток 7 экспрессирующих онкомаркер рака молочной железы Her2 8. Для этого используется комплекс, включающий активный
20 компонент, состоящий из объединенных, с помощью ковалентного связывания амина и карбоксильных групп, моноклональных антител 4, специфичных к онкомаркеру Her2 8, молекул органического флуоресцентного красителя Alexa Fluor 660 2 (максимум возбуждения при 663 нм, максимум эмиссии на 690 нм), плазмонных наночастиц золота 3 в форме кольца с диаметром 0,5 мкм и толщиной 80 нм, а также молекул
25 фотосенсибилизатора 1 (фотодитазин, максимум поглощения при 662 нм), а также вспомогательный детектирующий компонент, состоящий из КТ 5 состава $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, имеющих максимум флуоресценции излучения с длиной волны 660 нм, конъюгированных с однодоменными антителами 6 к Her2. Компоненты данного комплекса в физиологическом растворе шприцом вводят в хвостовую вену мыши,
30 трансплантированных клеточной линией SKBR3, с высоким уровнем экспрессии онкомаркера Her2 8. Через 5 минут после введения компонентов комплекса проводят визуализацию флуоресцентных меток, путем кратковременного облучения участка с трансплантированными опухолевыми клетками лазерным излучением с длиной волны 620 нм, с детекцией на 660 и 690 нм. В этом случае детектируется только сигнал от КТ
35 5, соответствующий флуоресценции с длиной волны 660 нм, что показывает распространение вспомогательного детектирующего компонента и свидетельствует о том, что компоненты комплекса пока не достигли раковых клеток 7 и не смогли сблизиться на расстояние, достаточное для эффективной передачи энергии от КТ 5 к молекулам красителя Alexa Fluor 660 2 по механизму ФРПЭ, и активации
40 фотосенсибилизатора 1. Еще через 15 минут проводят повторное кратковременное облучение, в результате чего детектируется сигнал как от флуоресценции КТ 5 (660 нм), так и сигнал от красителя Alexa Fluor 660 2 (690 нм), что свидетельствует о том, что оба компонента связались с онкомаркером Her2 8 и в этом случае можно приступить к ФДТ. Для этого проводят длительное облучение (2 раунда по 3 минуты с перерывом
45 в 1 минуту) места опухоли излучением с длиной волны 620 нм. Количество раундов и режим облучения зависят от размера опухоли или количества раковых клеток 7 и места их локализации. Проверка эффективности разрушения раковых клеток 7 может осуществляться через 12-24 часа, путем облучения места их локализации и последующей

детекции флуоресцентного сигнала от красителя Alexa Fluor 660 2. Если сигнал от Alexa Fluor 660 2 детектируется, значит еще разрушены не все клетки 7, и компоненты комплекса до сих пор пространственно объединены, а облучение необходимо повторить. Если детектируется только сигнал от КТ 5, то это говорит о том, что раковые клетки 7 уничтожены. В данном случае удалось уничтожить все раковые клетки 7 за один раз, так как сигнала от красителя Alexa Fluor 660 2 через 24 часа не детектировался.

Для подтверждения увеличения специфичности предлагаемого комплекса и снижения фоновой токсичности ФС, нами было проведено сравнение специфичности ФДТ индуцированной гибели клеток с известным решением, выбранным в качестве прототипа, в котором в качестве фотосенсибилизатора также использовался фотодитазин. Для этого использовалась смесь клеток SKBR3, экспрессирующих Her2 и клеток Wi-38 (клеточная линия нормальных фибробластов человека). Клетки были выращены в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, антибиотика пенициллин-стрептомицин, пирувата натрия и раствора витаминов для среды RPMI-1640 в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в атмосфере. По достижению монослоя клетки были удалены с поверхности флаконов для культивирования и их количество было определено известным способом. Затем клетки SKBR3 и Wi-38 были посажены в два культуральных флакона из расчета 10⁶ клеток каждого вида в одном флаконе, в описанную ранее ростовую среду. В один флакон были добавлены компоненты предлагаемого комплекса, а в другой флакон, комплекс фотосенсибилизатора, описанный в прототипе, причем количество добавленных компонентов было нормировано на количество молекул фотосенсибилизатора. Через 30 минут культивирования оба флакона были облучены излучением с длиной волны 620 нм (два раза по 1 минуте с перерывом 3 минуты). Затем известным способом (с помощью проточной цитометрии) было оценено соотношение каждого вида выживших клеток в обоих флаконах. В результате, в флаконе с предлагаемым комплексом соотношение клеток SKBR3/Wi-38 было равно 22/78, а во флаконе, с комплексом фотосенсибилизатора из прототипа, соотношение было 31/69, то есть специфичность предлагаемого нами решения по индукции гибели раковых клеток более чем в полтора раза выше, чем у прототипа.

Таким образом, предложенный комплекс для детекции и направленного разрушения клеток, позволяет проводить высокоспецифичную детекцию и направленное разрушение опухолевых клеток внутри организма. Применение двухкомпонентного комплекса позволяет активировать фотосенсибилизатор только в момент, когда он достиг раковых клеток, снижая фоновую токсичность фотосенсибилизатора для здоровых клеток, а также обеспечивает соответствующий флуоресцентный сигнал для детекции именно заданных раковых клеток, что позволяет увеличить специфичность детекции и направленного разрушения клеток методами фотодинамической терапии.

(57) Формула изобретения

1. Комплекс для детекции и направленного разрушения клеток, содержащий активный компонент, состоящий из объединенных молекул фотосенсибилизатора, хотя бы одной плазмонной наночастицы и хотя бы одной биологической распознающей молекулы, отличающийся тем, что активный компонент дополнительно включает хотя бы одну объединенную молекулу органического флуоресцентного красителя, и комплекс включает вспомогательный детектирующий компонент, состоящий из хотя бы одной квантовой точки объединенной с хотя бы одним однодоменным антителом, причем спектр флуоресценции квантовых точек находится в оптическом диапазоне поглощения

молекул фотосенсибилизатора и молекул органического флуоресцентного красителя, при этом биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела обладают свойством специфически связывать различные эпитопы заданного онкомаркера, экспрессирующегося клетками, причем активный и вспомогательный детектирующий

5 компоненты являются отдельными компонентами, которые после введения в организм пространственно разделены до связывания с различными эпитопами заданного онкомаркера.

2. Комплекс по п. 1, отличающийся тем, что в качестве фотосенсибилизатора применяют молекулы фотосенсибилизаторов, активирующиеся излучением

10 инфракрасной области оптического спектра.

3. Комплекс по п. 1, отличающийся тем, что в качестве плазмонных наночастиц применяют наночастицы золота, серебра, платины и других благородных металлов.

4. Комплекс по пп. 1, 3, отличающийся тем, что в качестве плазмонных наночастиц применяют плазмонные наночастицы в форме сфер, колец, торов, стержней,

15 треугольников, или их комбинации.

5. Комплекс по п. 1, отличающийся тем, что в качестве биологических распознающих молекул используют нативные белки и/или модифицированные белки, и/или поликлональные антитела, и/или моноклональные антитела, и/или высокоаффинные биологические компоненты, и/или пептиды, и/или нуклеиновые кислоты.

6. Комплекс по п. 1, отличающийся тем, что в качестве квантовых точек применены полупроводниковые нанокристаллы состава $PbS/CdS/ZnS$, и/или $CuInS_2/ZnS$, и/или Ag_2S .

20

7. Комплекс по п. 1, отличающийся тем, что одна и более молекула фотосенсибилизатора, одна и более молекула органического флуоресцентного красителя, одна и более плазмонная наночастица, одна и более биологическая распознающая

25 молекула объединены с помощью функциональных групп, например аминогрупп, и/или карбоксильных групп, и/или высокоаффинных биологических компонентов, например биотина и стрептавидина.

8. Комплекс по п. 1, отличающийся тем, что одна и более квантовая точка и одно и более однодоменное антитело объединены с помощью функциональных групп, например

30 аминогрупп, и/или карбоксильных групп, и/или высокоаффинных биологических компонентов, например биотина и стрептавидина.

35

40

45

