

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201800319** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2018.06.04

(51) Int. Cl. *A61K 49/06* (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
C09K 11/08 (2006.01)
C09K 11/54 (2006.01)
C09K 11/56 (2006.01)
C09K 11/57 (2006.01)
C09K 11/88 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)

(54) **ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МАРКЕРОВ И СПОСОБЫ ИХ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ**

(96) **2018000068 (RU) 2018.06.04**

(71) Заявитель:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ЛЮМЛАЙН" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Кузнецов Денис Бахтиерович,
Крыльский Дмитрий Вильямович,
Дежуров Сергей Валерьевич,
Кузнецов Евгений Александрович
(RU)**

(74) Представитель:
**Пустовалова М.Л., Котлов Д.В.,
Черняев М.А., Яремчук А.А. (RU)**

(57) Изобретение относится к области онкологии, а именно к препаратам для флуоресцентной молекулярно-нацеленной визуализации онкомаркеров, и может быть использовано при первичной, уточняющей и интраоперационной диагностике, отборе пациентов для лечения противоопухолевыми препаратами и мониторинга эффективности лечения, а также для лабораторных методов исследования с использованием увеличительных оптических устройств. Предложен флуоресцентный препарат для визуализации структур, присутствующих на поверхности клеток опухолевых образований, при введении субъекту, включающий по меньшей мере один конъюгат, состоящий из фотостабильного флуоресцентного нанокристалла, покрытого полимерной оболочкой, с которой ковалентно связаны один или несколько полипептидов, способных специфически связываться по меньшей мере с одной из указанных структур на поверхности клеток опухолевых образований в организме субъекта.

A1

201800319

201800319

A1

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ И СПОСОБЫ ИХ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

Область техники

Данное изобретение относится к области нанотехнологии, в частности, к созданию новых визуализирующих препаратов на основе флуоресцентных нанокристаллов. Описываемые конструкции могут применяться для специфической флуоресцентной молекулярно-нацеленной визуализации маркеров и диагностики различных заболеваний.

Уровень техники

Применение флуоресцентных меток в ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне является перспективным в таких областях как молекулярная биология, диагностика и визуализация молекулярных маркеров, поскольку данная область спектра в наименьшей степени поглощается компонентами тканей организмов, а также заметно отстоит от автофлуоресценции биологических материалов (клеток, тканей и др). Известно значительное количество препаратов для диагностики рака, в частности для визуализации опухолей, каждое из которых использует различные метки и молекулы, выполняющие функции специфического связывания с маркерами на поверхности раковых клеток. Независимо от природы меток и молекул, существующие диагностические препараты требуют для визуализации использование нестандартного оборудования, что создает значительный барьер повсеместного их внедрения.

В качестве флуоресцентных меток, используемых для визуализации, особое место занимают функционализированные модифицированные коллоидные нанокристаллы. Используя флуоресцентные нанокристаллы, можно подобрать флуоресцентные характеристики (варьируя материал, размер и конструкцию нанокристаллов) и осуществлять диагностические методы различных патологий. Флуоресцентные нанокристаллы имеют ряд преимуществ по сравнению с органическими красителями. Флуоресцентные нанокристаллы имеют высокий квантовый выход и более высокий коэффициент молярного поглощения, а также большую величину стоксовского сдвига, чем у органических красителей, что проявляется в виде более высокой яркости и увеличения интенсивности аналитического сигнала. Все это упрощает диагностический процесс, повышает порог обнаружения и повышает надежность эндоскопического исследования и операционной ревизии. Различные способы синтеза флуоресцентных нанокристаллов (квантовых точек) были описаны, например, в патентах РФ № 2497746, 2381304 и 2540385.

Наиболее близким по совокупности существенных признаков к заявляемому техническому решению является патент РФ № 2560699, «Способ создания наноразмерной диагностической метки на основе конъюгатов наночастиц и однодоменных антител», который описывает наноразмерные диагностические метки на основе конъюгатов наночастиц и однодоменных антител, при этом поверхности наночастиц были модифицированы тиольными группами и содержали полимерную оболочку из производных полиэтиленгликоля, обеспечивая связывание с однодоменными антителами. Недостатками описанных наноразмерных диагностических меток являются: 1) отсутствие оптических характеристик, позволяющих осуществлять визуализацию маркеров в зоне низкой автофлуоресценции тканей организма, что определяет более низкую чувствительность методов при использовании этих меток; 2) возможность только ориентированной конъюгации с однодоменными антителами; 3) необходимость использования нестандартных устройств для визуализации в условиях эндоскопии и оперативной ревизии.

Для успешного применения препаратов на основе флуоресцентных нанокристаллов в диагностических целях в организме субъекта они должны обладать высокой специфичностью к мишеням, коллоидной стабильностью и низкой токсичностью. Для повышения коллоидной стабильности флуоресцентные нанокристаллы покрывают гидрофильной оболочкой, придающей нанокристаллам хорошую растворимость в биологических жидкостях (Blanco-Canosac JB, et al., *Coord. Chem. Rev.*, 2014, 263, p.101). При этом, распространенной проблемой является недостаточная стабильность оболочки (Tomczak N, et al., *Nanoscale*, 2013, 5, p.12018), что также приводит к повышению токсичности препарата.

В клинической практике из-за неспецифичности и токсичности флуоресцентных нанокристаллов их использование при обнаружении и лечении опухолей ограничено. Для повышения специфичности и снижения или полного устранения токсичности могут быть использованы методы модификации их поверхности путем образования биосовместимых оболочек на их поверхности, а также конъюгацией с биомолекулами.

FDA одобрило для клинических испытаний наночастицы из мезопористого диоксида кремния с флуоресцеином, модифицированные триметиламмонием (Feng et al., *Application of Inorganic Nanomaterials in Imaging Diagnosis, Journal of Advances in Physical Chemistry*, Vol.07, No.02 (2018)).

Тем не менее, на сегодняшний день в клинической практике не существует диагностических агентов на основе флуоресцентных нанокристаллов, несмотря на их технические преимущества по сравнению с другими агентами визуализации. Данное

изобретение обладает рядом свойств, позволяющих рассматривать предлагаемое техническое решение для расширения круга имеющихся кандидатов на роль агента для диагностики онкологических заболеваний.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание диагностического агента на основе флуоресцентных нанокристаллов, характеризующегося высокой чувствительностью (высоким квантовым выходом флуоресценции), специфичностью к мишеням, коллоидной стабильностью и возможностью применения в лабораторной и клинической практике без использования специального оборудования. Кроме того, данный диагностический агент должен обладать низкой токсичностью (высокой биосовместимостью), что позволило бы использовать его как при анализе биологических образцов, выделенных из субъекта (*ex vivo*), так и непосредственно в организме субъекта (*in vivo*).

Указанная задача решается путем создания флуоресцентного препарата для визуализации молекулярных маркеров при введении данного препарата субъекту, включающего по меньшей мере один конъюгат, состоящий из фотостабильного флуоресцентного нанокристалла, соединённого с полимерной оболочкой, покрывающей указанный флуоресцентный нанокристалл, с которой ковалентно связаны один или несколько полипептидов, способных специфически связываться с одним из указанных молекулярных маркеров в организме субъекта, при этом структура конъюгата выражается общей формулой А/Б/В/Г/ПО/П, где ядро нанокристалла А представляет собой смешанное ядро из минимум трех различных элементов, одним из которых является S, Se, или Te и два другие выбраны из: P, Cd, Cu, In, Te, Zn, Mn; дополнительные оболочки нанокристалла Б и В, покрывающие ядро А, состоят из минимум двух элементов, один из которых S или Se, и другой выбран из Cd или Zn; дополнительная оболочка нанокристалла Г, покрывающая оболочку В, либо состоит из минимум двух элементов, один из которых S или Se, и другой выбран из Cd или Zn, либо отсутствует; химический состав ядра А не совпадает с составом оболочки Б, состав оболочки Б не совпадает с составом оболочки В, и состав оболочки В не совпадает с составом оболочки Г; полимерная оболочка ПО обладает гидрофильной поверхностью и высокой биосовместимостью; полипептид П способен специфически связываться с одним из указанных молекулярных маркеров; флуоресцентный нанокристалл в составе конъюгата имеет квантовый выход более 45%, максимум поглощения в диапазоне 390-460 нм и максимум эмиссии в диапазоне 660-720 нм. Таким образом, указанный полупроводниковый флуоресцентный нанокристалл имеет более двух широкозонных полупроводниковых оболочек.

В некоторых вариантах изобретения данный флуоресцентный препарат характеризуется тем, что полипептиды, способные специфически связываться с указанными молекулярными маркерами, представляют собой функциональные фрагменты антител, способные специфически связываться с указанными молекулярными маркерами. В предпочтительных вариантах изобретения данный флуоресцентный препарат характеризуется тем, что молекулярные маркеры представляют собой структуры, присутствующие на поверхности клеток опухолевых образований указанного субъекта. В других вариантах изобретения флуоресцентный препарат может включать фармацевтически приемлемый растворитель или другие вспомогательные вещества.

В некоторых предпочтительных вариантах изобретения функциональные фрагменты антител представляют собой функциональные фрагменты биспецифических антител, способные специфически связываться с двумя различными молекулярными маркерами.

В некоторых вариантах изобретения данный флуоресцентный препарат характеризуется тем, что флуоресцентный нанокристалл соединён с полимерной оболочкой при помощи ковалентной связи. В предпочтительных вариантах изобретения флуоресцентный препарат характеризуется тем, что ядро нанокристалла А выбрано из: CdTeSe, CuInS₂, ZnMnS, CdZnCuS. В некоторых предпочтительных вариантах изобретения флуоресцентный нанокристалл в составе конъюгата имеет квантовый выход более 70%.

В некоторых предпочтительных вариантах изобретения в качестве полимерной оболочки используют варианты сополимеров производных фосфолипидов (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин), пептидов (фитохелатин- α -пептиды), производных олигонуклеотидов (функционализированные ДНК, РНК), дигидролипоевой кислоты, производные силанов (3-меркаптопропилтриметоксисилан, 3-аминопропилтриметоксисилан, меркаптопропилсилан, триметоксисилан, тетраэтоксисилан), олигомерных фосфинов, производные акриламида (N-изопропилакриламид, N-метилолакриламида, N-метилметакриламид), производные пирролидона (N-метилпирролидон, N-винилпирролидон, N-гидроксисукцинимид, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат), N-октиламина, производные малеиновой кислоты (малеиновый ангидрид, малеимид), производные гликолей (функционализированные олигоэтиленгликоли), производные амфифильных сахаридов (β -галактозид, α -глюкозид, α -мальтогексаозид), производные акриловой кислоты (метилметакрилат, 2-(ацетилтио)этилметакрилат, бутилметакрилат, (диметиламино)этилметакрилат, 2-гидроксиметилметакрилат), меркаптокарбоксильной кислоты, N-винилкапролактама, гистамина, лактида, лактамида, декстрана, амидоамина, аллиламина, этиленимина, терминированных алкилтиольными остатками

предпочтительно тиол-модифицированных сополимеров N-винилпирролидона и малеиновой кислоты (ПТВП), поли(изобутилен-альт-малеинового ангидрида), терминированного n-октиламином и 1,6 гександитиолом (ПИМА), и производных оксида кремния. В некоторых вариантах изобретения данный флуоресцентный препарат характеризуется тем, что одна из оболочек флуоресцентного кристалла может иметь в своем составе более двух элементов.

В некоторых вариантах изобретения данный флуоресцентный препарат характеризуется тем, что включает по меньшей мере два конъюгата, каждый из которых имеет структуру согласно формуле А/Б/В/Г/ПО/П, при этом полипептиды П в данных конъюгатах имеют сродство к двум различным молекулярным маркерам, и флуоресцентные нанокристаллы в данных конъюгатах при облучении светом в диапазоне длин волн 390-460 нм имеют максимумы эмиссии на различных длинах волн, таким образом обеспечивая одновременную визуализацию двух указанных молекулярных маркеров.

Указанная задача также решается путем создания флуоресцентного препарата для визуализации молекулярных маркеров в биологических образцах субъекта, включающего по меньшей мере один конъюгат, состоящий из фотостабильного флуоресцентного нанокристалла, соединённого с полимерной оболочкой, покрывающей указанный флуоресцентный нанокристалл, с которой ковалентно связаны один или несколько полипептидов, способных специфически связываться с одним из указанных молекулярных маркеров, при этом структура конъюгата выражается общей формулой А/Б/В/Г/ПО/П, где ядро нанокристалла А представляет собой смешанное ядро из минимум трех различных элементов, одним из которых является S, Se, или Te и два другие выбраны из: P, Cd, Cu, In, Te, Zn, Mn; дополнительные оболочки нанокристалла Б и В, покрывающие ядро А, состоят из минимум двух элементов, один из которых S, Se, или Te и другой выбран из Cd или Zn; дополнительная оболочка нанокристалла Г, покрывающая оболочку В, либо состоит из минимум двух элементов, один из которых S, Se, или Te и другой выбран из Cd или Zn, либо отсутствует; химический состав ядра А не совпадает с составом оболочки Б, состав оболочки Б не совпадает с составом оболочки В, и состав оболочки В не совпадает с составом оболочки Г; полимерная оболочка ПО обладает гидрофильной поверхностью и высокой биосовместимостью; полипептид П способен специфически связываться с одним из указанных молекулярных маркеров; флуоресцентный нанокристалл в составе конъюгата имеет квантовый выход более 45%, максимум поглощения в диапазоне 390-460 нм и максимум эмиссии в диапазоне 660-720 нм. В предпочтительных вариантах изобретения молекулярные маркеры представляют собой структуры, присутствующие на поверхности клеток опухолевых образований в указанных биологических образцах субъекта.

В некоторых вариантах изобретения данный флуоресцентный препарат характеризуется тем, что включает по меньшей мере два конъюгата, каждый из которых имеет структуру согласно формуле А/Б/В/Г/ПО/П, при этом полипептиды П в данных конъюгатах имеют сродство к двум различным молекулярным маркерам, и флуоресцентные нанокристаллы в данных конъюгатах при облучении светом в диапазоне длин волн 390-460 нм имеют максимумы эмиссии на различных длинах волн, таким образом обеспечивая одновременную визуализацию двух указанных молекулярных маркеров.

При осуществлении изобретения достигаются следующий технический результат: создан новый вариант диагностического агента на основе флуоресцентных нанокристаллов для диагностики онкологических заболеваний, характеризующихся наличием дифференциально экспрессирующихся маркеров на поверхности клеток опухолевой ткани по сравнению с аналогичными клетками нормальной ткани; методы с использованием полученного агента обладают повышенной чувствительностью за счет высокого квантового выхода и эмиссии в зоне низкой автофлуоресценции тканей (ближний инфракрасный диапазон), специфичностью к опухолевым мишеням и коллоидной стабильностью.

Краткое описание рисунков

Фиг. 1. График спектров поглощения и излучения в относительных единицах для конъюгатов по настоящему изобретению.

1 – диапазон длин волн подсветок стандартных эндоскопических, лапароскопических систем и роботов-хирургов с режимами автофлуоресценции и узкополосной фильтрации, оборудования для микроскопии;

2 – спектр эмиссии оборудования с LED-источниками света;

3 – спектр автофлуоресценции слизистой;

4 – спектр поглощения препарата на основе нанокристаллов;

5 – спектр эмиссии препарата;

6 – диапазон длин волн, где пики эмиссии являются предпочтительными.

Фиг. 2. Схема синтеза полимера ПТВП.

Фиг. 3. Схема синтеза полимера ПИМА.

Подробное раскрытие изобретения

Для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены некоторые термины, использованные в настоящем описании изобретения.

В описании данного изобретения термины «включает» и «включающий» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из».

Под «субъектом» следует понимать человека или другое млекопитающее.

Термин «антитело» эквивалентен термину «иммуноглобулин» и означает гликопротеин, состоящий из двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. VH и VL-области могут быть далее подразделены на гипервариабельные участки, именуемые областями, определяющими комплементарность (H-CDR и L-CDR), разделенные более консервативными областями, именуемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL область состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном (то есть, антигенсвязывающую часть антитела).

Термин «функциональный фрагмент антитела» в использованном здесь значении означает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, белком на поверхности опухолевой клетки). Примеры функциональных фрагментов включают (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одного плеча антитела; (iv) два домена Fv-фрагмента, VL и VH, объединённых при помощи синтетического линкера в одну белковую цепь, в которой VL и VH области спариваются с образованием одновалентной конструкции (известна как одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv); см., например, Bird et al., Science, 1988, 242:423-426). Также в изобретении может быть использован функциональный фрагмент биспецифического антитела, способного одновременно связывать две мишени. Указанные фрагменты антител получают обычными методами, известными специалистам в данной области.

Флуоресцентный препарат по настоящему изобретению может содержать от одного до нескольких функциональных фрагментов антител, каждый из которых способен специфически связываться по меньшей мере с одним определенным молекулярным маркером; таким образом, он будет содержать один или несколько антиген-связывающих участков. Функциональные фрагменты антител в

флуоресцентном препарате могут содержать как переменные, так и постоянные области молекул антител, а также состоять из полноразмерных молекул антител. Под полипептидом следует понимать любой пептид длиной более 10 аминокислот. В некоторых вариантах в качестве полипептида может быть использован альбумин.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель, растворитель и/или наполнитель» относится к таким носителям, растворителям и/или наполнителям, которые, являясь неактивными ингредиентами, в рамках проведенного медицинского заключения, пригодны для использования в контакте с тканями человека и животных без излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.д. и отвечают разумному соотношению пользы и риска. «Неактивные ингредиенты» входят в состав лекарственного средства или вакцинного препарата для улучшения его растворимости и/или стабильности, а также для улучшения фармакокинетики и более эффективной доставки к специфическим органам или тканям. Неактивные ингредиенты включают в себя множество веществ, известных специалистам в области фармацевтики, таких как вещества для контроля pH или осмотического давления, антибактериальные агенты, антиоксиданты, поверхностно активные вещества (например, полисорбат 20 или 80), криостабилизаторы, консерванты, растворители, загустители, наполнители, носители (микро- или нано-частицы) и другие вещества.

Задачей настоящего изобретения являлось создание диагностического агента на основе флуоресцентных нанокристаллов, характеризующегося высокой чувствительностью, специфичностью к мишеням и коллоидной стабильностью. Несмотря на большой потенциал, заключенный в функциональных характеристиках флуоресцентных нанокристаллов, на сегодняшний день нерешенными остаются проблемы, связанные с их низкой коллоидной стабильностью, накоплением в организме пациента, низким уровнем защиты нанокристалла полимерными оболочками и стабильностью самого кристалла, обуславливающие токсичность, что существенно ограничивает диапазон их потенциальных применений. Задача, решаемая в этом изобретении, позволит расширить доступный арсенал врачей и повысит эффективность диагностики и ревизии во время операций, в частности, при лечении онкологических заболеваний. Создаваемый диагностический препарат универсален и позволяет выявлять патологии различных областей с помощью стандартных устройств, использующиеся в эндоскопии, малоинвазивной хирургии, при открытых хирургических вмешательствах и лабораторных исследованиях. Также препарат способен обеспечивать мониторинг нескольких диагностических маркеров одновременно. Снижение конечной стоимости препарата будет достигаться за счет совместимости со стандартным оборудованием, используемым в клинике.

Для удовлетворения этим критериям препарат должен отвечать ряду необходимых требований. Во-первых, он должен иметь флуоресцентную метку с оптическими характеристиками, которые позволяют визуализировать молекулярные маркеры за счет преимущественного совпадения их спектра поглощения со спектром подсветки устройств. Во-вторых, препарат должен обеспечивать визуализацию патологического очага с высоким его контрастированием по сравнению с окружающей тканью. В-третьих, препарат в процессе использования должен визуализировать молекулярные маркеры с высокой чувствительностью, которая достигается эмиссией квантовых точек в зоне низкой автофлуоресценции тканей и их высоким квантовым выходом. В-четвертых, препарат должен быть простым и безопасным в использовании. В-пятых, препарат должен иметь в составе биомолекулы, которые обеспечивают специфичное связывание с молекулярными маркерами.

Конъюгат в составе заявляемого препарата для визуализации молекулярных маркеров, связанных с онкологическим заболеванием, имеет модульную структуру. В его состав входит фотостабильный флуоресцентный нанокристалл, проявляющий особые свойства в процессе флуоресценции за счет квантовых эффектов (образует квантовую точку). Этот нанокристалл покрыт полимерной оболочкой, обеспечивающей коллоидную стабильность. Далее, к этой оболочке прикреплены один или несколько полипептидов, способных специфически связываться по меньшей мере с одним из указанных молекулярных маркеров в организме субъекта. Для достижения технического результата необходимы все три описываемых элемента. Флуоресцентный нанокристалл обеспечивает уникальные оптические свойства, необходимые для визуализации молекулярных маркеров. Полипептиды, способные специфически связываться по меньшей мере с одним из указанных молекулярных маркеров, обеспечивают специфичность и препятствуют нежелательному накоплению препарата в нецелевых органах и тканях. Полимерная оболочка также является ключевым элементом конъюгата. Она должна отвечать следующим критериям: (1) иметь высокое сродство к поверхности нанокристалла; (2) обеспечивать коллоидную стабильность в широком диапазоне pH и концентраций соли; (3) обеспечивать достаточно малый гидродинамический диаметр препарата; (4) обеспечивать минимальное неспецифическое связывание с биологическими молекулами; (5) обладать приемлемыми характеристиками токсичности, аллергенности, канцерогенности и мутагенности; (6) обеспечивать простоту синтеза конъюгата нанокристалла с оболочкой; (7) иметь функциональные группы, доступные для конъюгации..

Конъюгация нанокристалла с оболочкой может происходить разными способами. Связывание может осуществляться электростатически, через

нековалентное взаимодействие биотин-авидин, ковалентно, посредством гидрофобного притяжения, связывание через полигистидиновую метку - использование комплекса гистидиновая метка-никель. Ковалентная конъюгация флуоресцентного нанокристалла основана главным образом на реакциях сшивки между аминами и карбоксильными группами, катализируемыми карбодиимидом; между аминами и сульфгидрильными группами, катализ малеимидом, либо между гидразиновой и альдегидной функциональными группами. Преимущество метода амин-карбоксил в том, что большинство белков содержат первичные амино- и карбоксильные группы и не требуют предварительной модификации. Напротив, сульфгидрильные группы редки в нативных биомолекулах и часто нестабильны в присутствии кислорода. Другой метод ковалентной сшивки включает окисление углеводных групп в Fc-фрагменте антител с образованием альдегидных групп, ковалентно связываемых с флуоресцентными нанокристаллами. Метод обеспечивает сайт-специфическую конъюгацию при простом соотношении флуоресцентный нанокристалл-антитело.

Выбор подходящего метода конъюгации зависит от функционализации поверхности флуоресцентных нанокристаллов. Предпочтительно ковалентное связывание за счет поперечной сшивки амино- и карбоксигрупп с карбодиимидом в качестве катализатора.

В качестве полипептидов, способных специфически связываться с молекулярными маркерами, могут быть использованы, например, моноклональные антитела, или их функциональные фрагменты, к таким известным специалистам в области онкологическим маркерам как АФП, СА 72-4, LASA-P, СА 242, СЕА, СА 19-9, СА 125, SCC, CYFRA 21-1, EGFR, VEGF, HER2, рецепторам альбумина, тиреоглобулина, β -ХГЧ, СА 15-3, СА 72-4, MCA, c-MET, CTLA-4. В качестве маркера может быть выбрана любая структура, специфически присутствующая на поверхности клеток опухолевых образований пациента, которая не обнаруживается в нормальных тканях того же типа. Это может быть белковая молекула, которая сверхэкспрессирована на поверхности опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками той же ткани. Также, это может быть небелковая структура, такая как например, ганглиозид GD2, преимущественно присутствующая на поверхности клеток опухолевых образований пациента.

Нанокристалл в составе конъюгата должен иметь максимум эмиссии флуоресценции в красной и ближней инфракрасной области и одновременно в диапазоне низкой автофлуоресценции биомолекул и тканей. Также, спектр поглощения излучения у нанокристалла позволяет эффективно возбуждать его подсветкой стандартного оборудования, обеспечивая совместимость с эндоскопическими, лапароскопическими системами, роботами-хирургами, операционными светильниками,

в том числе имеющие лазерную, LED, ксеноновую подсветку и режимы узкополосной фильтрации и автофлуоресценции, а также с оборудованием для микроскопии. Для выделения флуоресцентного сигнала и повышения эффективности детектирования молекулярных маркеров препарат может использоваться совместно со специальными устройствами и оборудованием, в том числе снабженными основными или дополнительными камерами и светофильтрами.

Флуоресцентный препарат для визуализации молекулярных маркеров может содержать более одного вида конъюгатов с флуоресцентными нанокристаллами (квантовыми точками), различающимися по длине волны излучения и соединенными с различными биомолекулами, таким образом позволяя осуществлять мультиплексные методы анализа с использованием одного источника излучения.

Флуоресцентный нанокристалл в составе конъюгата имеет полупроводниковое ядро и более двух широкозонных полупроводниковых оболочек. Ядро нанокристалла А представляет собой смешанное ядро из минимум трех различных элементов, одним из которых является S, Se, или Te и два другие выбраны из: P, Cd, Cu, In, Te, Zn, Mn; дополнительные оболочки нанокристалла Б и В, покрывающие ядро А, состоят из минимум двух элементов, один из которых S, Se, или Te и другой выбран из Cd или Zn; дополнительная оболочка нанокристалла Г, покрывающая оболочку В, либо состоит из минимум двух элементов, один из которых S, Se, или Te и другой выбран из Cd или Zn, либо отсутствует. Благодаря квантовым эффектам яркость свечения нанокристаллов оказывается настолько высокой, что позволяет детектировать единичные объекты с помощью обычного флуоресцентного микроскопа. Недостатками нанокристаллов CdSeTe, CuInS₂, CdSeMn и многих других является токсичность входящих в их состав ионов, что требует наращивания защитных оболочек. Дополнительные оболочки наночастиц также позволяют повышать их квантовый выход, увеличивать коллоидную стабильность и настраивать пик эмиссии в соответствии с необходимой длиной волны. Отбор оболочек был экспериментально подтвержден авторами путем синтеза отдельных флуоресцентных частиц и проверкой их характеристик.

На Рис.1 продемонстрирован принцип совместимости разрабатываемого диагностического агента со стандартным оборудованием: представлены диапазоны и спектры излучения стандартного оборудования 1,2,6 и предпочтительные диапазоны и спектры поглощения 4,7 и излучения 5,6 флуоресцентных нанокристаллов, входящих в препарат, в зоне низкой автофлуоресценции 3.

Флуоресцентный препарат содержит по крайней мере один вид конъюгатов, состоящих по крайней мере из одного вида биомолекул и по крайней мере одного вида фотостабильных водорастворимых флуорофоров (флуоресцентных нанокристаллов),

выполняющих роль меток и соединенные между собой множественными ковалентными связями, причем в качестве биомолекул могут использоваться антитела или их функциональные фрагменты (Fab, scFv, и т.д.), или другие соединения, например, молекулы белков или пептидов, способные избирательно связываться со структурами на поверхности клеток опухолевых образований, таким образом позволяющие связаться флуоресцентной метке со структурами опухолевых образований, при этом нанокристаллы имеют биосовместимую полимерную оболочку с квантовым выходом более 45% предпочтительно с максимумом эмиссии 5 в диапазоне красного и ближнего инфракрасного излучения 6 и одновременно в диапазоне низкой автофлуоресценции биомолекул и тканей 3 и спектр поглощения излучения 4, позволяющий их эффективно возбуждать подсветкой стандартного оборудования в диапазоне 1, в том числе с помощью устройств, имеющих подсветку на основе LED 2.

В соответствии с изобретением, дополнительным решением для повышения эффективности детектирования молекулярных маркеров, препарат совместим со специальными устройствами и оборудованием, в том числе снабженных основными или дополнительными камерами и светофильтрами для выделения флуоресцентного сигнала. Также препарат может использоваться совместно с аналогичными или другими препаратами, позволяя осуществлять мультиплексные методы анализа.

Для получения препарата по настоящему изобретению используется следующая общая схема (технологическая цепочка):

1. Синтез ядер флуоресцентных нанокристаллов.
2. Нарастивание полупроводниковых оболочек.
3. Выделение и очистка флуоресцентных нанокристаллов, их характеристикация.
4. Синтез водорастворимого полимера для создания полимерной водорастворимой оболочки, имеющей функциональные группы для конъюгации с биомолекулами за счет ковалентного взаимодействия.
5. Формирование полимерной оболочки поверх флуоресцентных нанокристаллов. Выделение и очистка флуоресцентных нанокристаллов в оболочке, их характеристикация.
6. Приготовление конъюгатов, их выделение, очистка, характеристикация. Оценка аффинности биомолекул в конъюгате.
7. Приготовление буфера для хранения конъюгатов. Герметичная упаковка, маркировка и помещение в место хранения.

В любом из пунктов возможно использование дополнительных контрольных точек, подтверждающих качество препарата и его промежуточных продуктов.

Наращивание полимерных оболочек флуоресцентных нанокристаллов преследует следующие цели: обеспечение растворимости флуоресцентных нанокристаллов в заданном растворителе; предотвращение агрегации и осаждения флуоресцентных нанокристаллов; введение необходимых функциональных групп для последующей конъюгации биоконпонентов. Общая стратегия придания флуоресцентным нанокристаллам растворимости в воде включает замену исходных гидрофобных лигандов лигандами, имеющими, с одной стороны, химические группы, способные связываться с поверхностью нанокристалла (тиолы, амины, фосфины, карбоксильные группы, пиридины), с другой - полярные группы (например, гидроксильные), направленные в водную фазу. Другой подход основан на сохранении оригинальных лигандов и создании оболочки из амфифильных молекул или полимеров, имеющих гидрофобные группы для связи с оригинальными лигандами, и гидрофильные группы, обеспечивающие растворимость в воде.

В качестве мультидентатных лигандов используют пептиды; олигомерные фосфины; гидрофильные политиолы, содержащие полиэтиленгликоль (ПЭГ), амино- или карбоксильные группы в боковых цепях. ПЭГ обеспечивает растворимость в водном растворе и стабильность в широком диапазоне pH и концентраций солей, амино- или карбоксильные группы удобны для конъюгации. Описано использование низкомолекулярной полиакриловой кислоты, функционализированной в боковых цепях метокси-, амино-, азидо-, тиоктовыми группами и ПЭГ. Фрагменты тиоктовой кислоты после восстановления до дигидролипоевой кислоты обеспечивают эффективную связь с флуоресцентными нанокристаллами, ПЭГ придает растворимость в воде, амино- и азидные группы используются для дальнейшей функционализации.

Возможные полипептиды, способные специфически связываться со структурами на поверхности клеток опухолевых образований: моноклональные полноразмерные антитела (например, IgG), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела, ScFv фрагменты, Fab фрагменты, другие функциональные конструкции на основе фрагментов иммуноглобулинов, трехвалентные фрагменты антител, фрагменты специфических рецепторов к поверхностным белкам, альбумин, специфические пептиды.

Нижеследующие примеры приведены в целях раскрытия характеристик настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Синтез смешанных ядер или оболочек флуоресцентного кристалла.

Синтез смешанных ядер проводится при постоянном интенсивном перемешивании и в инертной атмосфере аргона или азота. Отдельно готовятся необходимые растворы веществ, участвующих в реакции, приводящей к образованию целевых нанокристаллов (прекурсоров). Прекурсоры готовятся растворением рассчитанного количества в растворителе, например, триоктилфосфин (ТОФ), триоктилфосфиноксид (ТОФО), трибутилфосфин (ТБФ), 1-октадецен (от 0,5 ммоль до 1,5 М раствор), предпочтительно ТОФ, 1-октадецен. Для этого смесь сначала продувается аргонном или азотом, затем выдерживается в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С до получения прозрачного раствора.

Для синтеза ядер со смешанными оболочками в трехгорлую колбу помещается прекурсор основного вещества (от 0,5 до 5 ммоль), 4 г стабилизатора, предпочтительно октадецилфосфоновой кислоты (ОДФК) и 30 г триоктилфосфина оксида (ТОФО). Раствор нагревается от 200 до 320 °С при перемешивании и выдерживается до полного растворения прекурсора основного вещества. Добавляется 10 мл триоктилфосфин (ТОФ) и поднимается температура от 250 до 380 °С. Затем в реакционную массу вводится 5 мл приготовленного прекурсора второго основного вещества с различным молярным содержанием халькогенидов. Затем нагрев убирается и смесь охлаждается до комнатной температуры. После охлаждения реакционной смеси очистка полученных ядер производится путем двукратного переосаждения нанокристаллов метанолом из смеси толуол-бутанол 1:1, конечный продукт растворяется в толуоле.

Примеры параметров синтезированных смешанных ядер со смешанными оболочками приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Варианты смешанных ядер с использованием элементов Mn или Te.

Содержание прекурсора Te, третьего элемента, % мол. к Se	Длина волны максимума флуоресценции смешанных ядер CdTeSe, нм	Длина волны максимума флуоресценции после наращивания оболочек CdS/CdZnS/ZnS, нм	Квантовый выход нанокристалла CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS, %
3	650	680	80
4	690	700	55
7	720	740	45

Содержание прекурсора Mn, третьего элемента, % мол. к S	Длина волны максимума флуоресценции ядер ZnMnS, нм	Длина волны максимума флуоресценции после наращивания оболочек CdS/CdZnS/ZnS, нм	Квантовый выход нанокристалла ZnMnS/CdS/CdZnS/ZnS, %
3	590	620	38

4	590	620	45
5	590	620	40

Пример 2. Синтез смешанных ядер флуоресцентных нанокристаллов

Синтез смешанных ядер CdTeSe нанокристаллов проводится в инертной атмосфере аргона или азота. Отдельно готовятся растворы прекурсоров Se и Te. Прекурсор Se (1.5 М раствор в ТОФ) готовится растворением рассчитанного количества Se в ТОФ. Для этого смесь сначала продувается аргоном или азотом, затем выдерживается в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С до получения прозрачного раствора. Прекурсор Te (1 М раствор в ТОФ) готовится аналогично прекурсоры Se.

В трехгорлую колбу помещается прекурсор Cd 0.6 г (4.7 ммоль), 4 г ОДФК и 30 г ТОФО. Раствор нагревается от 320 до 380 °С и выдерживается до полного растворения кадмия. Добавляется 10 мл ТОФ и поднимается температура до 380 °С.

Затем в реакционную массу вводится 5 мл приготовленного прекурсора Se с прекурсором Te. Затем нагрев убирается и смесь охлаждается. После охлаждения реакционной смеси очистку полученных ядер производят путем двукратного переосаждения нанокристаллов метанолом из смеси толуол–бутанол, конечный продукт растворяется в толуоле.

Пример 3. Синтез смешанных ядер флуоресцентных нанокристаллов

Синтез смешанных ядер CuInS₂ или CuInSe₂ нанокристаллов проводится в инертной атмосфере аргона или азота. Отдельно готовятся растворы прекурсоров S, Se, или Te. Прекурсор S, Se, или Te (от 1 до 1.5 М раствор) готовится растворением рассчитанного количества S, Se, или Te в растворителе, предпочтительно ТОФ или 1-октадецене, олеиновой кислоты и 1-додекантиола. Для этого смесь сначала продувается аргоном или азотом, затем выдерживается в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С до получения прозрачного раствора. Прекурсор In (1 М раствор) готовится аналогично прекурсоры S или Se.

В трехгорлую колбу помещается прекурсор Cu (от 0,5 до 1,5 ммоль), 4 г ОДФК и 30 г ТОФО или 20 мл 1-октадецена и 0,5 мл олеиновой кислоты и 0,5 мл 1-додекантиола. Раствор нагревается от 200 до 320 °С.

Затем в реакционную массу вводится 5 мл приготовленного прекурсора S или Se с прекурсором In. Затем нагрев убирается и смесь охлаждается. После охлаждения реакционной смеси очистку полученных ядер производят путем двукратного переосаждения нанокристаллов метанолом из смеси толуол–бутанол, конечный продукт растворяется в толуоле.

Пример 4. Синтез смешанных ядер флуоресцентных нанокристаллов

Синтез смешанных ядер CdZnCuS нанокристаллов проводится в инертной атмосфере аргона или азота. Отдельно готовятся растворы прекурсоров S, или Cu. Прекурсоры Cd, Zn и Cu в молярном отношении 2:1:0,05 готовятся растворением рассчитанного количества Cd, Zn и Cu в растворителе, предпочтительно ТОФ или 1-октадецене, олеиновой кислоты и 1-додекантиола. Для этого смесь сначала продувается аргоном или азотом, затем выдерживается в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С до получения прозрачного раствора. Затем pH раствора доводится до 8 и нагревается до 100 °С.

Затем вводится прекурсор S (в молярном отношении к Cd 1:1). Затем нагрев убирается и смесь охлаждается. После охлаждения реакционной смеси очистку полученных ядер производят путем двукратного переосаждения нанокристаллов метанолом из смеси толуол–бутанол, конечный продукт растворяется в толуоле.

Пример 5. Синтез нанокристаллов с оболочками из двух элементов

Для наращивания оболочки CdS на смешанные ядра, например, CdTeSe, отдельно готовятся необходимые растворы прекурсоров металлов и халькогенов. Для наращивания оболочек CdS на ядра используют методику, приведенную в источнике (Chen O., et al, *Nature Materials*. 2013. V. 12. P. 445–451), рассчитывая объемы прекурсоров на по крайней мере один монослой с учетом разбавления. После этого производят очистку и переосаждение полученных частиц аналогично очистке ядер.

Пример 6. Синтез нанокристаллов с оболочками из двух элементов и с смешанными оболочками.

Для синтеза нанокристаллов CdTeSe/CdS/CdZnS с дополнительными смешанными оболочками CdZnS готовится раствор прекурсоров Cd, Zn и S. Далее проводят поочередный ввод смеси прекурсоров Cd и Zn для наращивания по крайней мере одного монослоя оболочки. Необходимые количества всех прекурсоров заранее рассчитываются по методу молекулярного наслаивания (SILAR), исходя из количества исходных нанокристаллов. Смесь прекурсоров металлов вводится быстро, а прекурсор S – по каплям. По окончании синтеза реакционную смесь охлаждают, затем производят очистку и переосаждение полученных частиц аналогично описанному выше.

Пример 7. Синтез нанокристаллов CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS с дополнительными оболочками из двух элементов.

Для получения нанокристаллов структурой CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS в колбу помещают октадецен, триоктилфосфин, рассчитанное количество

диэтилдитиокарбамата цинка, раствор ацетат цинка в смеси олеиламина и октадецена. Необходимые количества прекурсоров заранее рассчитывают на по крайней мере один монослой по методу молекулярного наслаивания (SILAR), исходя из количества исходных частиц. По окончании синтеза реакцию смесь охлаждают, затем производят очистку и переосаждение полученных частиц аналогично описанному выше.

Пример 8. Синтез полимерной оболочки ПТВП.

Для синтеза полимерной оболочки из поливинилпирролидон-ко малеиновой кислоты - ко этиленгликоль диакрилата терминированный 1,6 гександитиолом (ПТВП, Фиг. 2) на первом этапе синтезируется полимер винилпирролидона и малеинового ангидрида в присутствии инициатора 4,4-азобис(4-валериановой кислоты) с последующим добавлением диметакрилата этиленгликоля в виде разветвляющего агента в одной реакционной смеси без выделения промежуточных продуктов. После добавления избытка 1,6-гександитиола в системе проводят радикальное присоединение тиолов к алкенам, образующие тиолсодержащие остатки сополимера. После проводится модификация нанокристаллов и гидролиз в водной среде в присутствии гидроксида тетраметиламмония.

Пример 9. Синтез других полимерных оболочек нанокристаллов.

Синтез полимерной оболочки на основе поли(изобутилен-альт-малеинового ангидрида), терминированного n-октиламином и 1,6 гександитиолом (ПИМА). Синтез проводится в трехгорлой колбе, снабженной термометром, вакуумным адаптером и воздушным конденсатором. В колбу добавляют 2 г поли(изобутилен-альт-малеинового ангидрида) и дегазируют под вакуумом в течение часа, затем продувают аргоном или азотом. Через перегородку в колбу вводят 500 мл тетрагидрофурана (ТГФ), 1,7 мл N,N-диизопропилэтиламина (ДИПЭА) и 0,8 мл октиламина и, с помощью масляной ванны, нагревают до 60 °С, активно перемешивая в течение 1ч. После охлаждения системы до 30 °С проводится радикальное присоединение 1,6- гександитиола, путем добавления его в реакционную смесь (не более 25 моль%). Реакционную смесь перемешивают в течение 12 ч при температуре 30 °С и с помощью роторного испарителя удаляют остатки ТГФ и ДИПЭА. Впоследствии производят очистку полимера методом диализа. Конечный продукт растворяется в воде (Фиг. 3).

Конъюгирование происходит посредством гидрофобного взаимодействия между поверхностью нанокристалла функционализированной триоктиофосфиноксидом (ТОФО) и молекулами ПИМА. Для этого готовится смесь из 10 мл водного раствора ПИМА (2 мг/мл), 1 мл растворённых в хлороформе модифицированных ТОФО нанокристаллов (10 мг/мл) и 1 мл метанола. Полученная смесь центрифугируется при

9000 г в течение часа, осадок растворяется в 20 мл ТГФ и переносится в 100 мл круглодонную колбу, в которую также вводят 10 мл водного раствора ПИМА (2 мг/мл). С помощью роторного испарителя удаляется ТГФ; при испарении ~ 80% ТГФ к смеси добавляется 30 мл воды. Во время этой операции ПИМА плотно обертывает нанокристаллы. Хорошим показателем прогресса является мутность раствора, которая исчезнет, когда большие агрегаты полимера конъюгируют с нанокристаллами. Полученный раствор фильтруется через мембранный 0,22 мкм ПЭС (полиэфирсульфон) фильтр, а затем через 0,1 мкм гидрофильный фильтр ПВДФ (поливинилденфторид).

Пример 10. Синтез полимерных оболочек нанокристаллов и конъюгатов на их основе.

Для синтеза полимерной оболочки из диоксида кремния сначала смешивается 1 мл гексана, 0,32 мл додецилового эфира полиэтиленгликоля и 50 мл воды и перемешивается в течение 30 мин. Затем медленно добавляется 1 наномоль нанокристаллов в хлороформе. Через 30 мин добавляется 30 мл тетраэтила ортосиликата с последующим добавлением 10 мл раствора аммиака. После реакции добавляется органический растворитель, предпочтительно этанол, проводят центрифугирование и промывку осадка гексаном и после – водой. Затем выдерживается в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С до получения прозрачного раствора. В состав оболочки из оксида кремния могут быть включены производные триметоксисилана, предпочтительно 3-меркаптопропилтриметоксисилан (MPS) или 3-аминопропилтриметоксисилан (APS).

Для функционализации нанокристаллов проводится совместная конденсация CEST, 3-(глицидилоксипропил) триэтоксисилан или 3-аминопропил-триэтоксисилан с тетраэтоксисиланом. 1,5 мл CEST, 3-(глицидилоксипропил) триэтоксисилан или 3-аминопропил-триэтоксисилан добавляли к микроэмульсии через 24 часа старения и оставляли на еще 24 часа перемешивания с последующим процессом очистки, описанным в предыдущем разделе.

Затем добавляли 2-[метокси(полиэтиленокси)пропил]триметоксисилан (3 мл) и через 24 часа проводили отделение и промывку 3 раза гексаном и 5 раз водой с использованием высокоскоростного центрифугирования. Затем выдерживали в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С до получения прозрачного раствора.

Синтез конъюгатов нанокристаллов с полипептидами производят следующим образом. Конъюгирование полипептида проводится с очищенными флуоресцентными нанокристаллами с использованием N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид гидрхлорид. N-гидроксисукцинимид добавляется в реакцию при конечной

концентрации 1,5 мМ. 500 мкл 3 мМ раствора нанокристаллов смешивается с N-гидроксисукцинимид, затем к реакционной смеси добавляется N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид. Примерно через 15 мин добавляется раствор биомолекул, после чего инкубируют в темноте в течение 2 ч при 25 °С с осторожным встряхиванием. Избыток активных веществ нейтрализуют добавлением трис (10 мМ). Реакция конъюгации проводится при pH 7,5 в буфере PBS с последующей очисткой с помощью гель-фильтрации или гель-электрофореза.

Пример 11. Физические свойства конъюгатов и входящих в их состав флуоресцентных частиц.

Элементный анализ полимера проводится на автоматическом анализаторе CE1106 (Италия). Ниже приведены режимные параметры при автоматическом определении углерода, водорода, азота (CHN). Величина навески образца составляла 0,8-1мг. Температура сжигания образца составляла 1050°С. В момент вспышки в кислороде пробы, находящейся в оловянной капсуле, достигается температура 1800°С. Кислород дозируется петлевым дозатором. Сожжение происходит в потоке гелия как транспортного газа, расход гелия - 120мл/мин. Время полного цикла анализа составляло 10мин. Разделение продуктов деструкции (азота, углекислоты и воды) происходит газохроматографически на ГХ-колонке прибора в потоке гелия. В качестве детектора используют катарометр.

Расчет содержания CHN производится автоматически программным обеспечением прибора. В программе учитываются предварительно установленные по стандартным образцам калибровочные коэффициенты, результаты холостого опыта и величина навески. Ошибка метода составляла 0,30-0,50% абс.

Для характеристики препарата использовали следующие методы:

1) Определение квантового выхода (КВ) полученных частиц проводится, следуя рекомендациям производителя спектрофлуориметра. В качестве флуоресцентного стандарта использовали фталоцианин цинка в 1 % растворе пиридина в толуоле ($\lambda_{em} = 680$ нм, КВ - 30%).

2) Чтобы получить количественные результаты Lateral flow assay - иммунохроматографического анализа (LFA) интенсивности контрольных линий и фона измеряли с использованием флуориметра, снабженного аксессуаром для держателя твердого образца. Интеграция сигнала флуоресценции выполнялась в диапазоне $\lambda_{em} \pm 0,5$ полная ширина на уровне половинной амплитуды (англ. FWHM — full width at half maximum), где λ_{em} - максимум излучения флуоресцентных кристаллов, а FWHM соответствует полной ширине с половиной максимума, как показано в Таблице 2.

Повторные измерения образцов проводились после облучения ультрафиолетовым светом (312 нм) 225 мВт*см⁻² в интервале времени 1-160 мин.

Таблица 2. Флуоресцентные свойства нанокристаллов и конъюгатов на их основе.

Состав нанокристалла	Максимум эмиссии, нм	Квантовый выход нанокристаллов до/после гидрофилизации, %	Квантовый выход конъюгатов А/Б/В/Г/ПО/П, где П - антитела, %	FWHM, нм)
CdTeSe/CdS/ZnS	640	71/70	64	35
CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS	680	83/80	45	45

3) гидродинамический диаметр частиц определяли на Malvern Zetasizer S (Malvern). 0,05 М Трис или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) добавляли в виде растворителя. Зета-потенциал наночастиц измеряли с помощью Malvern Zetasizer Z. Измеренные параметры синтезированных конъюгатов показаны в Таблице 3 (измерение проводили при pH 8.0 в PBS).

Таблица 3. Измеренные параметры синтезированных конъюгатов.

Формула нанокристалла	Диаметр флуоресцентных нанокристаллов, нм	Гидродинамический диаметр нанокристаллов, покрытых полимерной оболочкой, нм/ ζ-потенциал, мв	Гидродинамический диаметр конъюгатов А/Б/В/Г/ПО/П, где П - антитела, нм/ ζ-потенциал, мв
CdTeSe/CdS/ZnS	11.5	24/ -39	39/ -25
CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS	9.5	18/ -35	30/ -17

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Флуоресцентный препарат для визуализации структур, присутствующих на поверхности клеток опухолевых образований, при введении субъекту, включающий по меньшей мере один конъюгат, состоящий из фотостабильного флуоресцентного нанокристалла, покрытого полимерной оболочкой, с которой ковалентно связаны один или несколько полипептидов, способных специфически связываться по меньшей мере с одной из указанных структур на поверхности клеток опухолевых образований в организме субъекта, при этом

структура конъюгата выражается общей формулой А/Б/В/Г/ПО/П, где ядро нанокристалла А представляет собой смешанное ядро из минимум трех различных элементов, одним из которых является S или Se, и два другие выбраны из: P, Cd, Cu, In, Te, Zn, Mn;

дополнительные оболочки нанокристалла Б и В, покрывающие ядро А, состоят из минимум двух элементов, один из которых S или Se, и другой выбран из Cd или Zn;

дополнительная оболочка нанокристалла Г, покрывающая оболочку В, либо состоит из минимум двух элементов, один из которых S или Se, и другой выбран из Cd или Zn, либо отсутствует;

химический состав ядра А не совпадает с составом оболочки Б, состав оболочки Б не совпадает с составом оболочки В, и состав оболочки В не совпадает с составом оболочки Г;

полимерная оболочка ПО обладает гидрофильной поверхностью и высокой биосовместимостью;

полипептид П способен специфически связываться с одной из указанных структур на поверхности клеток опухолевых образований;

флуоресцентный нанокристалл в составе конъюгата имеет квантовый выход более 45%, максимум поглощения в диапазоне 390-460 нм и максимум эмиссии в диапазоне 660-720 нм.

2. Флуоресцентный препарат по п. 1, характеризующийся тем, что полипептиды, способные специфически связываться с указанными структурами на поверхности клеток опухолевых образований, представляют собой функциональные фрагменты антител, способные специфически связываться с указанными структурами на поверхности клеток опухолевых образований.

3. Флуоресцентный препарат по п. 1, характеризующийся тем, что флуоресцентный нанокристалл соединён с полимерной оболочкой при помощи ковалентной связи.

4. Флуоресцентный препарат по п. 1, характеризующийся тем, что флуоресцентный нанокристалл в составе конъюгата имеет квантовый выход более 80%.

5. Флуоресцентный препарат по п. 1, дополнительно включающий фармацевтически приемлемый растворитель.

6. Флуоресцентный препарат по п. 1, характеризующийся тем, что ядро нанокристалла А выбрано из следующих вариантов ядер: CdTeSe, CuInS₂, ZnMnS, CdZnCuS.

7. Флуоресцентный препарат по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве полимерной оболочки используют полимер ПТВП или ПИМА.

8. Флуоресцентный препарат по п. 2, характеризующийся тем, что функциональные фрагменты антител представляют собой функциональные фрагменты биспецифических антител, способные специфически связываться с двумя различными структурами на поверхности клеток опухолевых образований.

9. Флуоресцентный препарат по п. 1, включающий по меньшей мере два конъюгата, каждый из которых имеет структуру согласно формуле А/Б/В/Г/ПО/П, при этом полипептиды П в данных конъюгатах имеют сродство к двум различным структурам на поверхности клеток опухолевых образований, и флуоресцентные нанокристаллы в данных конъюгатах при облучении светом, имеющим длину волны в диапазоне 390–460 нм, имеют максимумы эмиссии на различных длинах волн, таким образом обеспечивая одновременную визуализацию двух указанных структур на поверхности клеток опухолевых образований.

10. Флуоресцентный препарат для визуализации структур на поверхности клеток опухолевых образований в биологических образцах субъекта, включающий по меньшей мере один конъюгат, состоящий из фотостабильного флуоресцентного нанокристалла, покрытого полимерной оболочкой, с которой ковалентно связаны один или несколько полипептидов, способных специфически связываться по меньшей мере с одной из указанных структур на поверхности клеток опухолевых образований, при этом структура конъюгата выражается общей формулой А/Б/В/Г/ПО/П, где ядро нанокристалла А представляет собой смешанное ядро из минимум трех различных элементов, одним из которых является S или Se, и два другие выбраны из: P, Cd, Cu, In, Te, Zn, Mn;

дополнительные оболочки нанокристалла Би В, покрывающие ядро А, состоят из минимум двух элементов, один из которых S или Se, и другой выбран из Cd или Zn;

дополнительная оболочка нанокристалла Г, покрывающая оболочку В, либо состоит из минимум двух элементов, один из которых S или Se, и другой выбран из Cd или Zn, либо отсутствует;

химический состав ядра А не совпадает с составом оболочки Б, состав оболочки Б не совпадает с составом оболочки В, и состав оболочки В не совпадает с составом оболочки Г;

полимерная оболочка ПО обладает гидрофильной поверхностью и высокой биосовместимостью;

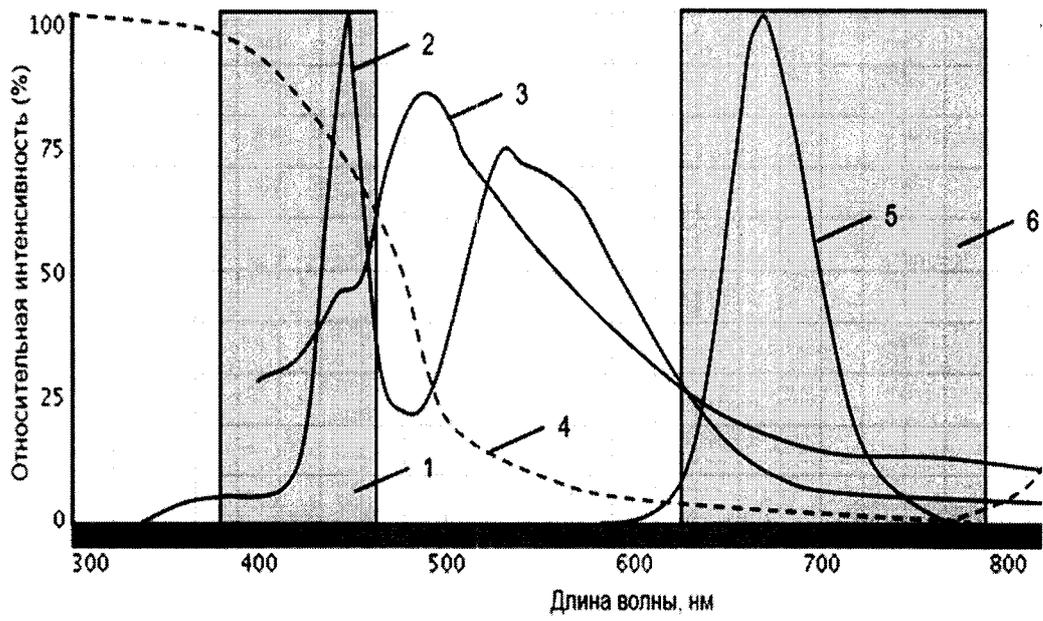
полипептид П способен специфически связываться с одной из указанных структур на поверхности клеток опухолевых образований;

флуоресцентный нанокристалл в составе конъюгата имеет квантовый выход более 45%, максимум поглощения в диапазоне 390-460 нм и максимум эмиссии в диапазоне 660-720 нм.

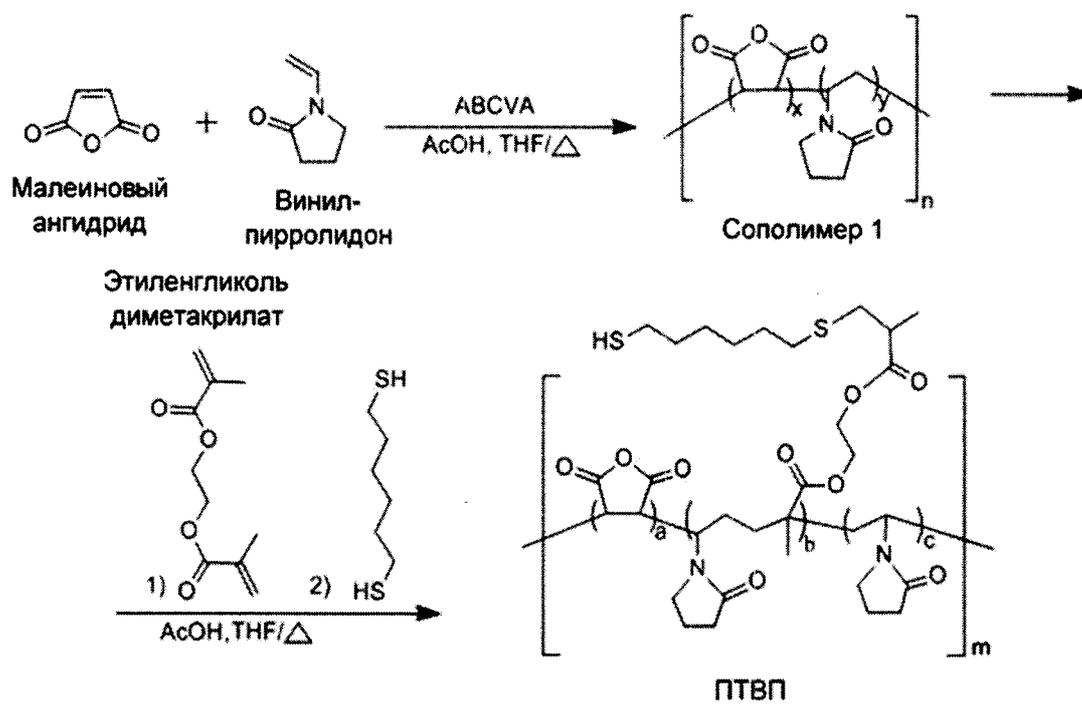
11. Флуоресцентный препарат по п. 10, характеризующийся тем, что полипептиды, способные специфически связываться с указанными структурами на поверхности клеток опухолевых образований, представляют собой функциональные фрагменты антител, способные специфически связываться с указанными структурами на поверхности клеток опухолевых образований.

12. Флуоресцентный препарат по п. 10, характеризующийся тем, что ядро нанокристалла А выбрано из следующих вариантов ядер: CdTeSe, CuInS₂, ZnMnS, CdZnCuS.

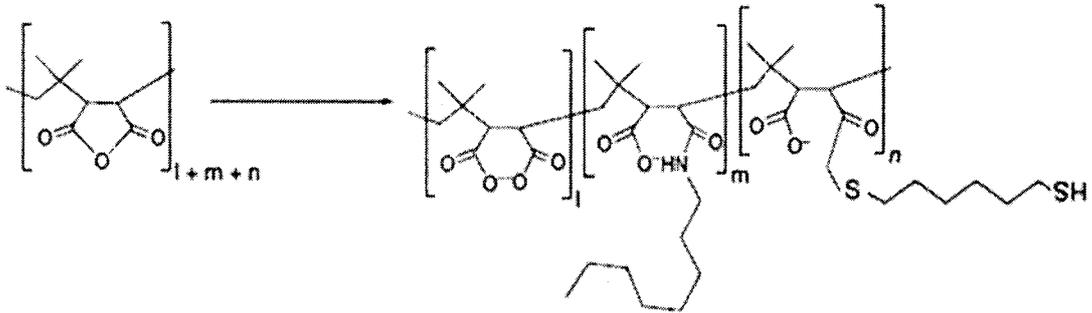
13. Флуоресцентный препарат по п. 10, включающий по меньшей мере два конъюгата, каждый из которых имеет структуру согласно формуле А/Б/В/Г/ПО/П, при этом полипептиды П в данных конъюгатах имеют сродство к двум различным структурам на поверхности клеток опухолевых образований, и флуоресцентные нанокристаллы в данных конъюгатах при облучении светом, имеющим длину волны в диапазоне 390-460 нм, имеют максимумы эмиссии на различных длинах волн, таким образом обеспечивая одновременную визуализацию двух указанных структур на поверхности клеток опухолевых образований.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201800319

Дата подачи: 04 июня 2018 (04.06.2018)

Дата испрашиваемого приоритета:

Название изобретения: Флуоресцентный препарат для визуализации молекулярных маркеров и способы их детектирования

Заявитель: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ЛЮМЛАЙН"

Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)

Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК: (см. дополнительный лист) СПК: (см. дополнительный лист)

Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)

A61K 49/06, B82Y 40/00, C09K 11/08, 11/54, 11/56, 11/57, 11/88, C01N 21/76

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	БРАЖНИК К.И. и др. Новые направления в исследовании и ранней диагностике рака с применением детекционных систем на основе флуоресцентных нанокристаллов. Российский биотерапевтический журнал, 2013, № 3, с. 11-24	1-13
Y	Т.А. ЗДОБНОВА и др. Квантовые точки для молекулярной диагностики опухолей. ACTA NATURAE, 2011, Том. 3, № 1 (8), с. 30-50	1-13
Y	US 2016/0200974 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 14.07.2016, формула	13
A	US 2018/0133345 A1 (NANOCO TECHNOLOGIES LTD.) 17.05.2018, реферат, формула	1-13
A	US 2014/0255316 A1 (NEXDOT) 11.09.2014, реферат, формула	1-13

последующие документы указаны в продолжении графы В

данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники
 "Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
 "О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
 "Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета
 "D" документ, приведенный в евразийской заявке

"I" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
 "X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
 "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
 "&" документ, являющийся патентом-аналогом
 "L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска: 16 августа 2018 (16.08.2018)

Наименование и адрес Международного поискового органа:
**Федеральный институт
 промышленной собственности**
 РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб.,
 д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:


 Л. Н. Губченко
 Телефон № (499) 240-25-91

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

Номер евразийской заявки:

201800319

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК:

A61K 49/06 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

C09K 11/08 (2006.01)

C09K 11/54 (2006.01)

C09K 11/56 (2006.01)

C09K 11/57 (2006.01)

C09K 11/88 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

СПК:

A61K 49/0067 (2013.01)

B82Y 5/00 (2017.08)

B82Y 40/00 (2017.08)

C09K 11/08 (2016.05)

C09K 11/54 (2013.01)

C09K 11/56 (2013.01)

C09K 11/57 (2013.01)

C09K 11/88 (2013.01)

G01N 21/76 (2013.01)