# POCCINICKASI DELLEPALLINS



路路路路路路

路路路路

松

密

松

路

松

路

松

松

路路

母

路路

母

路

松

松

松

路

母

母

路路路

路路

松

松

路

松

路

密

松

松

怒

松

路

路

盎

母

на изобретение

№ 2629390

Фотосенсибилизатор на основе полупроводниковых квантовых точек и хлорина еб

Патентообладатель: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики" (Университет ИТМО) (RU)

Авторы: *см. на обороте* 

路路路路路路

松

松

松

松

松

密

松

松

盘

路

松

路路

松

松

路路

松

盎

母

松

母

路

松

路

路

路路

路

路

松

松

松

Заявка № 2015156764

Приоритет изобретения 28 декабря 2015 г. Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 29 августа 2017 г. Срок действия исключительного права на изобретение истекает 28 декабря 2035 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Telles

Г.П. Ивлиев

9

ယ

9



(51) M<sub>П</sub>K A61K 33/00 (2006.01)

#### ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

#### (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015156764, 28.12.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 28.12.2015

Дата регистрации: 29.08.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2015

(43) Дата публикации заявки: 04.07.2017 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 29.08.2017 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Баранов Александр Васильевич (RU), Вишератина Анастасия Константиновна (RU),

Громова Юлия Александровна (RU), Гунько Юрий Кузьмич (IE), Маслов Владимир Григорьевич (RU), Орлова Анна Олеговна (RU), Фёдоров Анатолий Валентинович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики" (Университет ИТМО) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: V. MARTYNENKO et al. Energy transfer in complexes of water-soluble quantum dots and chlorin e6 molecules in different environments. Beilstein J. Nanotechnol. 2013, 4, 895-;902, найдено в Интернет 09.09.2016 г. на http://www.beilstein-journals.org/bjnano/ single/articleFullText.htm?publicId=2190-4286-4-101. G. CHARRON et al. Insights into the (см. прод.)

(54) Фотосенсибилизатор на основе полупроводниковых квантовых точек и хлорина еб

(57) Реферат:

ത

ത

2

9

2

Изобретение относится к медицине и касается фотосенсибилизатора на основе полупроводниковых квантовых точек и хлорина содержащего ковалентно связанные комплексы полупроводниковых квантовых точек и хлорина еб, где комплексы состоят из хиральных полупроводниковых квантовых точек группы А2В6 и молекул хлорина е6 в мономерной форме с возможностью селективного накопления фотосенсибилизатора в трансформированных клетках. Изобретение обеспечивает увеличение селективности накопления фотосенсибилизатора в трансформированных клетках. 1 з.п. ф-лы, 11 ил. 3 пр.

(56) (продолжение):

Mechanism of Quantum Dot-Sensitized Singlet Oxygen Production for Photodynamic Therapy. J. Phys. Chem. C, 2012, 116 (16), pp 9334-9342. RU2467777 C1, 27.11.2012. ШАТСКИХ Т.С. Фотофизические процессы в гибридных ассоциатах коллоидных квантовых точек CdS с молекулами метиленового голубого. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук.

æ ⊂

2629390

C

N

Стр.: 2

2

S

2629390

#### **RUSSIAN FEDERATION**



(19) **RU** (11)

**2 629 390**<sup>(13)</sup> **C2** 

(51) Int. Cl. **A61K 33/00** (2006.01)

## FEDERAL SERVICE FOR INTELLECTUAL PROPERTY

#### (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2015156764, 28.12.2015

(24) Effective date for property rights:

28.12.2015

Registration date: 29.08.2017

Priority:

(22) Date of filing: 28.12.2015

(43) Application published: 04.07.2017 Bull. № 19

(45) Date of publication: 29.08.2017 Bull. № 25

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

Baranov Aleksandr Vasilevich (RU), Visheratina Anastasiya Konstantinovna (RU), Gromova Yuliya Aleksandrovna (RU), Gunko Yurij Kuzmich (IE), Maslov Vladimir Grigorevich (RU), Orlova Anna Olegovna (RU), Fedorov Anatolij Valentinovich (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Sankt-Peterburgskij natsionalnyj issledovatelskij universitet informatsionnykh tekhnologij, mekhaniki i optiki" (Universitet ITMO) (RU)

N

တ

N

9

ယ

9

 $\left(54\right)\,$  Photosensibile on the basis of semiconductor quantum points and chlorine E6

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to a photosensitizer based on semiconductor quantum dots and chlorin e6 containing covalently bound complexes of semiconductor quantum dots and chlorin e6, where the complexes consist of chiral semiconductor quantum

dots of the A2B6 group and chlorine e6 molecules in monomeric form with the possibility of selective photosensitizer accumulation in transformed cells.

EFFECT: increased selectivity of photosensitizer accumulation in transformed cells.

2 cl, 11 dwg, 3 ex

2

62939

⊐ ~ Изобретение относится к области противоопухолевых средств, в частности к лекарственным препаратам, совмещающим неорганические и органические активные ингредиенты, которые могут быть использованы для диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Известен широкий круг лекарственных препаратов на основе органических 5 фотосенсибилизаторов для лечения и диагностики онкозаболеваний: «Фотосенсибилизатор и способ его получения» (Патент РФ №2183956 С1, МПК А61К 31/409, А61Р 35/00, заявка 2001108397/14, дата публикации 27.06.2002, дата подачи заявки 30.03.2001, «Препарат для фотодинамической терапии злокачественных новообразований» (Патент РФ №2145221, МПК А61К 31/40, А61К 47/42, заявка 96115788/14, дата публикации 10.02.2000, дата подачи заявки 30.07.1996), «Препарат для фотодинамической терапии» (Патент РФ №2146144, МПК А61К 31/675, А61К 31/ 40, заявка 97102060/14, дата публикации 10.03.2000, дата подачи заявки 11.02.1997), «Средство для фотодинамической диагностики и терапии онкологических заболеваний» (Патент РФ №2152790, МПК G01N 33/52, A61K 31/79, заявка 99110071/14, дата публикации 20.07.2000, дата подачи заявки 12.05.1999). Основным компонентом данных препаратов являются органические фотосенсибилизаторы, принцип действия которых основан на их способности накапливаться в трансформированных клетках, эффективно поглощать свет определенной длины волны и передавать энергию фотовозбуждения к окружающим их молекулам кислорода. В результате этого молекулы кислорода оказываются в возбужденном синглетном состоянии и способны эффективно окислять окружающие их ткани, что приводит к деструкции трансформированных клеток. Следует отметить, что органические фотосенсибилизаторы обладают целым рядом недостатков:

- 1. Сложность синтеза и очистки соединений;
- 25 2. Невысокая селективность накопления фотосенсибилизатора в трансформированных клетках (т.н. онкотропность);
  - 3. Темновая и световая цитотоксичность;
  - 4. Быстрое проникновение и выведение из клеток;
  - 5. Медленное выведение из организма.

30 В связи с этим актуальной задачей является поиск новых подходов к созданию лекарственных препаратов для фотодинамической терапии (ФДТ), которые бы позволили повысить ее эффективность и уменьшить действие побочных эффектов.

Одним из современных подходов в области разработки новых лекарственных препаратов для ФДТ является создание комплексов с участием органических фотосенсибилизаторов и наночастиц. Данный подход использует принцип увеличения концентрации фотосенсибилизатора в опухоли за счет использования наночастиц в качестве доставщика. Известен патент «Противораковые наночастицы с усиленной целевой специфичностью и способ их получения» (Патент США № US 20150290332 A1, МПК A61K 31/555, A61K 47/36, A61P 35/00, A61K 9/16, заявка US 14/436,276, дата публикации 15.10.2015, дата приоритета 02.05.2013), в котором в качестве основы для наночастиц используется сывороточный альбумин, к поверхности которого нековалентно присоединены молекулы порфирина. Таким образом, в изобретении увеличение концентрации фотосенсибилизатора в клетках достигается за счет использования сывороточного альбумина как доставщика к раковым клеткам одновременно нескольких молекул порфирина. Недостатками данного подхода являются: 1) селективность накопления молекул порфирина в трансформированных клетках определяется свойствами самого порфирина, т.е. не имеет преимуществ перед

использованием свободных молекул порфирина; 2) велика вероятность десорбции

молекул порфирина с поверхности сывороточного альбумина в процессе транспортировке данных наночастиц к трансформированным клеткам; 3) условия фотовозбуждения строго определяются свойствами только молекул порфирина. Известен патент «Композиция и способ ее изготовления для доставки фотосенсибилизатора» (Патент США № US 20040047913 A1, МПК A61К 41/00, заявка US 10/440,505, дата публикации 11.03.2004, дата приоритета 16.05.2002). Согласно изобретению, для доставки гидрофобных фотосенсибилизаторов порфиринового ряда к трансформированным клеткам используются полимерные наночастицы размером порядка 200 нм. В присутствии сывороточного альбумина происходит высвобождение молекул фотосенсибилизатора из полимерных наночастиц, дальнейшая доставка молекул фотосенсибилизатора к трансформированным клеткам осуществляется с участием сывороточного альбумина. В данном изобретении решена задача применения гидрофобных фотосенсибилизаторов для ФДТ, однако ему присущи все недостатки изобретения, изложенного в патенте «Противораковые наночастицы с усиленной целевой специфичностью и способ их получения».

Другим широко распространенным подходом в изготовлении новых лекарственных препаратов для ФДТ на основе органических фотосенсибилизаторов является использование их комплексов с наночастицами, которые помимо доставки фотосенсибилизатора в опухоль могут выполнять роль эффективного донора энергии фотовозбуждения. Коллоидные полупроводниковые квантовые точки (КТ) являются сегодня наиболее распространенным типом таких наночастиц (Jun Yao et al. Chem. Rev. 2014, 114 6130). Особенностью КТ является зависимость длины волны их люминесценции от размера нанокристалла, способность поглощать свет в широком спектральном диапазоне, высокая фотостабильность и высокий квантовый выход люминесценции, что делает их эффективными донорами энергии фотовозбуждения (Efros, A.L., D.J. Lockwood, et al. Semiconductor Nanocrystals: From Basic Principles to Applications, Springer, 2003). Ряд работ показывает, что комплексы квантовых точек с фотосенсибилизаторами способны заметно увеличить фотодинамический эффект, приводящий к гибели раковых клеток, как за счет эффективной передачи энергии, так и за счет увеличения внутриклеточной концентрации фотосенсибилизатора. Известен способ использования КТ для повышения эффективности фотосенсибилизаторов «Использование фотолюминесцентных наночастиц для фотодинамической терапии» (Патент США № US 20020127224 A1, МПК A61К 39/44, A61К 41/00, заявка US 10/091144, дата публикации 12.09.2002, дата приоритета 2.03.2001), в котором квантовые точки возбуждаются внешним источником света, который хорошо проникает в ткани, а затем КТ излучают свет, который активирует фотосенсибилизатор. При этом авторами было предложено использование КТ нескольких размеров, что позволяет возбуждать различные фотосенсибилизаторы и позволяет комбинировать их при лечении. Однако при таком подходе эффективность возбуждения фотосенсибилизатора квантовыми точками может быть достаточно низка, т.к., во-первых, при введении КТ в организм человека может существенно снижаться квантовый выход люминесценции КТ, во-вторых, для эффективного фотовозбуждения фотосенсибилизатора, необходимо чтобы КТ и фотосенсибилизатор оказались максимально близко друг к другу, что влечет использование высоких терапевтических доз КТ и фотосенсибилизаторов.

Наиболее близок к предлагаемому изобретению и принят в качестве прототипа «Фотосенсибилизатор, содержащий ковалентно связанные комплексы квантовых точек и производных хлорина для лечения и диагностики рака и фотодинамической терапии» (Патент № WO 2010151074 A2, A61K 33/24, A61K 31/409, A61K 49/06, A61P 35/00, заявка

РСТ/КR 2010/004134, дата публикации 19.05.2011, дата приоритета 26.06.2010). Согласно описанию к патенту фотосенсибилизатор представляет собой квантовые точки, ковалентно связанные в комплекс с производными хлорина еб. В данном комплексе реализуется безызлучательный резонансный перенос энергии (FRET) от КТ к молекулам, производным хлорина, который приводит к сенсибилизации генерации ими синглетного кислорода. Такой фотосенсибилизатор обладает рядом преимуществ:

- 1. Использование ковалентного связывания КТ и хлорина е6 в комплекс обеспечивает стабильность комплексов и малые расстояния между КТ и хлорином е6. Это позволяет снизить терапевтическую дозу препарата за счет сенсибилизации фотодинамического эффекта хлорина е6 квантовыми точками;
- 2. Существенно расширен спектральный диапазон излучения, которое активирует комплексы;
- 3. Благодаря большим сечениям поглощения в полупроводниковых квантовых точках для активации комплексов можно эффективно использовать двух- и трехфотонное возбуждение, которое спектрально соответствует области прозрачности биологических тканей;
- 4. Поверхность КТ может быть использована для присоединения специальных молекул доставщиков, которые увеличивают селективность накопления комплексов в трансформированных клетках.

Однако прототип имеет следующие недостатки:

20

- 1. Формирование комплексов проводится в водных средах, в которых органические фотосенсибилизаторы и, в особенности, хлорин е6, характеризуются плохой стабильностью и склонны к образованию агрегатов. Это приведет к значительному снижению эффективности активации молекул кислорода и, как результат, к уменьшению ФДТ эффекта и к увеличению терапевтических доз препарата. Следует отметить, что агрегация фотосенсибилизатора может приводить к полной потере способности фотосенсибилизатора активировать молекулы кислорода, т.е. к полной потере функциональности препарата. Обращает на себя внимание тот факт, что вопросам агрегации органических фотосенсибилизаторов в составе комплексов с наночастицами, и в частности с КТ, практически не уделяется внимания ни в одном из рассмотренных патентов.
- 2. Для увеличения селективности накопления комплексов в опухоли предлагается использовать специальные молекулы. При таком подходе речь по сути идет о создании сложной, трехкомпонентной структуры, усложнение методов формирования и очистки которой приведут к резкому повышению себестоимости конечного лекарственного препарата на основе таких комплексов. Также следует отметить, что в случае использования антител в качестве агентов адресной доставки возникают определенные сложности, которые обусловлены строгим специфическим их взаимодействием с определенным антигеном. В первую очередь недостатки использования антител связаны с большой степенью гетерогенности реальных опухолей. Это приводит к сложности подбора единого антигена, достаточно хорошо экспрессированного для всей опухоли. Также следует отметить, что антитела представляют собой большие белковые молекулы, которые достаточно трудно проникают как вглубь опухоли, так и внутрь трансформированных клеток. В последнем случае, когда антитело остается на поверхности клетки, резко возрастает вероятность активизации иммунной системы и, как следствие, выработки антител на данные антитела.

Задачей данного изобретения является повышение эффективности фотодинамического эффекта в трансформированных клетках за счет сохранения фотофизических свойств

мономерной формы хлорина е6 в комплексах с квантовыми точками и присутствия на поверхности КТ энантиомеров хиральных молекул стабилизаторов, что обеспечивает увеличение селективности накопления предлагаемого фотосенсибилизатора в трансформированных клетках.

Поставленная задача достигается тем, что формируется фотосенсибилизатор на основе полупроводниковых квантовых точек и хлорина еб, состоящий из ковалентно связанных комплексов хиральных полупроводниковых квантовых точек группы A2B6 и молекул хлорина еб в мономерной форме, характеризующийся возможностью селективного накопления в трансформированных клетках за счет наличия на поверхности полупроводниковых квантовых точек энантиомера хиральной молекулы.

Сущность предлагаемого изобретения заключается в том, что формирование комплексов осуществляется в результате ковалентного связывания в комплекс хиральных полупроводниковых квантовых точек с молекулами хлорина е6 в мономерной форме в диметилсульфоксиде. После формирования комплексов происходит их очистка и концентрирование, затем полученный концентрированный раствор комплексов вводится в водный раствор. В результате облучения комплексов КТ/Се6 светом с длиной волны, которая эффективно ими поглощается, комплексы переходят в возбужденное состояние, в котором при взаимодействии с молекулами кислорода способны переводить их в активную синглетную форму.

Селективность накопления предлагаемого фотосенсибилизатора в трансформированных клетках достигается за счет стереоспецифического взаимодействия энантиомера хиральной молекулы на поверхности КТ, которое будет усиливать онкотропные свойства молекул Себ, входящих в состав данных комплексов.

Предлагаемое изобретение имеет следующие преимущества:

5

20

30

- 25 1. Формирование комплексов полупроводниковых квантовых точек с молекулами хлорина еб осуществляется в диметилсульфоксиде, что обеспечивает наличие в комплексах только мономерной формы хлорина еб и, как следствие, его максимальную эффективность в качестве генератора синглетного кислорода при использовании предлагаемого фотосенсибилизатора в ФДТ.
  - 2. Формирование комплексов, в которых с квантовой точкой связываются сразу несколько молекул хлорина е6 в мономерной форме, позволяет существенно увеличить ФДТ-эффект и, как следствие, снизить терапевтическую фотосенсибилизатора.
  - 3. Использование в комплексах хиральных квантовых точек позволяет увеличить селективность накопления комплексов в трансформированных клетках без технического усложнения методики формирования и очистки комплексов по сравнению с использованием специальных молекул, выступающих в качестве агентов адресной доставки. Это техническое решение позволяет существенно упростить процедуру формирования предлагаемого фотосенсибилизатора, что, в свою очередь, увеличивает его стабильность и уменьшает себестоимость.
- Сущность предлагаемого изобретения поясняется на фиг. 1-11, на которых представлены:
  - Фиг. 1. Спектры кругового дихроизма CdSe/ZnS KT, стабилизированных L-, D-гистидином и TOPO (кривые 1,2 и 3 соответственно), а также спектр поглощения CdSe/ZnS KT.
- 45 Фиг. 2. Спектры поглощения активированного 1,3-дициклогексилкарбодиимидом хлорина e6 (1), CdSe/ZnS KT, стабилизированных L-гистидином, (2) и их комплексов (3) в эквимолярных концентрациях в ДМСО.
  - Фиг. 3. Спектры кругового дихроизма Ce6 (1), CdSe/ZnS KT, стабилизированных L-

- гистидином, (2) и их комплексов (3) в ДМСО.
- Фиг. 4. Спектры люминесценции CdSe/ZnS KT (1), Ce6 (2) и их комплексов (3) в ДМСО, длина волны возбуждающего света 450 нм.
- Фиг. 5. Спектры возбуждения люминесценции Ce6 (1), комплексов CdSe/ZnS KT с 1, 2 и 5 молекулами Ce6 в комплексах (2-4) и спектр поглощения KT (5) в дистилляте. Длина волны регистрации люминесценции 680 нм.
  - Фиг. 6. Зависимость интенсивности люминесценции в максимуме полосы люминесценции химического сенсора на синглетный кислород SOSG (525 нм) от времени облучения светом с длиной волны 450 нм в присутствии эквимолярных концентраций Ce6 (1), CdSe/ZnS KT (2) и их комплексов (3).
  - Фиг. 7. Зависимость интенсивности люминесценции в максимуме полосы люминесценции SOSG (525 нм) от времени облучения светом с длиной волны 450 нм в присутствии комплексов КТ/Се6, в которых поверхность КТ стабилизирована разными молекулами.
- Фиг. 8. Зависимость внутриклеточной концентрации Себ от времени инкубирования образцов живых клеток АКЭ комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована L-гистидином или D-гистидином.
- Фиг. 9. Зависимость внутриклеточной концентрации Себ от времени инкубирования образцов живых клеток АКЭ комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована L-цистеином или D-цистеином.
- Фиг. 10. Результаты ФДТ теста на живых клетках АКЭ, инкубированных с комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована L-гистидином или D-гистидином.
- Фиг. 11. Результаты ФДТ теста на живых клетках АКЭ, инкубированных с комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована L-цистеином или D-цистеином.
- Пример 1. В комплексах коллоидных водорастворимых полупроводниковых квантовых точек с молекулами хлорина е6 (КТ/Себ), образованных в результате электростатического взаимодействия или ковалентного связывания, наблюдается диполь-дипольный перенос энергии от квантовых точек CdSe/ZnS к хлорину е6 (I.V. Martynenko, A.O. Orlova, V.G. Maslov, A.V. Baranov, A.V. Fedorov and M. Artemyev. Energy transfer in complexes of water-soluble quantum dots and chlorin e6 molecules in different environments // Beilstein J. Nanotechnol. 2013, 4, 895-902 и IV Martynenko, VA Kuznetsova,
- 355 Baranov and AV Fedorov. Chlorin e6-ZnSe/ZnS quantum dots based system as reagent for photodynam-ic therapy// Nanotechnology 26 (2015) 055102 (9pp)). Однако в водных растворах в комплексах КТ/Се6 с увеличением концентрации Се6 наблюдается уменьшение эффективности переноса энергии фотовозбуждения от КТ к молекулам Се6 и падение квантового выхода люминесценции молекул Се6, что, как правило, свидетельствует об умень молекул разрачим существого компрана молекулами. Это

AO Orlova, PA Kanaev, VG Maslov, A Loudon, V Zaharov, P Parfenov, Yu K Gun'ko, AV

- уменьшении эффективности генерации синглетного кислорода молекулами. Это обстоятельство заметно снижает эффективность применения таких комплексов в ФДТ. Наиболее вероятной причиной снижения эффективности функционирования комплексов КТ/Се6, сформированных в водных растворах, является хорошо известная агрегация молекул. В то же время известно, что в диметилсульфоксиде (ДМСО) молекулы хлорина
- e6 находятся в мономерной форме (D.A. Schwartz, D.R. Gamelin//Optical Science and Technology, SPIE's 48th Annual Meeting. 2003, International Society for Optics and Photonics. P. 1-7.), которая характеризуется максимальным квантовым выходом генерации синглетного кислорода и, соответственно, предпочтительна при использовании

комплексов КТ/Се6 в ФДТ. ДМСО обладает высокой проникающей способностью в биологических тканях и при добавке в небольшом процентном соотношении (до 10% по объему) не проявляет цитотоксичности по отношению к живым клеткам (Т.М. Rippin, V.J. Bykov, S.M. Freund, G. Selivanova, K. Wiman, A.R. Fersht//Oncogene. 2002. V. 21. №14. Р. 2119-2129). Существующее ограничение по объему добавок ДМСО ни в коем случае не является препятствием для реализации идеи формирования фотосенсибилизатора на основе квантоворазмерных наноструктур, пригодного для ФДТ, в данном растворителе. Это обусловлено тем, что на поверхности КТ находятся молекулы, которые обеспечивают растворимость КТ и, соответственно, комплексов КТ/Се6 как в ДМСО, так и в водных растворах. Поэтому сформированные в ДМСО комплексы могут быть переведены в водный раствор в результате микродобавки в него высококонцентрированного раствора комплексов в ДМСО.

Для демонстрации работоспособности предлагаемого изобретения были сформированы комплексы хиральных полупроводниковых КТ с молекулами хлорина еб (КТ/Себ) в диметилсульфоксиде. Типичным представителем коллоидных полупроводниковых квантовых точек группы А2 В6 являются квантовые точки селенида кадмия типа ядро-оболочка, покрытые несколькими слоями полупроводника сульфида цинка, полученные методом горячей инжекции (B.O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F.V. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, and M.G. Bawendi. (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites// J. Phys. Chem. B, 1997, 101 (46), pp. 9463-9475). Для получения гидрофильных КТ, способных образовывать коллоидные растворы в водных средах и в диметилсульфоксиде, была осуществлена стандартная процедура замены исходного стабилизатора поверхности КТ на энантиомеры хиральных молекул: L-, D-цистеина, L-, D-пеницилламина, L-, D-аргинина, L-, D-гистидина. Для анализа влияния хиральности КТ на эффективность внутриклеточного проникновения в качестве образца сравнения использовались CdSe/ZnS KT, стабилизированные ахиральными молекулами тиогликолевой кислоты (ТГК). В результате замены поверхностного стабилизатора КТ из органической фазы были перенесены в диметилсульфоксид. В качестве примера на Фиг. 1 приведены спектры кругового дихроизма (КД) CdSe/ZnS квантовых точек с диаметром ядра 3.5 нм, стабилизированных исходно молекулами триоктилфосфин оксида (ТОРО), которые были переведены из толуола в ДМСО с использованием L-, и D-гистидина. Видно, что CdSe/ZnS KT, стабилизированные молекулами TOPO, не проявляют оптической активности, о чем свидетельствует отсутствие полос в их спектре КД (кривая 3). В то же время, стабилизация КТ L- и D-энантиомерами гистидина (кривые 1 и 2, соответственно) привела к появлению характеристических полос в их спектрах КД, спектральное положение которых соответствует электронным переходам в спектре поглощения данных КТ (кривая 4). При проведении аналогичного замещения молекул ТОРО на поверхности CdSe/ZnS КТ на энантиомеры аргинина, цистеина и пеницилламина в спектрах КД образцов наблюдалась аналогичная картина.

Для формирования комплексов КТ/Себ в ДМСО был использован стандартный линковщик 1,3-дициклогексилкарбодиимид (DCC) (Ulrich H. Chemistry and technology of carbodiimides. John Wiley & Sons, 2008), который формирует пептидную связь между аминогруппой стабилизатора поверхности КТ (гистидина, аргинина, пеницилламина и цистеина) и карбоксильной группой Себ. Для стабилизации DCC использовался N-Гидроксисукцинимид (NHS), данные соединения были добавлены к раствору Себ в ДМСО ( $C_{\text{Ce6}} \sim 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) в эквимолярном соотношении. Полученная смесь активно перемешивалась на шейкере в течение 150 минут при скорости 600 оборотов/минуту.

Активированный Себ добавлялся в виде микродобавок (50 мкл) к раствору CdSe/ZnS КТ в ДМСО (3 мл), после этого растворы выдерживались в темноте при комнатной температуре при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке в течение 12 часов.

На Фиг. 2 приведены спектры поглощения активированного Себ, КТ и их смеси в 5 эквимолярном соотношении (кривые 1, 2 и 3 соответственно). Положение первой полосы поглощения Себ (~ 660 нм) свидетельствует о том, что Себ находится в мономерной форме (Пархоц М.В., Галиевский В.А., Сташевский А.С., Трухачева Т.В., Джагаров Б.М. Динамика и эффективность фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода хлорином еб: влияние рН раствора и поливинилпирролидона. Оптика и спектроскопия, 2009, Т. 107, №6, С. 1026-1032.). Анализ спектра поглощения смешанного раствора КТ и Себ (кривая 3) показал, что в присутствии КТ спектр поглощения Себ не меняется, т.е. Себ в смеси с КТ находится в мономерной форме. Об образовании комплексов КТ/Себ свидетельствует изменение спектра КД Себ в смеси с КТ, приведенного на Фиг. 3. Видно, что амплитуда длинноволновой полосы Себ (~ 660 нм) увеличивается в ~ 2 раза, а полоса КД в области полосы Соре (~ 400 нм) уменьшается в 2.5 раза. На Фиг. 4 приведены спектры люминесценции активированного Себ, КТ и их смеси в эквимолярном соотношении в ДМСО (кривые 1, 2 и 3 соответственно). Видно, что добавление раствора Себ (50 мкл) к раствору КТ (3 мл) приводит к заметному тушению люминесценции квантовых точек и к появлению в образце люминесценции Себ (~ 670 нм). При неизменности спектра поглощения Себ в смеси с КТ, изменениях в спектре КД Себ, двукратное увеличение интенсивности люминесценции Себ свидетельствует об образовании комплексов с эффективным переносом энергии от КТ к молекулам Себ.

На следующем этапе полученные комплексы были сконцентрированы с 25 использованием концентраторов Amicon Ultra-10 Centrifugal Filter Units (10 кДа), которые позволяют отделить комплексы от свободных компонентов смеси. Полученные комплексы КТ/Себ с различным соотношением концентраций были отделены от не прореагировавших компонентов путем центрифугирования образцов в концентраторах в течение 10 минут на скорости 3000 оборотов/минуту. Выделенные комплексы КТ/Себ были незамедлительно переведены в водные растворы с физиологическим уровнем рН и проведено исследование их спектров поглощения, люминесценции и возбуждения люминесценции, которые практически не отличались от аналогичных спектров комплексов в ДМСО. Наиболее представительными и информативными для комплексов КТ/Себ являются спектры возбуждения люминесценции Себ в комплексах с КТ, поскольку наличие вклада поглощения КТ в эти спектры свидетельствует о внутрикомплексном переносе энергии от КТ к Себ. На Фиг. 5 приведены спектры возбуждения люминесценции Себ в комплексах с КТ в водных растворах для комплексов с разным числом молекул Себ (от 1 до 5). Приведенные спектры возбуждения люминесценции нормированы на концентрацию Себ. Это позволяет напрямую из спектров возбуждения люминесценции Себ оценивать вклад переноса энергии от КТ в общую интенсивность люминесценции Себ. Увеличение вклада поглощения КТ в области 300-530 нм в спектр возбуждения люминесценции Себ свидетельствует о том, что эффективность переноса энергии в данных комплексах может быть увеличена в два раза при увеличении среднего числа молекул Себ в комплексах с КТ от 1 до 5. Таким образом, продемонстрировано, что в ковалентно связанных в ДМСО комплексах КТ/ Себ наблюдается эффективный перенос энергии фотовозбуждения от КТ к мономерной

форме Себ, причем увеличение среднего числа молекул Себ в комплексах от 1 до 5

позволяет двукратно увеличить эффективность внутрикомплексного переноса энергии. Пример 2. Способность комплексов КТ, стабилизованных L- и D- энантиомерами пеницилламина, цистеина, аргинина, гистидина, а также ахиральными молекулами тиогликолевой кислоты, с молекулами Себ генерировать синглетную форму кислорода была протестирована с использованием специального химического сенсора на основе комплекса флуоресцеина и антрацена (Singlet Oxygen Sensor Green, SOSG) (S. Kim, M. Fujitsuka, and T. Majima. Photochemistry of Singlet Oxygen Sensor Green//J. Phys. Chem. B, 2013, 117 (45), pp 13985-13992). Для этого были приготовлены смешанные водные растворы SOSG ( $C_{SOSG}$ = $10^{-6}$  M) и комплексов КТ/Се6 ( $C_{KOMПЛЕКСОВ}$ = $10^{-7}$  M), в которых на 1 КТ приходилось в среднем от 1 до 5 молекул Себ. Растворы многократно освещались светом с длиной волны 450 нм (плотность мощности, падающая на образцы, 4 млВт/см), время каждой засветки составляло 20 секунд. Во время освещения растворы непрерывно перемешивались на магнитной мешалке. Детектирование синглетного кислорода проводилось по появлению и увеличению интенсивности полосы люминесценции с максимумом на 525 нм. На Фиг. 6 приведены зависимости интенсивности люминесценции SOSG на длине волны 525 нм для образцов, содержащих эквимолярные концентрации CdSe KT ( $C_{KT}=10^{-7}$  M), Ce6 и комплексов KT/Ce6 (1, 2 и 3, соответственно). Поскольку интенсивность люминесценции SOSG прямо пропорциональна концентрации синглетного кислорода в образцах, то при одинаковых концентрациях комплексов и отдельных компонентов (КТ и Себ) в одинаковых условиях проведения эксперимента можно сравнить эффективность генерации синглетного кислорода комплексами КТ/Себ и отдельных компонентов. Видно, что без Себ КТ практически не генерируют синглетный кислород, что хорошо согласуется с данными о квантовом выходе генерации водорастворимых КТ (~ 1%), а эффективность генерации синглетного кислорода комплексами более чем в два раза выше, чем мономерной формой Себ той же концентрации. На Фиг. 7 приведены зависимости интенсивности люминесценции SOSG на длине волны 525 нм при освещении светом 450 нм образцов, содержащих комплексы КТ/Себ (5 молекул Себ на 1 КТ), в которых поверхность КТ стабилизована энантиомерами различных хиральных молекул: D-цистеином, Lаргинином, D-пеницилламином, L- и D-гистидином, а также ахиральными молекулами ТГК. Видно, что эффективность генерации синглетного кислорода комплексами, содержащими КТ с различным стабилизатором поверхности, мало зависит от типа стабилизатора. Этот результат является вполне ожидаемым, поскольку эффективность генерации синглетного кислорода определяется фотофизическими свойствами комплексов, которые, в свою очередь, определяются условиями их формирования, типом связывания компонентов в комплекс и фотохимическими свойствами Себ в комплексах, которые были одинаковыми в данном случае и не зависели от используемого типа стабилизатора поверхности КТ. Таким образом, продемонстрировано, что сформированные комплексы КТ/Себ способны эффективно генерировать синглетный кислород в водных средах, причем эффективность генерации синглетного кислорода данными комплексами не зависит от типа стабилизатора поверхности КТ.

Пример 3. Для демонстрации работоспособности предлагаемого изобретения был проведен ФДТ тест для комплексов хиральных CdSe/ZnS KT с молекулами Себ на живых клетках асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), которая вводилась подкожно в виде суспензии белым лабораторным мышам обоих полов в возрасте восьми недель и имеющим вес порядка 20 грамм. Асциты выращивались в течение 10 дней. Для

исследований были получены клеточные суспензии из брюшной полости мышей на 10 день после инъекции, которые были очищены от эритроцитов в буферном растворе (~ 10 минут) и их дважды центрифугировали на скорости 1500 оборотов/минуту в течение 10 минут в растворе Хенкса. Осадок растворяли в солевом растворе Хенкса. Для каждого образца  $10^6$  клеток на 1 мл солевого раствора Хенкса помещали в ячейки 24-луночного планшета для культивирования клеток. Образцы инкубировали в темноте при температуре  $37^{\circ}$ С в 5% атмосфере  $CO_2$  в течение 1, 2, 4, и 7 часов, концентрация

комплексов  $C_{KT/Ce6}$  составляла  $10^{-6}$  M, а свободного  $C_{Ce6}$ =5· $10^{-6}$  M. На величину внутриклеточного фотодинамического эффекта, который приводит к 10 разрушению трансформированных клеток, влияет как эффективность генерации синглетного кислорода хлорином еб в комплексах с хиральными КТ, так и внутриклеточная концентрация комплексов, которая зависит от хиральных свойств КТ. Была сделана оценка внутриклеточного фотодинамического эффекта от комплексов CdSe/ZnS KT, стабилизированных как хиральными, так и ахиральными молекулами, с молекулами Себ, в которых с одной КТ были ковалентно связаны 5 молекул Себ. В качестве образцов сравнения использовались образцы клеток АКБ, инкубированные свободным Себ, концентрация которого соответствовала концентрации Себ в комплексах с КТ. Для определения внутриклеточной концентрации Себ и комплексов образцы клеток осаждались центрифугированием на скорости 1500 оборотов/минуту в течение 5 минут. Полученный осадок помещался в кварцевую кювету толщиной 1 мм, причем кювета заполнялась таким образом, чтобы клетки образовывали практически плотную упаковку. Это обеспечивало отсутствие эффектов, связанных с неравномерностью образца. Для минимизации рассеяния спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре UV Probe - 3600 (Шимадзу, Япония) с встроенной интегрирующей сферой. Внутриклеточная концентрация Себ определялась по спектрам поглощения образцов клеток с использованием формулы  $D=\varepsilon \cdot c \cdot l$ , где D - оптическая плотность в максимуме полосы Соре (405 нм), ε - коэффициент экстинкции Себ в полосе Соре, 1 длина оптического пути (толщина кюветы - 1 мм). На Фиг. 8 в качестве примера приведены данные по концентрации Себ в клетках АКЭ при различном времени инкубирования образцов с комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована молекулами L- и D-гистидина, и свободным Себ. Видно, что независимо от времени инкубирования внутриклеточная концентрация Себ оказывается выше в комплексах с КТ, поверхность которых стабилизирована L-гистидином. При этом использование в комплексах КТ, стабилизированных молекулами D-гистидина, приводит к тому, что внутриклеточная концентрация Себ оказывается немного меньше, чем при использовании ахирального стабилизатора поверхности КТ - тиогликолевой кислоты. Для демонстрации того, что эффект увеличения внутриклеточной концентрации Себ обусловлен энантиоселективным накоплением комплексов хиральных КТ с Себ, на Фиг. 9 приведены данные по внутриклеточной концентрации Себ в составе комплексов КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована энантиомерами другой хиральной молекулы - цистеином. Видно, что, как и в случае использования в качестве стабилизатора поверхности L-гистидина, для комплексов КТ/Себ, в которых поверхность стабилизирована L-цистеином, концентрация Себ существенно выше, чем в случае свободного Себ. Это свидетельствует о том, что наличие на поверхности КТ

т.е. увеличивает селективность его накопления в клетках.

энантиомеров хиральных молекул приводит к заметному увеличению внутриклеточной концентрации Себ в составе комплексов КТ/Себ по сравнению с его свободной формой,

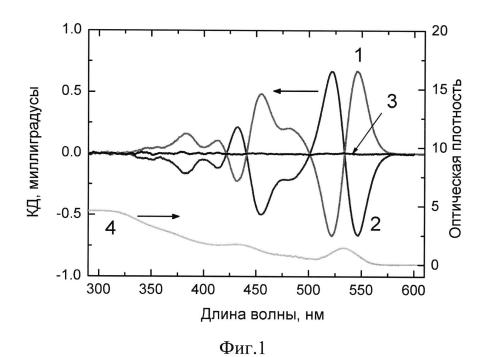
Оценка внутриклеточного фотодинамического эффекта была выполнена на образцах клеток АКЭ, инкубированных в течение 7 часов с комплексами КТ/Себ ( $10^{-6}$  M, соотношение KT:Ce6=1:5) и Ce6 ( $5\cdot10^{-6}$  M), при облучении светом с длиной волны 450 нм (плотность мощности, падающей на образцы, 25 мBт/см<sup>2</sup>) в течение 5 и 10 минут. Количество мертвых клеток оценивалось с использованием 0.4%-ного раствора трипанового синего, которым окрашивали клетки в течение 5 минут. Особенностью данного красителя является то, что он способен проникать и накапливаться только в мертвых клетках. Для оценки количества живых и мертвых клеток использовался автоматизированный счетчик клеток TC10 (Bio-Rad). На Фиг. 10 приведены данные о выживаемости клеток АКЭ, инкубированных с комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована молекулами L- и D-гистидина, и с отдельными компонентами соответствующих концентраций. Видно, что КТ не обладают ни темновой, ни световой цитотоксичностью. В то же время фотодинамический эффект в образцах, инкубированных комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована L-гистидином ( $C_{\text{компл}}$ = $10^{-6}$  M, КТ:Се6=1:5), практически в ~ 8 раз выше, чем при инкубировании клеток молекулами Се<br/>6 ( $C_{\text{Се6}}$ =5· $10^{-6}$  М). На Фиг. 11 приведены данные о выживаемости клеток АКЭ, инкубированных с комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована молекулами L- и D-цистеина, и с отдельными компонентами соответствующих концентраций. Видно, что как и в случае использования энантиомеров гистидина для образцов, инкубированных с комплексами КТ/Себ, в которых поверхность КТ стабилизирована молекулами L-цистеина, ( $C_{\text{компл}}$ = $10^{-6}$  M, КТ:Се6=1:5), величина ФДТ эффекта в 7,5 раз выше, чем при инкубировании клеток молекулами Себ ( $C_{\text{Себ}}$ = $5\cdot10^{-6}$  М). Полученные данные наглядно демонстрируют, что увеличение ФДТ эффекта в клетках АКЭ обусловлено энантиоселективным накоплением комплексов хиральных КТ с молекулами Себ, которое обусловлено наличием на поверхности КТ энантиомера хиральной молекулы.

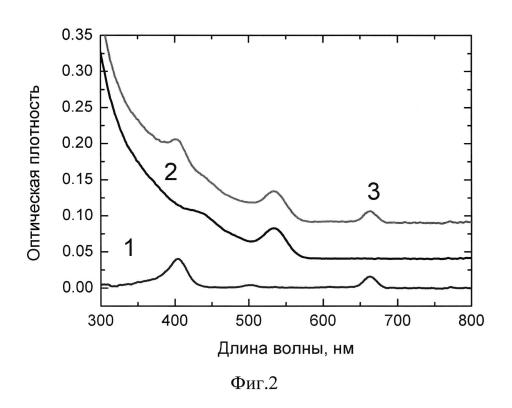
Таким образом, приведенные примеры наглядно демонстрируют, что фотосенсибилизатор на основе хиральных полупроводниковых квантовых точек и молекул хлорина еб демонстрирует многократное увеличение внутриклеточного фотодинамического эффекта на живых клетках АКЭ по сравнению со свободными молекулами хлорина еб той же концентрации за счет синергетического эффекта, обусловленного энантиоселективным накоплением комплексов хиральных КТ и эффективным внутрикомплексным переносом энергии от КТ к молекулам Себ, находящихся в комплексе в мономерной форме.

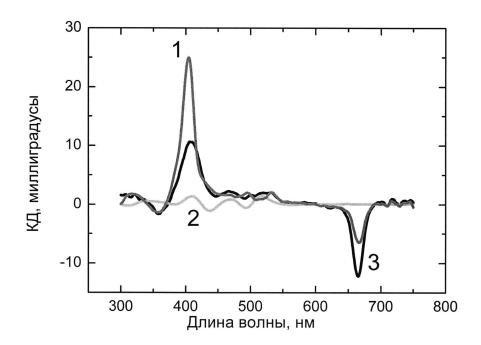
30

### (57) Формула изобретения

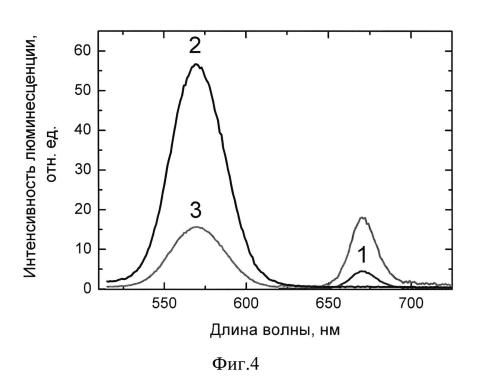
- 1. Фотосенсибилизатор на основе полупроводниковых квантовых точек и хлорина е6, содержащий ковалентно связанные комплексы полупроводниковых квантовых точек и хлорина е6, отличающийся тем, что комплексы состоят из хиральных полупроводниковых квантовых точек группы A2B6 и молекул хлорина е6 в мономерной форме с возможностью селективного накопления фотосенсибилизатора в трансформированных клетках.
  - 2. Фотосенсибилизатор по п. 1, отличающийся тем, что на поверхности хиральных полупроводниковых квантовых точек адсорбированы энантиомеры хиральной молекулы.

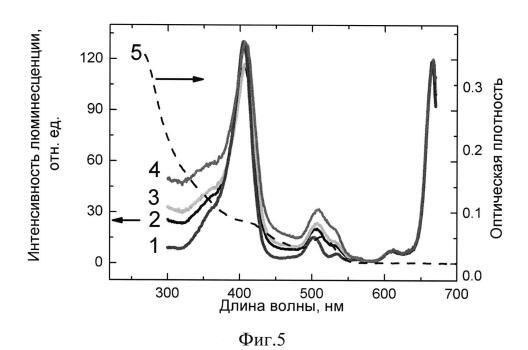


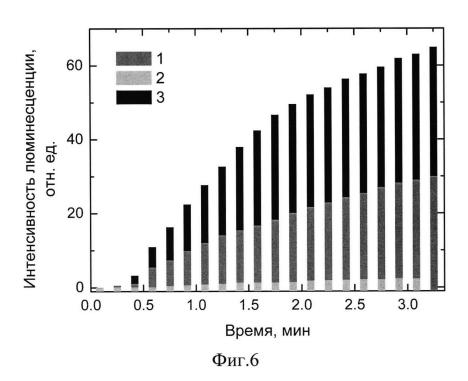


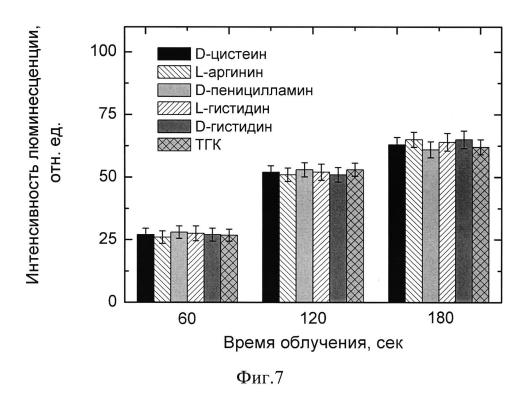


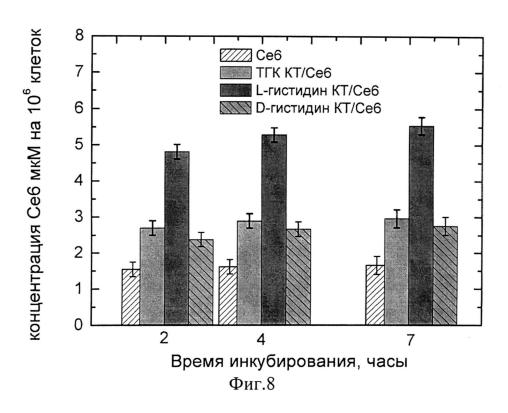
Фиг.3

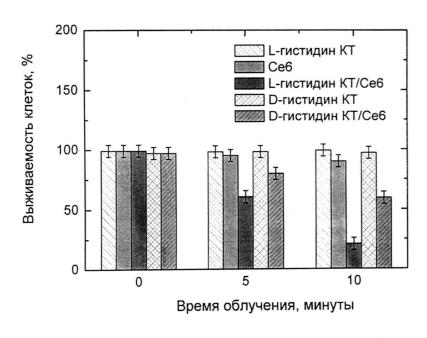


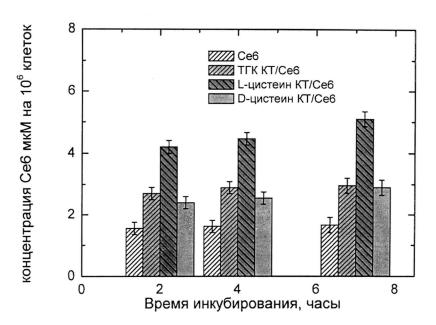




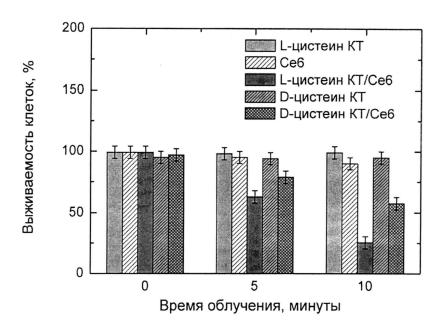








Фиг.10



Фиг.11