

2012157279 A

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU⁽¹¹⁾ 2012 157 279⁽¹³⁾ A

(51) МПК
C12Q I/34 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2012157279/10, 03.06.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
04.06.2010 US 12/802,340

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2014 Бюл. № 20

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 09.01.2013

(86) Заявка РСТ:
US 2011/001018 (03.06.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/152883 (08.12.2011)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

ДЗЕ ТЕКСАС Эй Энд Эм
ЮНИВЕРСИТИ СИСТЕМ (US),
ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЛЕЛЭНД СТЭНФОРД ДЖУНИОР
ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Автор(ы):

ЧИРИЛЛО Джейфри Д. (US),
САКЕТТИНИ Джеймс К. (US),
ЖАО Цзянхун (US),
СЕ Хэсинь (US)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO И
ВИЗУАЛИЗАЦИИ, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ IN VIVO

(57) Формула изобретения

1. Способ обнаружения у субъекта патогенной бактерии в реальном времени, который включает:

введение субъекту или контактирование биологического образца, полученного у данного субъекта или с поверхности, с субстратом для бета-лактамазы указанной патогенной бактерии;

визуализацию в организме субъекта или образце продукта активности бета-лактамазы на субстрате; и

прием сигналов с длиной волны, излучаемой продуктом бета-лактамазы, что позволяет обнаружить патогенную бактерию у субъекта.

2. Способ по п.1, который далее включает трехмерную реконструкцию излучаемого сигнала для определения локализации патогенной бактерии у субъекта.

3. Способ по п.1, который далее включает одну или обе стадии количественного определения и дифференциации инфицированных клеток и неинфицированных клеток в биологическом образце.

4. Способ по п.3, в котором стадии дифференциации и/или количественного определения инфицированных клеток выполняют одним или несколькими методами, включающими проточную цитометрию, конфокальную микроскопию или флуоресцентную спектрометрию.

R U
2 0 1 2 1 5 7 2 7 9
A

5. Способ по п.1, в котором субстрат является флуорогенным субстратом CDC-1, CDC-2, CDC-3, CDC-4, CDC-5, CNIR5, CNIR5.2, CNIR5-QSY22, CNIR7, CNIR7-TAT, CNIR9, CNIR10, CNIR800, CNIR800.2, CNIR800-3, XHX2-81, XHX2-91, XHX3-1, XHX3-2, XHX3-26 или XHX3-32, их производным или аналогом.

6. Способ по п.1, в котором субстрат включает цветной краситель или химический реагент, эффективно вызывающий изменение цвета или pH.

7. Способ по п.6, в котором субстрат связан с частицей, микросферой или биотином.

8. Способ по п.1, в котором биологический образец является мокротой, плевральным выпотом, мочой, кровью, слюной, стулом или образцом, полученным в виде мазка с представляющего интерес участка тела субъекта.

9. Способ по п.1, в котором патогенные бактерии являются видом бактерий *Bac-
teroides*, *Clostridium*, *Srtreptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* или *Listeria*.

10. Способ по п.9, в котором патогенные бактерии включают *Mycobacterium tubercu-
losis complex* или *Mycobacterium avium complex*.

11. Способ по п.1, в котором принятый сигнал является флуоресцентным, люминесцентным или колориметрическим сигналом.

12. Способ по п.1, в котором длина волны визуализации равна от около 300 нм до около 900 нм и длина волны излучения равна от около 300 нм до около 900 нм.

13. Способ по п.12, в котором длина волны визуализации равна от около 540 нм до около 730 нм и длина волны излучения равна от около 650 нм до около 800 нм.

14. Способ диагностики патофизиологического состояния, ассоцииированного с наличием патогенной бактерии у субъекта, который включает:

введение субъекту или контрастирование биологического образца, полученного у данного субъекта, с субстратом для бета-лактамазы указанной патогенной бактерии;

визуализацию в организме субъекта продукта активности бета-лактамазы на субстрате; и

измерение в реальном времени интенсивности сигнала с длиной волны, излучаемой продуктом, при этом интенсивность сигнала, превышающая интенсивность измеренного контрольного сигнала, соответствует диагнозу патофизиологического состояния.

15. Способ по п.14, который далее включает трехмерную реконструкцию сигнала для определения локализации микробного патогена.

16. Способ по п.14, который далее включает одну или обе стадии количественного определения и дифференциации инфицированных клеток и неинфицированных клеток в биологическом образце.

17. Способ по п.16, в котором стадии дифференциации и/или количественного определения инфицированных клеток выполняют одним или несколькими методами, включающими проточную цитометрию, конфокальную микроскопию или флуоресцентную спектрометрию.

18. Способ по п.14, который далее включает введение одного или нескольких терапевтических соединений, позволяющих эффективно лечить указанное патофизиологическое состояние.

19. Способ по п.14, который далее включает:

повторное введение субстрата субъекту или контрастирование биологического образца, полученного у данного субъекта, с указанным субстратом; и

визуализацию субъекта или указанного биологического образца для контроля эффективности терапевтического соединения, при этом ослабление излучаемого сигнала по сравнению с сигналом, полученным во время диагностики, свидетельствует о терапевтическом воздействии на патофизиологическое состояние.

20. Способ по п.14, в котором патофизиологическое состояние является туберкулезом.

21. Способ по п.14, в котором биологический образец является мокротой, плевральным выпотом, мочой, кровью, слюной, стулом или образцом, полученным в виде мазка с представляющим интерес участка тела субъекта.
22. Способ по п.14, в котором патогенные бактерии включают виды бактерий *Bacteroides*, *Clostridium*, *Srreptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* или *Listeria*.
23. Способ по п.22, в котором патогенные бактерии включают *Mycobacterium tuberculosis* complex или *Mycobacterium avium* complex.
24. Способ по п.14, в котором субстрат является флуорогенным субстратом *CDC-1*, *CDC-2*, *CDC-3*, *CDC-4*, *CDC-5*, *CNIR5*, *CNIR5.2*, *CNIR5-QSY22*, *CNIR7*, *CNIR7-TAT*, *CNIR9*, *CNIR10*, *CNIR800*, *CNIR800.2*, *CNIR800-3*, *XHX2-81*, *XHX2-91*, *XHX3-1*, *XHX3-2*, *XHX3-26* или *XHX3-32*, их производным или аналогом.
25. Способ по п.14, в котором субстрат включает цветной краситель или химический реагент, эффективно вызывающий изменение цвета или pH.
26. Способ по п.25, в котором субстрат связан с частицей, микросферой или биотином.
27. Способ по п.14, в котором измеренный сигнал является флуоресцентным, люминесцентным или колориметрическим сигналом.
28. Способ по п.14, в котором длина волны визуализации равна от около 300 нм до около 900 нм и длина волны излучения равна от около 300 нм до около 900 нм.
29. Способ по п.28, в котором длина волны визуализации равна от около 540 нм до около 730 нм и длина волны излучения равна от около 650 нм до около 800 нм.
30. Способ диагностики, предназначенный для обнаружения микобактериальной инфекции у субъекта, который включает:
- получение у субъекта биологического образца;
 - контактирование биологического образца с субстратом микобактериального фермента бета-лактамазы;
 - визуализацию в биологическом образце продукта активности бета-лактамазы на субстрате; и
 - измерение интенсивности сигнала с длиной волны, излучаемой продуктом, при этом интенсивность сигнала, превышающая интенсивность измеренного контрольного сигнала, свидетельствует о наличии микобактериальной инфекции.
31. Способ по п.30, который далее включает одну или обе стадии количественного определения и дифференциации инфицированных клеток и неинфицированных клеток в биологическом образце.
32. Способ по п.31, в котором стадии дифференциации и/или количественного определения инфицированных клеток выполняют одним или несколькими методами, включающими проточную цитометрию, конфокальную микроскопию или флуоресцентную спектрометрию.
33. Способ диагностики по п.30, который далее включает:
- повторение стадий способа один или несколько раз для контроля терапевтической эффективности схемы лечения, назначенной субъекту после обнаружения микобактериальной инфекции; при этом ослабление измеренного сигнала по сравнению с контрольным сигналом соответствует положительной реакции на данную схему лечения.
34. Способ по п.30, в котором биологический образец является мокротой, плевральным выпотом, мочой, кровью, слюной, стулом или образцом, полученным в виде мазка с представляющим интерес участка тела субъекта.
35. Способ по п.30, в котором микобактериальная инфекция вызвана видом *Mycobacterium tuberculosis* complex или *Mycobacterium avium* complex.

36. Способ по п.30, в котором субстрат является флуорогенным субстратом CDC-1, CDC-2, CDC-3, CDC-4, CDC-5, CNIR5, CNIR5.2, CNIR5-QSY22, CNIR7, CNIR7-TAT, CNIR9, CNIR10, CNIR800, CNIR800.2, CNIR800-3, XHX2-81, XHX2-91, XHX3-1, XHX3-2, XHX3-26 или XHX3-32, их производным или аналогом.

37. Способ по п.30, в котором субстрат включает цветной краситель или химический реагент, эффективно вызывающий изменение цвета или pH.

38. Способ по п.37, в котором субстрат связан с частицей, микросферой или биотином.

39. Способ по п.30, в котором измеренный сигнал является флуоресцентным, люминесцентным или колориметрическим сигналом.

40. Способ по п.30, в котором длина волны визуализации равна от около 300 нм до около 900 нм и длина волны излучения равна от около 300 нм до около 900 нм.

41. Способ по п.30, в котором длина волны визуализации равна от около 540 нм до около 730 нм и длина волны излучения равна от около 650 нм до около 800 нм.

42. Способ скрининга терапевтических соединений, позволяющих эффективно лечить патофизиологическое состояние, ассоциированное с патогенными бактериями у субъекта, который включает:

отбор потенциального терапевтического соединения, воздействующего на патогенные бактерии;

контактирование бактериальных клеток или биологического образца, включающего указанные клетки, с субстратом бактериальной бета-лактамазы;

контактирование бактериальных клеток или бактериального образца, включающего указанные клетки, с потенциальным терапевтическим соединением; и

измерение флуоресцентного, люминесцентного или колориметрического сигнала, продуцированного бактериальными клетками в присутствии и отсутствии потенциального терапевтического соединения; при этом ослабление сигнала в присутствии терапевтического соединения по сравнению с сигналом при отсутствии указанного терапевтического соединения свидетельствует о терапевтическом воздействии данного соединения на патогенные бактерии.

43. Способ по п.42, в котором субстрат является флуорогенным субстратом CC1, CC2, CHPQ, CR2, CNIR1, CNIR2, CNIR3, CNIR4, CNIR5, CNIR5.2, CNIR5-QSY22, CNIR7, CNIR9, CNIR10, CNIR7-TAT, CNIR800, CNIR800.2, CNIR800-3, CDC-1, CDC-2, CDC-3, CDC-4, CDC-5, XHX2-81, XHX2-91, XHX3-1, XHX3-2, XHX3-26 или XHX3-32, их производным или аналогом.

44. Способ по п.42, в котором субстрат включает цветной краситель или химический реагент, эффективно вызывающий изменение цвета или pH.

45. Способ по п.44, в котором субстрат связан с частицей, микросферой или биотином.

46. Способ по п.42, в котором патогенные бактерии включают виды бактерий *Enterococcus*, *Clostridium*, *Srtreptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* или *Listeria*.

47. Способ по п.46, в котором патогенные бактерии включают *Mycobacterium tuberculosis* complex или *Mycobacterium avium* complex.

48. Способ по п.42, в котором патофизиологическое состояние является туберкулезом.

49. Способ по п.42, в котором сигнал, продуцируемый бактериальными клетками, имеет длину волны от около 300 нм до около 900 нм.

50. Способ по п.49, в котором сигнал, продуцируемый бактериальными клетками, имеет длину волны от около 650 нм до около 800 нм.

51. Субстрат для бактериальной бета-лактамазы, который продуцирует детектируемый флуоресцентный, люминесцентный или колориметрический сигнал под воздействием активности бета-лактамазы.

52. Субстрат по п.51, который является флуорогенным субстратом CDC-1, CDC-2,

CDC-3, CDC-4, CDC-5, CNIR5, CNIR5.2, CNIR5-QSY22, CNIR7, CNIR7-TAT, CNIR9, CNIR10, CNIR800, CNIR800.2, CNIR800-3, XHX2-81, XHX2-91, XHX3-1, XHX3-2, XHX3-26 или XHX3-32, их производным или аналогом.

53. Субстрат по п.51, который включает цветной краситель или химический реагент, эффективно вызывающий изменение цвета или pH под воздействием активности бета-лактамазы.

54. Субстрат по п.51, который далее включает связанную с ним частицу, микросферу или биотин.

55. Анализирующее устройство для визуального обнаружения патогенной бактерии в биологическом образце, которое включает:

платформу, имеющую приспособление для приема инкубируемой смеси, включающей биологический образец и цветообразующий субстрат для фермента бета-лактамазы, ассоциированной с патогенными бактериями, и приспособление для улавливания и концентрирования окрашенного продукта, образовавшегося под воздействием активности бета-лактамазы на субстрате, которое проточно сообщается с принимающим приспособлением.

56. Анализирующее устройство по п.55, которое далее включает приспособление, позволяющее только окрашенному продукту вытекать из принимающего приспособления.

57. Анализирующее устройство по п.55, которое далее включает внутреннее контролирующее приспособление, расположенное после принимающего приспособления.

58. Анализирующее устройство по п.55, которое далее включает приспособление для абсорбции текучей среды, вытекающей из принимающего приспособления.

59. Анализирующее устройство по п.55, в котором субстрат включает цветной краситель или химический реагент.

60. Анализирующее устройство по п.55, в котором субстрат связан с частицей или микросферой.

61. Анализирующее устройство по п.55, в котором субстрат включает химический реагент, при этом указанное устройство далее включает второй реагент в качестве средства для образования цвета из химического реагента.

62. Анализирующее устройство по п.55, в котором субстрат связан с биотином, при этом указанное устройство далее включает avidin в качестве средства для улавливания субстрата, связанного с биотином.