



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
A61N 5/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008136482/14, 11.09.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.09.2008

(45) Опубликовано: 10.03.2010 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: KOGAN B.YA. et al. Unsubstituted aluminium phthalocyanine nanoparticles as photosensitizer for PDT. // 6th Annual Congress of the European Society for Photodynamic Therapy Abstract Book. - Bern. - 2006. - p.64. RU 2329061 C1, 20.07.2008. RU 2291700 C2, 20.01.2007. RU 2329074 C1, 20.07.2008. US 2008139993 A1, 12.06.2008. WO 03106583 A1, (см. прод.)

Адрес для переписки:
123995, Москва, ГСП-5, ул. Б. Садовая, 1,
корп.4, ФГУП "ГНЦ "НИОПИК"

(72) Автор(ы):

Коган Борис Яковлевич (RU),
Андреева Татьяна Николаевна (RU),
Бутенин Александр Владимирович (RU),
Венедиктова Юлия Борисовна (RU),
Ворожцов Георгий Николаевич (RU),
Каляя Олег Леонидович (RU),
Лужков Юрий Михайлович (RU),
Лукьянец Евгений Антонович (RU),
Негримовский Владимир Михайлович (RU),
Панкратов Андрей Александрович (RU),
Пучнова Виола Александровна (RU),
Фейзулова Райся Курбан-Галиевна (RU),
Чиссов Валерий Иванович (RU),
Якубовская Раиса Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное Государственное унитарное предприятие "Государственный научный центр "Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей" (ФГУП "ГНЦ "НИОПИК") (RU),
Федеральное Государственное учреждение "Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи" (ФГУ "МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий") (RU)

(54) СПОСОБ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ОПУХОЛЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, онкологии, и может быть использовано для подавления роста опухолей. Для этого внутривенно вводят дисперсии наночастиц фотосенсибилизатора. Затем опухоль предварительно облучают лазерными импульсами в спектральной области поглощения наночастиц фотосенсибилизатора при плотности энергии в импульсе не ниже 0,1 Дж/см². После этого проводят световое

облучение опухоли в спектральной области поглощения молекулярной формы фотосенсибилизатора. Способ позволяет снизить необходимую дозу вводимого фотосенсибилизатора, уменьшить концентрацию спонтанно образующейся в здоровых органах и тканях молекулярной формы фотосенсибилизатора и за счет этого избежать побочных эффектов «кожной фототоксичности» при эффективном подавлении опухолевого роста. 5 табл.

(56) (продолжение):

24.12.2003. ШТАЙНИГЕР С. Оптимизация фармакокинетики препарата "Фотосенс" с помощью биodeградируемых наночастиц. // Антибиотики и химиотерапия. - 2001. - т.46. - №4. - с.6-10. CHENG Y. et al. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. // J Am Chem Soc. - 2008. - Aug 13; 130 (32):10643-7. Epub 2008 Jul 22. KOGAN B.Y. et al. Laser Heating of Sulphuretted Carbon Nanoparticles Inhibits Tumor Growth // Nanotech. - 2006. - Vol.2. - p.71-74.

R U 2 3 8 3 3 7 0 C 1

R U 2 3 8 3 3 7 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61N 5/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2008136482/14, 11.09.2008**

(24) Effective date for property rights:
11.09.2008

(45) Date of publication: **10.03.2010 Bull. 7**

Mail address:
**123995, Moskva, GSP-5, ul. B. Sadovaja, 1,
korp.4, FGUP "GNTs "NIOPIK"**

(72) Inventor(s):

**Kogan Boris Jakovlevich (RU),
Andreeva Tat'jana Nikolaevna (RU),
Butenin Aleksandr Vladimirovich (RU),
Venediktova Julija Borisovna (RU),
Vorozhtsov Georgij Nikolaevich (RU),
Kalija Oleg Leonidovich (RU),
Luzhkov Jurij Mikhajlovich (RU),
Luk'janets Evgenij Antonovich (RU),
Negrimovskij Vladimir Mikhajlovich (RU),
Pankratov Andrej Aleksandrovich (RU),
Puchnova Viola Aleksandrovna (RU),
Fejzulova Rajsja Kurban-Galievna (RU),
Chissov Valerij Ivanovich (RU),
Jakubovskaja Raisa Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe Gosudarstvennoe unitarnoe
predpriyatje "Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr
"Nauchno-issledovatel'skij institut
organicheskikh poluproduktov i krasitelej" (FGUP
"GNTs "NIOPIK") (RU),
Federal'noe Gosudarstvennoe uchrezhdenie
"Moskovskij nauchno-issledovatel'skij
onkologicheskij institut im. P.A. Gertsena
Federal'nogo agentstva po vysokotekhnologichnoj
meditsinskoj pomoshchi" (FGU "MNIOI im. P.A.
Gertsena Rosmedtehnologij") (RU)**

(54) METHOD OF TUMOUR GROWTH SUPPRESSION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: dispersions of photosensibiliser nanoparticles are introduced intravenously. After that tumour is preliminarily irradiated by laser pulses in spectral area of photosensibiliser nanoparticles absorption with pulse energy density not lower than 0.1 J/cm². After that light

irradiation of tumour is carried out in spectral area of absorption of molecular form of photosensibiliser.

EFFECT: method allows to reduce necessary dose of introduced photosensibiliser, reduce concentration of spontaneously formed in healthy organs and tissues molecular form of photosensibiliser.

5 tbl, 4 ex

Настоящее изобретение относится к медицине, а именно к лечению опухолей методом фотодинамической терапии (ФДТ).

При проведении ФДТ пациенту, как правило, системно вводится фотосенсибилизатор (ФС), после чего опухоль подвергается облучению светом в спектральном диапазоне, соответствующем полосе поглощения молекул ФС. В результате облучения происходит возбуждение молекул ФС, сопровождающееся образованием активных форм кислорода (в первую очередь синглетного кислорода), которые являются цитотоксическими агентами и вызывают гибель клеток опухоли.

Известны способы подавления роста опухолей методом ФДТ путем внутривенного введения ФС в виде истинного раствора [Dougherty T.J. et al., Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors, Cancer Res., 1978, 38, 2628-2635], в липосомах [A.S.L.Derycke and P.A.M. de Witte, Liposomes for photodynamic therapy. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56, 17-30], в мицеллах [C.F. van Nostrum, Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy, Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56, 9-16], в конъюгатах с наночастицами [M.E.Wieder, et al., Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a 'Trojan horse', Photochem. Photobiol. Sci., 2006, 5, 727-734] и др. с последующим облучением опухоли в спектральной области поглощения молекулярной формы ФС.

Недостатком этих способов является то, что здесь ФС проявляет фотодинамическую активность не только в опухоли, но и в здоровых тканях, в частности в коже. Так называемая «кожная фототоксичность» является одним из нежелательных побочных эффектов ФДТ. Пациентам приходится соблюдать определенный световой режим после введения ФС, избегая обычного освещения открытых участков кожи в течение нескольких дней, а иногда и недель.

Наиболее близким к заявляемому способу является способ подавления роста опухоли методом ФДТ путем внутривенного введения большой дозы (до 30 мг/кг) дисперсии наночастиц (НЧ) ФС и последующего облучения опухоли в спектральной области поглощения молекулярной формы ФС [В.Ya.Kogan, A.V.Butenin, A.A.Pankratov, R.I.Yakubovskaya, N.V.Bluhterova, R.A.Feysulova, V.A.Puchnova, V.M.Negrimovsky, E.A.Luk'yanets, G.N.Vorozhtsov, Unsubstituted aluminium phthalocyanine nanoparticles as photosensitizer for PDT, Abstract Book, 6th Annual Congress of the European Society for Photodynamic Therapy, Bern, 2006, p.64]. Сами по себе НЧ ФС не обладают фотодинамической активностью, но в биоткани они частично, хотя и очень слабо растворяются, и при этом образуется небольшое количество молекулярной формы ФС, обладающей фотодинамической активностью. Недостатком способа является вышеупомянутая «кожная фототоксичность».

Задачей настоящего изобретения является элиминация «кожной фототоксичности» после внутривенного введения ФС.

Поставленная задача решается тем, что после внутривенного введения дисперсии НЧ ФС производится облучение опухоли, а следовательно, и содержащихся в ней НЧ ФС лазерными импульсами в спектральной области поглощения НЧ ФС при плотности энергии в импульсе не ниже 0,1 Дж/см². Такое облучение приводит к импульсному нагреву НЧ с выделением молекулярной фотоактивной формы ФС, обладающей в отличие от НЧ флуоресцентной и фотодинамической активностью. Это позволяет существенно снизить необходимую дозу вводимого ФС по сравнению с прототипом и, следовательно, уменьшить концентрацию спонтанно образующейся в здоровых органах и тканях молекулярной формы ФС. Следует отметить, что фотоактивная форма ФС детектировалась только в облученной импульсным лазером

области. В здоровой коже и внутренних органах животного специфическая флуоресценция фотоактивной формы ФС отсутствовала (табл.1). После импульсного облучения проводится сеанс ФДТ путем облучения опухоли в спектральной области поглощения молекулярной формы ФС (спектры поглощения ФС в виде НЧ и в молекулярной форме различны). При таком способе ФС находится во всех органах и тканях (в том числе и в коже) в основном в неактивной форме (в виде НЧ) и только в опухоли активируется импульсным лазерным облучением, приводящим к образованию активной молекулярной формы ФС (табл.1).

Таблица 1							
Интенсивность флуоресценции мономерной фотоактивной формы ФС в опухолевом узле, здоровой коже и внутренних органах животных после внутривенного введения наночастиц ФС с последующим облучением опухолевого узла импульсным лазером							
	Орган/ткань						
	Опухолевый узел	Кожа в области уха	Кожа в области стопы	Мышечная ткань	Печень	Почки	Сердце
Интенсивность флуоресценции, у.е.	Наночастицы фталоцианина алюминия, 15 мг/кг						
	52000±11000	21±9	15±6	16±5	20±8	19±8	22±3
	Наночастицы фталоцианина алюминия, 3 мг/кг						
	32000±13000	25±8	20±10	22±9	27±8	21±8	16±9
	Наночастицы фталоцианина цинка, 3 мг/кг						
	24000±1300	18±5	23±5	16±8	20±9	14±8	19±7
	Наночастицы фталоцианина цинка, 1 мг/кг						
	7000±1700	15±5	18±3	22±7	12±7	19±7	23±9
Контроль (животные, которым не вводили наночастицы ФС)							
24±9	19±7	21±10	13±10	17±6	24±6	10±10	

Необходимые параметры импульса облучения могут быть определены расчетным путем. Введем следующие обозначения: r - радиус НЧ; k - коэффициент поглощения НЧ на длине волны облучения; c - объемная удельная теплоемкость НЧ; α - температуропроводность среды; Δt - длительность импульса облучения; E - плотность энергии импульса; ΔT - увеличение температуры НЧ, необходимое для образования молекулярной формы ФС. Наиболее благоприятным для максимального нагрева является адиабатический случай, когда за время импульса тепло не успевает перейти из НЧ в окружающую среду. Этот случай может быть реализован при $r > k^{-1}$, $\Delta t < k^{-2} \alpha^{-1}$. Приняв характерные значения $k=10^5 \text{ см}^{-1}$, $\alpha=10^{-3} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$, получим, что адиабатический случай может быть реализован при радиусе НЧ больше 100 нм и длительности светового импульса короче 100 нс. При этом нагрев ΔT определяется соотношением $c\Delta T = kE$.

Приняв характерные значения $c=2 \text{ Дж см}^{-3} \text{ К}^{-1}$, $\Delta T=500 \text{ К}$, получим величину, необходимой для нагрева НЧ плотности энергии импульса $E=0,01 \text{ Дж/см}^2$. С учетом того, что излучение сильно ослабляется при прохождении в глубину опухоли, за минимальную плотность энергии импульса следует принять на порядок большую величину $E=0,1 \text{ Дж/см}^2$. При более длинном импульсе или меньшем радиусе НЧ для нужного нагрева потребуется более высокая плотность энергии импульса E . В общем случае, чем больше величина E , тем более толстый слой опухоли может быть обработан. Допустимая верхняя граница величины E определяется допустимой величиной нагрева прилегающей к опухоли здоровой ткани и составляет несколько десятков Дж/см^2 (такие плотности мощности применяются в косметологических кабинетах при лазерном удалении пигментных пятен, татуировок и пр.).

Исследования проводили на мышах с привитой опухолью (саркома S-37). НЧ фталоцианинов (средний радиус 100-150 нм, максимальный радиус 500 нм) вводили

внутривенно в дозах от 0,5 до 15 мг/кг веса. Были испытаны НЧ фталоцианина цинка (ZnPc), алюминия (AlPc) и безметалльного (H₂Pc). Затем опухоль облучали импульсами лазера на рубине с модуляцией добротности. Плотность энергии в импульсе была не ниже 0,1 Дж/см². Доказательством появления молекулярной формы ФС в опухоли служило появление в облученной зоне, в отличие от необлученной, флуоресценции молекулярной формы ФС. После этого проводился сеанс ФДТ с последующей оценкой ее терапевтической эффективности. Для этого опухолевый узел облучали непрерывным излучением лазера с длиной волны 670 нм, попадающей в полосу поглощения молекулярной формы ФС. Оценку противоопухолевого эффекта производили по торможению роста опухоли (ТРО, %), которое рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО}(\%) = \left[\frac{\text{РО}_{\text{контроль}} - \text{РО}_{\text{опыт}}}{\text{РО}_{\text{контроль}}} \right] \times 100,$$

где РО_{контроль} - размер опухоли в контрольной, а РО_{опыт} - в опытной группе.

Предлагаемое изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

Трем группам мышей с опухолью (саркома S-37) наночастицы (НЧ) фталоцианина цинка (ZnPc) вводили внутривенно в дозе 7 мг/кг. Четвертая группа мышей была контрольной. Затем у животных было произведено облучение опухолевого узла импульсами рубинового лазера ($\lambda=694$ нм). Плотность энергии в импульсе в центре светового пятна достигала 1 Дж/см² и спадала к периферии пятна до 0,1 Дж/см². В первой группе опухоль была облучена 1 импульсом, во второй - 5 и в третьей - 10 импульсами. НЧ ZnPc хорошо поглощают излучение с длиной волны 694 нм. После импульсного облучения была измерена интенсивность флуоресценции в каждом опухолевом узле. Затем опухоли были облучены непрерывным лазером на длине волны 670 нм (ФДТ, 100 мВт/см², 15 мин). Молекулярная форма ZnPc хорошо поглощает излучение с длиной волны 670 нм. Результаты представлены в табл.2.

Интенсивность флуоресценции в опухоли и противоопухолевая эффективность ФДТ после импульсного облучения опухолевого узла с НЧ ZnPc (7 мг/кг) у мышей с S-37									
№ п.п.	Доза ZnPc, мг/кг	Количество импульсов	Интенсивность флуоресценции (у.е.)	ФДТ	ТРО на сутки после лечения, %				
					8	12	15	18	20
1	7	1	1900±600	100 мВт/см ² 15 мин	88	79	69	47	38
2		5	4160±1200		96	92	90	74	67
3		10	6800±3100		96	94	91	87	78

Из данных табл.2 видно, что интенсивность флуоресценции в опухоли растет с увеличением числа импульсов облучения. Это говорит о накоплении в ней молекулярной фотоактивной формы ФС. Об этом же свидетельствует терапевтическая эффективность последующей ФДТ, степень выраженности которой коррелирует с интенсивностью флуоресценции и, значит, с количеством накопившегося ФС.

Пример 2

Трем группам мышей с опухолью (саркома S-37) НЧ ZnPc вводили внутривенно в дозе 15 мг/кг. Четвертая группа мышей была контрольной. Затем у животных в первой и третьей группах было произведено облучение опухолевого узла импульсами рубинового лазера (10 импульсов; $\lambda=694$ нм) с плотностью энергии в импульсе такой же, как в примере 1. После этого у всех животных была измерена интенсивность флуоресценции в опухоли. Затем у мышей во второй и третьей группах опухолевые узлы были облучены непрерывным лазером (ФДТ - $\lambda=670$ нм; 100 мВт/см², 15 мин).

Результаты представлены в таблице 3.

Интенсивность флуоресценции в опухоли и противоопухолевая эффективность ФДТ после импульсного облучения опухолевого узла с НЧ ZnPc (15 мг/кг) у мышей с S-37										
№ п.п.	Доза ZnPc, мг/кг	Количество импульсов	Интенсивность флуоресценции (у.е.)		ФДТ	ТРО на сутки после лечения, %				
			опухолевый узел	кожа в области лапы		9	13	16	18	20
1	15	10	31000±15000	33±21	-	39	27	19	20	6
2		0	24±11	26±18	100 мВт/см ² , 15 мин	47	29	25	25	27
3		10	24000±9600	31±12	100 мВт/см ² , 15 мин	100	100	100	100	100
4	0	-	27±16	23±12	-	-	-	-	-	-

Из данных табл.3 видно, что флуоресценция молекулярной формы ФС в опухолевом узле регистрируется только после его импульсного облучения. В коже, которая не была подвержена воздействию импульсного лазерного излучения, специфическая флуоресценция молекулярной фотоактивной формы ФС отсутствовала.

В отдельности импульсное облучение и ФДТ, проведенные после введения НЧ ZnPc, не оказывали терапевтического действия (опытные группы 1 и 2), а их последовательное применение (опытная группа 3) приводило к полной регрессии опухолевого узла (в течение последующих 20 суток рецидива опухоли отмечено не было). Полученные данные подтверждают высокую терапевтическую эффективность предложенного способа. Низкая противоопухолевая эффективность, отмеченная у животных, которым проводили только ФДТ (опытная группа 2), подтверждает отсутствие в зоне воздействия (опухолевый узел) фотоактивной формы ФС.

Молекулярная фотоактивная формы ФС в здоровой коже практически отсутствовала (табл.3), поэтому развития такого тяжелого побочного эффекта ФДТ, как «кожная фототоксичность», не происходило.

Пример 3

Трем группам мышей с опухолью S-37 НЧ AlPc вводили внутривенно в дозе 0,5 мг/кг. Четвертая группа мышей была контрольной. Затем у животных первой группы было произведено облучение опухолевого узла импульсами рубинового лазера (694 нм) с плотностью энергии в импульсе такой же, как в примере 2 (10 импульсов). НЧ AlPc хорошо поглощают излучение с длиной волны 694 нм. У животных второй группы опухолевый узел был облучен непрерывным лазером на длине волны 670 нм (ФДТ, 50 мВт/см², 15 мин), а третьей группы - сначала импульсным (10 импульсов), а затем непрерывным излучением (ФДТ, 50 мВт/см², 15 мин). Молекулярная форма AlPc хорошо поглощает излучение с длиной волны 670 нм. Результаты представлены в табл.4.

Влияние импульсного и непрерывного облучения (ФДТ) и также их комбинации после предварительного введения НЧ AlPc (0,5 мг/кг) на ТРО у мышей с S-37						
№ группы (облучение)	ТРО на сутки после лечения, %					
	7	9	12	14	16	19
1 (импульсное облучение)	19	16	-1	29	15	22
2 (непрерывное облучение; ФДТ)	-13	-17	-37	-40	-11	-34
3 (имп. + ФДТ)	93	93	90	87	77	73

Из данных табл.4 видно, что импульсное облучение и ФДТ в отдельности не приводили к биологически значимому торможению роста опухоли (группы 1 и 2), в то

время как их последовательное применение оказывало выраженное терапевтическое действие - ТРО на уровне 93-70% наблюдали в течение 19 суток после лечения (группа 3). Эти данные также подтверждает высокую терапевтическую эффективность предложенного способа. У животных всех групп «кожная фототоксичность» отсутствовала.

Пример 4

Трем группам мышей с опухолью S-37 НЧ Н₂Рс вводили внутривенно в дозе 3 мг/кг. Четвертая группа мышей была контрольной. Затем у животных первой группы было проведено облучение опухолевого узла импульсами рубинового лазера (694 нм) с плотностью энергии в импульсе такой же, как в примере 2 (100 импульсов). НЧ Н₂Рс хорошо поглощают излучение с длиной волны 694 нм. У мышей второй группы опухоль была облучена непрерывным лазером на длине волны 670 нм (ФДТ, 50 мВт/см², 15 мин), а третьей группы - сначала импульсным (10 импульсов), а затем непрерывным лазерным излучением (ФДТ, 50 мВт/см², 15 мин). Молекулярная форма Н₂Рс хорошо поглощает излучение с длиной волны 670 нм. Результаты представлены в табл.5.

Таблица 5

Влияние импульсного и непрерывного облучения (ФДТ) и также их комбинации после предварительного введения НЧ Н₂Рс (3 мг/кг) на ТРО у мышей с S-37

№ группы (облучение)	ТРО на сутки после лечения, %					
	6	11	13	16	18	20
1 (имп. облучение)	55	46	46	44	26	39
2 (непр. обл.; ФДТ)	44	38	21	20	16	-5
3 (имп. + ФДТ)	92	86	87	78	74	73

Как видно из данных, представленных в табл.5, только импульсное облучение после предварительно введенных НЧ Н₂Рс приводило к непродолжительному (только в течение 6 дней после лечения) биологически значимому ТРО на 55% (опытная группа 1). Непрерывное облучение опухолевого узла в исследованном режиме не оказывало биологически значимого противоопухолевого действия (опытная группа 2). Наилучший терапевтический эффект отмечен у животных третьей группы, у которых проводили ФДТ после предварительного облучения опухолевого узла импульсным лазером: ТРО на уровне 92%-73% сохранялось более 20 дней после лечения (табл.5, опытная группа 3). Полученные результаты подтверждают высокую терапевтическую эффективность предложенного способа. Следует отметить, что у животных всех групп «кожная» фототоксичность отсутствовала.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет исключить кожную фототоксичность при эффективном подавлении опухолевого роста.

Формула изобретения

Способ подавления роста опухолей методом фотодинамической терапии, включающий внутривенное введение дисперсии наночастиц фотосенсибилизатора и световое облучение опухоли в спектральной области поглощения молекулярной формы фотосенсибилизатора, отличающийся тем, что после введения наночастиц фотосенсибилизатора опухоль предварительно облучают лазерными импульсами в спектральной области поглощения наночастиц фотосенсибилизатора при плотности энергии в импульсе не ниже 0,1 Дж/см².