



(51) МПК
A61B 18/18 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61B 18/18 (2020.08); *A61B 2018/1807* (2020.08); *A61K 41/0042* (2020.08); *A61K 41/0057* (2020.08); *A61K 39/44* (2020.08); *A61K 2121/00* (2020.08); *A61K 2123/00* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020102485, 24.09.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.09.2019

Дата регистрации:
15.01.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.09.2019

(45) Опубликовано: 15.01.2021 Бюл. № 2

Адрес для переписки:
115409, Москва, Каширское ш., 31, НИЯУ
МИФИ, ОУИС УНИ, Бейгул Г.В.

(72) Автор(ы):

Соколов Павел Михайлович (RU),
 Набиев Игорь Руфаилович (RU),
 Нифонтова Галина Олеговна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Национальный
 исследовательский ядерный университет
 МИФИ" (НИЯУ МИФИ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2638446 C1, 13.12.2017. RU
 2629390 C2, 29.08.2017. US 20100247436 A1,
 30.09.2010. LI. L. et al. Polymeric nanocarrier
 systems for photodynamic therapy // Biomaterials
 Research, 2014, V.18, pp.1-14.

(54) НАБОР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинских исследований и предназначено для снижения токсичности фотосенсибилизаторов. Раскрыт набор для проведения фотодинамической терапии, включающий активный компонент, состоящий из одной или более микрокапсул, содержащих внутри одну или более молекул гасителя, а также одну или более молекул фотосенсибилизатора, на внешней поверхности микрокапсул и молекулах фотосенсибилизатора иммобилизованы однодоменные антитела, при этом оболочка микрокапсулы выполнена из гибридного светочувствительного материала, который способен разрушаться оптическим излучением, причем спектр излучения, вызывающий активацию фотосенсибилизатора совпадает со спектром излучения, который вызывает разрушение оболочки микрокапсул.

Набор также включает вспомогательный компонент, состоящий из одной или более квантовых точек, объединенных с одной или более биологической распознающей молекулой, причем спектр флуоресценции квантовых точек находится в оптическом диапазоне, вызывающем активацию молекул фотосенсибилизатора и разрушение оболочки микрокапсул, при этом биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела способны специфически связывать различные эпитопы онкомаркеров, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток, разрушение которых необходимо произвести. Изобретение обеспечивает снижение теневой токсичности фотосенсибилизаторов и специфическую доставку к опухолевым клеткам, что позволяет достигнуть высокой эффективности и безопасности терапии. 6 з.п. ф-лы, 1 пр., 1 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61B 18/18 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61B 18/18 (2020.08); *A61B 2018/1807* (2020.08); *A61K 41/0042* (2020.08); *A61K 41/0057* (2020.08); *A61K 39/44* (2020.08); *A61K 2121/00* (2020.08); *A61K 2123/00* (2020.08)

(21)(22) Application: **2020102485, 24.09.2019**(24) Effective date for property rights:
24.09.2019Registration date:
15.01.2021

Priority:

(22) Date of filing: **24.09.2019**(45) Date of publication: **15.01.2021 Bull. № 2**

Mail address:

**115409, Moskva, Kashirskoe sh., 31, NIYAU MIFI,
OUIS UNI, Bejgul G.V.**

(72) Inventor(s):

**Sokolov Pavel Mikhajlovich (RU),
Nabiev Igor Rufailovich (RU),
Nifontova Galina Olegovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Natsionalnyj issledovatel'skij
yadernyj universitet MIFI" (NIYAU MIFI) (RU)**

(54) PHOTODYNAMIC THERAPY KIT

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medical research and aims at reducing toxicity of photosensitizers. Disclosed is a photodynamic therapy kit comprising an active component consisting of one or more microcapsules containing one or more damper molecules, as well as one or more photosensitizer molecules, on external surface of microcapsules and photosensitizer molecules single-domain antibodies are immobilized, wherein the microcapsule shell is made of a hybrid light-sensitive material which is capable of being destroyed by optical radiation, wherein the radiation spectrum which activates the photosensitiser coincides with a radiation spectrum which causes destruction of the microcapsule membrane. Kit also

includes an auxiliary component consisting of one or more quantum dots combined with one or more biological recognition molecules, wherein the fluorescence spectrum of the quantum dots is in the optical range causing the photosensitizer molecules activation and the microcapsule membrane destruction, wherein biological recognition molecules and single-domain antibodies are able to specifically bind different epitopes of oncomarkers expressed on the surface of tumour cells, the destruction of which is necessary.

EFFECT: invention provides reduced shadow toxicity of photosensitizers and specific delivery to tumour cells, which enables to achieve high effectiveness and safety of therapy.

7 cl, 1 ex, 1 dwg

Изобретение относится к области медицинских исследований, и предназначена для снижения токсичности фотосенсибилизаторов (ФС), применяемых при фотодинамической терапии (ФДТ). Предлагаемое изобретение направлено на снижение генерации свободных радикалов и синглетных форм кислорода до достижения ФС опухолевых клеток, способствуя снижению фоновой токсической нагрузки ФС на организм.

Известен способ диагностики и терапии рака методом фотодинамической терапии и комплексный фотосенсибилизатор для осуществления известного способа, описанный в заявке [1]. Комплексный ФС представляет собой конъюгат квантовых точек (КТ) и производных хлорина (собственно фотосенсибилизатор). Для проведения фотодинамической терапии данный комплексный ФС вводится в организм и облучается излучением с длиной волны, соответствующей длине волны поглощения КТ, которые затем передают возбуждение по механизму Ферстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ) на молекулы производных хлорина, вследствие чего образуются синглетные формы кислорода и свободные радикалы, вызывающие гибель клеток. При этом для специфического накопления комплексного ФС в опухолевых клетках, на их поверхности содержатся биологические распознающие молекулы, в частности, антитела. Кроме того, излучение КТ используется для детекции и визуализации опухолевых клеток. Благодаря применению КТ, флуоресцирующих в инфракрасной области спектра, описанный комплексный ФС может использоваться не только для проведения ФДТ, но и визуализации опухолевых клеток в глубине тканей организма, что обусловлено более низким поглощением излучения ИК диапазона биологическими тканями. К недостаткам известного решения стоит отнести то, что любой фотосенсибилизатор обладает теневой токсичностью, т.е. может генерировать синглетные формы кислорода и свободные радикалы без внешнего активирующего излучения. Применение КТ, которые эффективно поглощают оптическое излучение в широком диапазоне длин волн, также усиливает теневую фоновую активность фотосенсибилизатора, что приводит к увеличению токсичности и тяжести последствий введения в организм ФС для ФДТ.

Известен носитель для диагностики, направленной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных средств, описанный в патенте [2]. Известный носитель представляет собой полимерную микрокапсулу из полиэлектролитов, на поверхности которых иммобилизованы однодоменные антитела, а оболочка микрокапсулы содержит магнитные наночастицы и инфракрасные КТ, необходимые для направленной доставки и детекции носителя. При этом внутрь микрокапсулы помещаются лекарственные средства, например, применяемые для фотодинамической терапии. К недостаткам известного решения стоит отнести то, что данный носитель не позволяет снизить теневую токсичность фотосенсибилизатора, что вызывает негативные последствия от применения данного носителя для доставки ФС при ФДТ.

Известен способ визуализации и направленного разрушения опухолевых клеток, описанный в патенте [3]. Раскрытый в патенте комплекс, используемый для визуализации и направленного разрушения опухолевых клеток, выбран в качестве аналога, предлагаемого изобретения. Известный комплекс состоит из объединенных молекул фотосенсибилизатора, КТ, флуоресцирующих в инфракрасной области спектра, плазмонных наночастиц и биологических распознающих молекул, что позволяет проводить визуализацию и направленное разрушение опухолевых клеток, локализованных на большой глубине от поверхности исследуемого организма. Применение плазмонных наночастиц в составе комплекса, позволяет усилить флуоресценцию, использованных КТ, что позволяет, во-первых, с высокой

чувствительностью детектировать флуоресцентный сигнал на большой глубине от поверхности исследуемого объекта, а во-вторых, усилить процесс активации молекул фотосенсибилизатора, для более эффективного разрушения клеточных компонент по механизму фотодинамической терапии. Однако известный аналог обладает высокой фоновой токсичностью, так как не предусматривает каких-либо технических решений для снижения теневой токсичности, используемых фотосенсибилизаторов, а также увеличивает свето-зависимую активацию ФС, даже на стадиях, пока фотосенсибилизатор не достиг опухолевых клеток.

Технический результат предлагаемого набора для проведения фотодинамической терапии заключается в снижении теневой токсичности препаратов для фотодинамической терапии, а также их специфической доставке к опухолевым клеткам, обеспечивая тем самым высокую эффективность и безопасность проведения фотодинамической терапии.

Технический результат достигается тем, что предложен набор для проведения фотодинамической терапии, включающий активный компонент, состоящий из одной или более микрокапсул, содержащих внутри одну или более молекул гасителя, а также одну или более молекул фотосенсибилизатора, на внешней поверхности микрокапсул и молекулах фотосенсибилизатора иммобилизованы однодоменные антитела, при этом оболочка микрокапсулы выполнена из гибридного светочувствительного материала, который способен разрушаться оптическим излучением, причем спектр излучения, вызывающий активацию фотосенсибилизатора совпадает со спектром излучения, который вызывает разрушение оболочки микрокапсул, а также включающий вспомогательный компонент, состоящий из одной или более квантовых точек, объединенных с одной или более биологической распознающей молекулой, причем спектр флуоресценции квантовых точек находится в оптическом диапазоне, вызывающем активацию молекул фотосенсибилизатора и разрушение оболочки микрокапсул, при этом биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела способны специфически связывать различные эпитопы онкомаркеров, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток, разрушение которых необходимо произвести.

Одним из основных недостатков современных существующих препаратов, применяемых для ФДТ, является их фоновая токсичность, или как еще ее называют теневая токсичность. Она проявляется в том, что даже без внешнего возбуждающего излучения молекулы ФС генерируют синглетные формы кислорода и свободные радикалы, что приводит к разрушению здоровых окружающих клеток. Одним из известных подходов для снижения теневой токсичности ФС является использование, так называемых, гасителей, которые нейтрализуют образующиеся синглетные формы кислорода и свободные радикалы. Однако для эффективного разрушения клеток по механизму ФДТ, гасители необходимо удалить, когда ФС достигнет опухолевых клеток. Применение двухкомпонентного набора позволяет добиться удаления гасителей и активации ФС, только в момент, когда компоненты набора достигли опухолевых клеток. Первый компонент предлагаемого набора - это активный компонент, который состоит из микрокапсулы с гибридной светочувствительной оболочкой, внутрь которой помещены молекулы гасителя и ФС, а на поверхности молекул ФС и оболочки микрокапсулы иммобилизованы однодоменные антитела, которые необходимы для специфического связывания онкомаркеров на поверхности опухолевых клеток. Второй компонент набора - вспомогательный, состоит из КТ, на поверхности которых иммобилизованы биологические распознающие молекулы, связывающий другой эпитоп (участок) того же самого онкомаркера, что и однодоменные антитела активного

компонента. Материал оболочки микрокапсул, фотосенсибилизатор и КТ подобраны так, чтобы максимум спектра флуоресценции КТ, находился в диапазоне длин волн, вызывающих активацию фотосенсибилизатора и индуцировал разрушение оболочки микрокапсул. Таким образом, после введения компонентов набора в организм теневая токсичность ФС снижена, за счет того, что он пространственно объединен внутри микрокапсулы с молекулами гасителя, которые эффективно перехватывают образующиеся синглетные формы кислорода и свободные радикалы. В момент, когда оба компонента набора достигли опухоли, они связываются с онкомаркерами на поверхности опухолевых клеток, что обеспечивает сближение активного и вспомогательного компонентов носителя на расстояние, при котором возможна эффективная передача энергии излучения от КТ на молекулы ФС и оболочку микрокапсул. В результате облучения места локализации компонентов набора лазерным излучением с длиной волны, соответствующим спектру поглощения КТ они, возбуждаясь, передают энергию (переизлучением или по механизму ФРПЭ) на оболочку микрокапсулы, индуцируя ее разрыв, и на молекулы ФС, активируя их. В результате после разрушения оболочки молекулы ФС и гасителя оказываются пространственно разобщены и гасители перестают поглощать синглетные формы кислорода и свободные радикалы от активированного ФС, обеспечивая эффективное разрушение опухолевых клеток по механизму ФДТ. При этом, находящиеся на поверхности молекул ФС однодоменные антитела служат для удержания молекул ФС вблизи вспомогательного комплекса и опухолевых клеток, что необходимо для эффективного их разрушения по механизму ФДТ.

Возможен частный случай, в котором микрокапсулы изготовлены из липидов, и/или белков, и/или сахаридов, и/или органических полимеров, и/или неорганических полимеров или их смесей.

Также возможен частный случай, когда в качестве молекул фотосенсибилизатора применяют молекулы фотосенсибилизаторов, активирующиеся излучением инфракрасной области оптического спектра.

Возможен частный случай, когда в качестве гасителей синглетных форм кислорода и свободных радикалов применены органические соединения, например, аминокислоты и их производные и/или белки, и/или полисахариды.

Существует частный случай, в котором в качестве квантовых точек применены полупроводниковые нанокристаллы состава $PbS/CdS/ZnS$ и/или $CuInS_2/ZnS$, и/или Ag_2S .

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

Также возможен частный случай, в котором используемые биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела способны специфически связывать онкомаркеры, например, HER2 или CEA, или EGFR, или EpCAM.

На фиг. 1 представлен конкретный пример набора для проведения фотодинамической терапии. Цифрами обозначены следующие элементы: оболочка микрокапсулы - 1; фотосенсибилизатор - 2; однодоменные антитела, иммобилизованные на поверхности фотосенсибилизатора и оболочки микрокапсулы - 3; гаситель - 4; квантовая точка - 5; биологические распознающие молекулы - 6; клетка, которая будет разрушена данным набором - 7; онкомаркер, связываемый биологическими распознающими молекулами и однодоменными антителами - 8.

Конкретный пример, поясняющий принцип работы набора для проведения

фотодинамической терапии показан на примере направленного разрушения опухолевых клеток, экспрессирующих маркер рака молочной железы HER2, в сравнении с известным решением, выбранным в качестве аналога, в котором в качестве фотосенсибилизатора также использовался фотодитазин. Для этого использовался набор состоящий из

5 активного компонента состава: в качестве микрокапсулы использовалась светочувствительная липосома из 3-sn-фосфатидилэтаноламина, диолеилфосфатидилхолина, холестерина и 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин порфирина, оболочка которой разрушается при облучении излучением с

10 длиной волны 665 нм; в качестве фотосенсибилизатора использовался фотодитазин (максимум поглощения при 662 нм), конъюгированный с однодоменными антителами к онкомаркеру HER2; в качестве гасителя применены дипептиды из двух молекул гистидина; на поверхности оболочки липосом иммобилизованы однодоменные антитела к онкомаркеру HER2; и вспомогательного компонента состоящего из КТ состава $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, имеющих максимум флуоресценции на 660 нм, конъюгированных с

15 моноклональными антителами к HER2. Кроме того, для сравнения эффективности снижения теневой токсичности в примере был использован аналогичный по составу набор, отличающийся тем, что в состав активного комплекса не входили молекулы гасителя. Исследование проводилось на клеточной линии SK-BR-3, экспрессирующей онкомаркер HER2. Клетки были выращены в среде RPMI-1640 с добавлением 10%

20 фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, антибиотика пенициллин-стрептомицин, пирувата натрия и раствора витаминов для среды RPMI-1640 в инкубаторе при 37°C с 5% CO_2 в атмосфере. По достижении монослоя клетки были удалены с поверхности флакона для культивирования, и их количество было определено известным

25 способом. Затем клетки SK-BR-3 были посажены в шесть культуральных флакона из расчета 10^6 клеток в одном флаконе, в описанную ранее ростовую среду. В флаконы 1А и 1Б были добавлены компоненты предлагаемого набора, в флаконы 2А и 2Б комплекс фотосенсибилизатора, описанный в прототипе, в флаконы 3А и 3Б были добавлены компоненты предлагаемого набора, не содержащие молекул гасителя,

30 причем количество добавленных компонентов было нормировано на количество молекул фотосенсибилизатора. Через 30 минут культивирования флаконы 1А, 2А и 3А были облучены излучением с длиной волны 620 нм (5 раз по 1 минуте с перерывом 3 минуты). Затем, спустя 3 часа, известным способом (с помощью проточной цитометрии) было оценено количество выживших клеток в флаконах 1А, 2А и 3А. Количество живых

35 клеток в флаконах 1Б, 2Б и 3Б без облучения было определено через 3 часа после начала культивирования. В результате процент выживших клеток в флаконе 1А (с предлагаемым набором) составил 18%, в флаконе 2А (с прототипом) - 12%, в флаконе 3А (с предлагаемым набором без гасителя) - 16%. При этом количество выживших клеток в флаконе 1Б было 90%, в флаконе 2Б - 65%, а в флаконе 3Б - 73%. Таким образом

40 предлагаемый набор позволяет приблизительно в три раза снизить теневую токсичность ФС в сравнении с прототипом и аналогичным набором без гасителя, при сравнимой эффективности разрушения клеток по механизму ФДТ.

Таким образом, предложенный набор позволяет снизить теневую токсичность препаратов для ФДТ, за счет поглощения образующихся синглетных форм кислорода и свободных радикалов молекулами гасителя, до момента пока молекулы ФС не достигли опухолевых клеток. При этом по достижению ФС опухолевых клеток происходит отделение гасителя и опухолевые клетки эффективно разрушаются по механизму ФДТ, что позволяет снизить токсическую нагрузку на организм при терапии

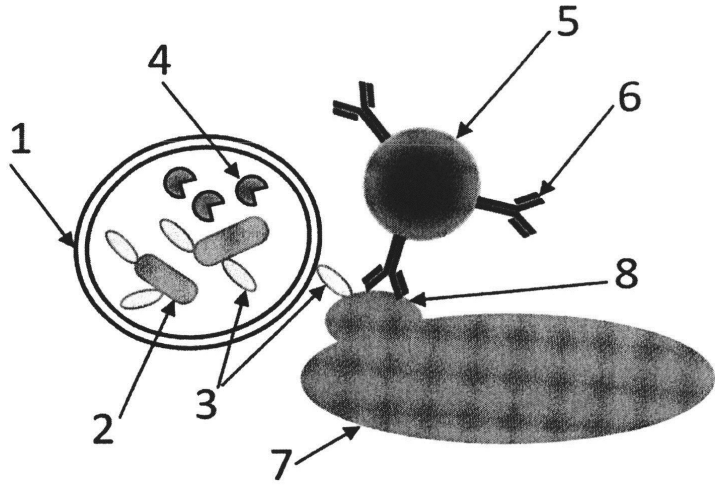
онкологических заболеваний методами фотодинамической терапии.

Источники информации

1. Woong Shick Ahn et al. В Photosensitizer containing conjugates of quantum dot-chlorine derivatives and composition for treating and diagnosing cancer containing same for photodynamic therapy. Международный патент WO 2010151074 A2.
2. Нифонтова Г.О., Суханова А.В., Набиев И.Р. Носитель для диагностики, направленной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных средств. Патент Российской Федерации RU 2693485.
3. Соколов П.М., Суханова А.В., Набиев И.Р. Способ визуализации и направленного разрушения раковых клеток. Патент Российской Федерации RU 2638446 C1.

(57) Формула изобретения

1. Набор для проведения фотодинамической терапии, включающий активный компонент, состоящий из одной или более микрокапсул, содержащих внутри одну или более молекул гасителя, а также одну или более молекул фотосенсибилизатора, на внешней поверхности микрокапсул и молекулах фотосенсибилизатора иммобилизованы однодоменные антитела, при этом оболочка микрокапсулы выполнена из гибридного светочувствительного материала, который способен разрушаться оптическим излучением, причем спектр излучения, вызывающий активацию фотосенсибилизатора совпадает со спектром излучения, который вызывает разрушение оболочки микрокапсул, а также включающий вспомогательный компонент, состоящий из одной или более квантовых точек, объединенных с одной или более биологической распознающей молекулой, причем спектр флуоресценции квантовых точек находится в оптическом диапазоне, вызывающем активацию молекул фотосенсибилизатора и разрушение оболочки микрокапсул, при этом биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела способны специфически связывать различные эпитопы онкомаркеров, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток, разрушение которых необходимо произвести.
2. Набор по п. 1, отличающийся тем, что микрокапсулы изготовлены из липидов, и/или белков, и/или сахаридов, и/или органических полимеров, и/или неорганических полимеров или их смесей.
3. Набор по п. 1, отличающийся тем, что в качестве молекул фотосенсибилизатора применяют молекулы фотосенсибилизаторов, активирующиеся излучением инфракрасной области оптического спектра.
4. Набор по п. 1, отличающийся тем, что в качестве гасителей применены органические соединения, например аминокислоты и их производные, и/или белки, и/или полисахариды.
5. Набор по п. 1, отличающийся тем, что в качестве квантовых точек применены полупроводниковые нанокристаллы состава PbS/CdS/ZnS, и/или CuInS₂/ZnS, и/или Ag₂S.
6. Набор по п. 1, отличающийся тем, что в качестве биологических распознающих молекул используют нативные белки, и/или модифицированные белки, и/или поликлональные антитела, и/или моноклональные антитела, и/или высокоаффинные биологические компоненты, и/или пептиды, и/или нуклеиновые кислоты.
7. Набор по п. 1, отличающийся тем, что используемые биологические распознающие молекулы и однодоменные антитела способны специфически связывать онкомаркеры, например HER2, или CEA, или EGFR, или EpCAM.



Фиг. 1