

# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2792161

### СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ И КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В УКАЗАННОМ СПОСОБЕ

Патентообладатель: *Общество с ограниченной ответственностью  
"МАГНИТНАЯ ДОСТАВКА ПРЕПАРАТОВ" (RU)*

Авторы: *Сухоруков Глеб Борисович (RU), Пятаев Николай  
Анатольевич (RU), Тишин Александр Метталинович (RU)*

Заявка № 2020139435

Приоритет изобретения **01 декабря 2020 г.**

Дата государственной регистрации  
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **17 марта 2023 г.**

Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает **01 декабря 2040 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
Сертификат 68b80077e14e40f0a94edbd24145d5c7  
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 2.03.2022 по 26.05.2023

*Ю.С. Зубов*





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61N 2/12 (2023.01); B01J 13/02 (2023.01)

(21)(22) Заявка: 2020139435, 01.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
01.12.2020

Дата регистрации:  
17.03.2023

Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 01.12.2020

(43) Дата публикации заявки: 02.06.2022 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 17.03.2023 Бюл. № 8

Адрес для переписки:  
190900, г. Санкт-Петербург, ВОХ 1125, Нилова  
Мария Иннокентьевна

(72) Автор(ы):  
Сухоруков Глеб Борисович (RU),  
Пятаев Николай Анатольевич (RU),  
Тишин Александр Метталинович (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
Общество с ограниченной ответственностью  
"МАГНИТНАЯ ДОСТАВКА  
ПРЕПАРАТОВ" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2633918 C9, 28.12.2017. RU  
2295933 C2, 27.03.2007. US 7842281 B2,  
30.11.2010. WO 2009142439 A3, 25.02.2010.  
СТАРЧИКОВ С.С. Магнитные, структурные  
и электронные свойства наночастиц сульфидов  
и оксидов железа с различной  
кристаллической структурой. Диссертация на  
соискание ученой степени кандидата физико-  
математических наук. Москва 2015, (см.  
прод.)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ  
МАГНИТНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ И КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В УКАЗАННОМ СПОСОБЕ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, в частности к онкологии, и может быть использована при лечении злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии. Способ по изобретению включает стадии доставки в область опухоли полимерных микрокапсул на основе декстрансульфата натрия и гидрохлорида полиаргинина в эффективной концентрации, содержащих магнитные наночастицы на основе оксида железа Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, воздействия на область опухоли переменным электромагнитным полем (ПемП) с амплитудой от 50 до 300 Э и частотой от 50 до 400 кГц, где время воздействия указанного магнитного поля при температуре от 38 до 51 °С составляет от 10 до 70 мин, и селективного повреждения или разрушения опухолевых клеток в области

опухоли без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани. Применение по изобретению касается композиции, содержащей полимерные микрокапсулы на основе декстрансульфата натрия и гидрохлорида полиаргинина в эффективной концентрации, содержащие магнитные наночастицы на основе оксида железа Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Использование изобретений позволяет обеспечить повышение эффективности лечения за счет локализации полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, в области опухоли и их контролируемого равномерного нагрева под действием переменного электромагнитного поля, а также снижение нежелательных побочных

явлений вследствие возможности применения наночастиц в более низких дозах. 2 н. и 31 з.п. ф-лы, 6 ил., 3 пр.

(56) (продолжение):

с.130-145. SHANG-HSIU HU et.al. Controlled Rupture of Magnetic Polyelectrolyte Microcapsules for Drug Delivery. Langmuir 2008, 24, 11811-11818, abstract.

R U 2 7 9 2 1 6 1 C 2

R U 2 7 9 2 1 6 1 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61N 2/12* (2006.01)  
*B01J 13/02* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A61N 2/12 (2023.01); B01J 13/02 (2023.01)*

(21)(22) Application: **2020139435, 01.12.2020**

(24) Effective date for property rights:  
**01.12.2020**

Registration date:  
**17.03.2023**

Priority:

(22) Date of filing: **01.12.2020**

(43) Application published: **02.06.2022 Bull. № 16**

(45) Date of publication: **17.03.2023 Bull. № 8**

Mail address:

**190900, g. Sankt-Peterburg, BOX 1125, Nilova  
Mariya Innokentevna**

(72) Inventor(s):

**Sukhorukov Gleb Borisovich (RU),  
Pyataev Nikolaj Anatolevich (RU),  
Tishin Aleksandr Mettalinovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu  
"MAGNITNAYA DOSTAVKA  
PREPARATOV" (RU)**

(54) **METHOD FOR TREATMENT OF MALIGNANT NEOPLASMS USING MAGNETIC HYPERTHERMIA AND COMPOSITION FOR APPLICATION IN THIS METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; oncology.

SUBSTANCE: invention can be used in the treatment of a malignant neoplasm using magnetic hyperthermia. The method according to the invention includes the stages of delivery to the tumour area of polymer microcapsules based on sodium dextran sulphate and polyarginine hydrochloride at an effective concentration, containing magnetic nanoparticles based on iron oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, exposure of the tumour area to an alternating electromagnetic field (AMF) with an amplitude of 50 to 300 E and a frequency of 50 to 400 kHz, where the time of exposure to the specified magnetic field at a temperature of 38 to 51°C is from 10 to 70 min, and selective damage or destruction of tumour cells in the tumour area without damage or with minimal damage to healthy surrounding tissue. The use

according to the invention relates to a composition containing polymeric microcapsules based on sodium dextran sulphate and polyarginine hydrochloride in an effective concentration containing magnetic nanoparticles based on iron oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and a pharmaceutically acceptable excipient.

EFFECT: inventions make it possible to increase the effectiveness of treatment due to the localization of polymer microcapsules loaded with magnetic nanoparticles in the tumour area and their controlled uniform heating under the action of an alternating electromagnetic field, as well as to reduce undesirable side effects due to the possibility of using nanoparticles at lower doses.

33 cl, 6 dwg, 3 ex

**RU 2 792 161 C 2**

**RU 2 792 161 C 2**

Настоящее изобретение относится к области биофизики и медицины, в частности, к способу лечения злокачественных новообразований с помощью магнитной гипертермии и полимерным микрокапсулам, подходящим для применения в указанном способе, содержащим магнитные наночастицы из группы магнитных оксидов металлов, преимущественно, на основе ферритов, характеризующихся повышенной цитотоксичностью, низкой токсичностью вследствие возможности применения магнитных наночастиц в более низких дозах и точечным воздействием на орган-мишень. Способ обеспечивает селективный нагрев области опухоли под действием переменного электромагнитного поля и последующее повреждение или разрушение опухолевых клеток или злокачественных новообразований без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани. Кроме того, изобретение относится к композиции, содержащей полимерные микрокапсулы, загруженные магнитными наночастицами, для лечения злокачественных новообразований с помощью указанного способа.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Магнитная гипертермия (МГ) представляет собой перспективный подход для лечения рака, включающий экспозицию организма, его локальной области или ткани воздействию повышенных температур. Указанное воздействие осуществляется с помощью электромагнитного поля и приводит к повреждению, частичному или полному уничтожению опухолевых клеток, без повреждения окружающих здоровых тканей. Различные варианты гипертермического нагрева, среди прочего, включают способы с использованием температур между 41 и 45°C и способы термоабляции с повышением температуры выше 45°C для локальной индукции некроза ткани [1].

Согласно существующей на сегодняшний день классификации МГ, выделяют локальную гипертермию, регионарную гипертермию и гипертермию всего организма. Гипертермия всего организма может быть индуцирована эндогенными или экзогенными источниками тепла, обеспечивающими нагрев до температур, составляющих примерно 39-43°C, и, как правило, применяется для лечения карцином с отдаленными метастазами [1-3]. Регионарная гипертермия воздействует на область тела человека или целый орган, обеспечивая повреждение раковых клеток, облегчающее их уничтожение с помощью облучения и химиотерапевтических препаратов [3]. Способы локальной гипертермии включают введение ферромагнитных или металлических частиц в область опухоли с последующим воздействием магнитного или электромагнитного поля (высокой частоты (ВЧ), ультравысокой частоты (УВЧ), сверхвысокой частоты (СВЧ), постоянного магнитного поля и т.д.). В некоторых случаях, указанные частицы могут быть объединены или связаны с другим противоопухолевым средством или лигандом, специфичным к раковой клетке.

Основные проблемы, связанные с доступными на сегодняшний день способами индукции гипертермии, включают необходимость локализации лечебного воздействия в области-мишени, а также максимального повышения нагрева в пределах патологически измененной ткани без повреждения здоровой ткани и снижения токсичности препаратов для гипертермии.

На сегодняшний день способы магнитной гипертермии с применением магнитных наночастиц (МНЧ) рассматриваются в качестве наиболее многообещающих и привлекают все возрастающее внимание специалистов. При воздействии переменного электромагнитного поля (ПеМП) магнитные наночастицы могут проявлять выраженные термические эффекты, связанные с потерями в ходе перемещения частиц [4]. Помимо обеспечения возможности сильно локализованного теплообразования

применение МНЧ дает возможность самоограничения повышения температуры путем использования магнитного материала с подходящей температурой Кюри [4]. Одной из основных проблем, связанных с применением магнитных наночастиц в способах МГ, является необходимость максимально возможного высвобождения тепла при

5 наименьшей дозе частиц (из-за их потенциальной токсичности для живых организмов).

Основные недостатки способов гипертермии на основе наночастиц включают возможный перегрев (должна быть рассчитана точная продолжительность воздействия), токсичность лекарственных форм, сложность селективной доставки к области применения, неравномерное распределение МНЧ в области опухоли, высокую стоимость

10 изготовления. В связи с этим, последние разработки в области магнитной гипертермии на основе МНЧ направлены на обеспечение быстрого и равномерного нагрева злокачественных опухолей со снижением риска термального повреждения здоровой ткани и повышением селективности лечения гипертермией, а также на создание новых типов магнитных частиц и наночастиц, обеспечивающих повышенную биосовместимость,

15 эффективность лечения и уменьшение частоты серьезных побочных эффектов вследствие снижения дозы указанных частиц.

Одним из многообещающих подходов для решения указанных проблем является применение различных дистанционно-управляемых структур для МГ, таких как полиэлектролитные (полимерные) капсулы или липосомы. Преимущество капсул

20 заключается в их многофункциональности и возможности загрузки самыми разными веществами [5]. Капсулы могут быть синтезированы с помощью технологии мультислоев ("layer by layer"), при этом формируется оболочка из биосовместимых полимеров на неорганическом или органическом ядре [6]. МНЧ могут быть включены как в ядро, так и в оболочку [7-9]. В качестве примера можно привести капсулы, синтезированные

25 из BSA-TA или DS-PA. Эти капсулы практически нетоксичны, гемосовместимы и не влияют на свертываемость крови [10, 11]. Их можно локализовать в требуемой анатомической зоне с помощью градиента магнитного поля, при этом, как было показано, эффективность накопления выше при внутриартериальном введении по сравнению с внутривенной доставкой [12].

Другим важным преимуществом подобных капсул является способность к

30 контролируемому высвобождению лекарственных препаратов под действием ПеМП. С этой целью синтезируются капсулы, содержащие необходимое лекарство в ядре и МНЧ в оболочке. Нагрев МНЧ под действием ПеМП формирует так называемые "горячие зоны" в оболочке капсулы, что приводит к увеличению ее проницаемости и

35 высвобождению содержимого [13]. Таким образом, осуществляется локализация капсул в требуемой области и контролируемое высвобождение загруженных лекарств [14].

Капсулы с МНЧ могут использоваться не только как лечебно-диагностические агенты, но и как простые генераторы тепла. Указанная особенность была показана в работе [15]. В этом случае преимущества микрокапсул по сравнению с наночастицами

40 могут заключаться в высокой степени поглощения клетками.

Из уровня техники известны различные конструкции капсул/микрокапсул, загруженных наночастицами, а также способы их получения и применения.

В патенте РФ RU 2721562 [16] описан способ загрузки неорганических наночастиц или органических молекул в пористые частицы микронного или субмикронного размера, где указанные частицы содержат  $\text{CaCO}_3$ , а неорганические частицы в одном из аспектов

45 состоят из магнетита. Также описан способ получения полимерных капсул микронного или субмикронного размера на основе загруженных пористых частиц, содержащих полимерную оболочку, которая состоит из полимеров, выбранных из бычьего

сывороточного альбумина и дубильной кислоты, поли-L-аргинина и декстрансульфата, полиаллиламина гидрохлорида и полистиролсульфоната натрия. Кроме того, изобретение относится к полимерной капсуле, содержащей неорганические наночастицы и/или органические молекулы, полученной способом по изобретению. Однако, 5  
указанный документ не раскрывает возможность применения предложенных полимерных капсул, загруженных частицами, в способах лечения злокачественных новообразований с помощью магнитной гипертермии.

В патенте США US 7842281 [17] описана композиция на основе магнитных наночастиц, предназначенная для применения в способах лечения с помощью магнитной 10  
гипертермии. Композиция содержит магнитные наночастицы, температура Кюри которых составляет от 40 до 46°C, а эффективный средний диаметр наночастиц составляет от 10 до 400 нм. Композиция может дополнительно содержать полимерный материал и необязательно лекарственное средство или радиосенсибилизирующий агент. Например, наночастицы могут быть покрыты или диспергированы в биосовместимом 15  
полимерном материале. Указанная композиция уменьшает или устраняет проблему неравномерного нагрева и обладает способностью к саморегуляции максимальной достигаемой температуры, что делает способ магнитной гипертермии более перспективной терапевтической возможностью. Изобретение также раскрывает способ гипертермического лечения пациента, нуждающегося в указанном лечении, включающий 20  
стадию введения пациенту композиции, содержащей МНЧ, температура Кюри которых составляет от 40 до 46°C; и стадию воздействия переменным электромагнитным полем, эффективным для индукции гистерезисного нагрева наночастиц. Однако размер указанных магнитных наночастиц существенно варьирует (эффективный средний диаметр частиц составляет 10-400 нм). Поскольку для частиц различного размера 25  
характерны разные механизмы нагрева, это, в свою очередь, может приводить к определенным трудностям в контроле температуры, затрудняя, таким образом, равномерный нагрев злокачественных опухолей. Более того, указанный подход не учитывает характеристики опухоли, подлежащей лечению, такие как ее расположение, плотность и гидродинамические свойства.

В публикации Cristofolini et al., 2016 [15] описаны магнитные нанокапсулы для применения в гипертермической терапии на основе магнетита и полиэлектrolитного 30  
покрытия. Магнитные нанокапсулы получали с помощью послойного нанесения полиэлектrolитов и магнитных наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> на жидкое ядро (технология мультислоев). В качестве полиэлектrolитов использовали поли-L-лизин и 35  
полиглутаминовую кислоту. Для индукции гипертермических эффектов применяли радиочастотное (RF) магнитное поле с максимальной величиной H до 0,025 Т и частотой до 430 кГц. Воздействие магнитного поля приводило к изменению морфологии капсул, что может указывать на их разрушение, тем самым открывая перспективы для потенциального применения в качестве наноносителей для лекарственных препаратов. 40  
Однако, магнитные нанокапсулы, описанные в указанном документе характеризуются малыми размерами (100-200 нм) и, соответственно, низкими весовыми концентрациями железа, что ставит под вопрос их эффективность при применении in vivo. Кроме того, документ не раскрывает возможность получения капсул с полиэлектrolитным покрытием на основе сульфата декстрана и поли-L-аргинина.

В публикации Podgórna et al., 2016 [9] описаны нанокапсулы, содержащие наночастицы 45  
оксида железа, инкапсулированные в полиэлектrolитную оболочку на основе поли-L-лизина и полиглутаминовой кислоты. Магнитные нанокапсулы получали с помощью послойного нанесения полиэлектrolитов и магнитных наночастиц (технология

мультислоев). Средний размер синтезированных нанокапсул составлял около 100 нм. Однако, указанный документ не раскрывает возможность применения предложенных нанокапсул, загруженных частицами, в способах лечения злокачественных новообразований с помощью магнитной гипертермии. При этом, нанокапсулы характеризуются малыми размерами (около 100 нм), и, соответственно, низкими весовыми концентрациями железа, вследствие чего их цитотоксичность при применении *in vivo* может быть недостаточно высокой. Кроме того, документ не раскрывает возможность получения капсул с полиэлектролитным покрытием на основе сульфата декстрана и поли-L-аргинина.

В публикации **Navolokin et al., 2018** [18] описаны многослойные капсулы, полученные на основе биоразлагаемого полимера и наночастиц оксида железа (магнетита,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Магнитные микрокапсулы изготавливали с помощью послойного нанесения полиэлектролитов и магнитных наночастиц (технология мультислоев). Для получения микрокапсул использовали микрочастицы  $\text{CaCO}_3$ , для получения полиэлектролитного покрытия - натриевую соль сульфата декстрана (Dex) и поли-L-аргинин (Parg). Состав композиции микрокапсул характеризуется следующим образом: Parg/Dex/(Parg/MNPs)<sub>3</sub>/Parg/Dex. Проведенный в работе анализ биораспределения и деградации капсул и магнитных наночастиц позволяет рассматривать предложенные конструкции в качестве эффективного и безопасного инструмента для адресной доставки лекарств. При этом отсутствуют данные, демонстрирующие изменение характеристик и биологические эффекты микрокапсул под действием ПемП, не раскрыто их применение для магнитной гипертермии.

В публикации **Minaeva et al., 2017** [11] описаны микрокапсулы, содержащие в качестве ядра микрочастицы  $\text{CaCO}_3$ , магнитные наночастицы ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и полиэлектролитное покрытие на основе полиаргинина (PA) и сульфата декстрана (DS). Композиция микрокапсул имеет следующий состав: PA/DS/PA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ +DS/PA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ +DS/PA/DS. В исследовании цитотоксичности на культуре клеток L929 и лейкоцитах человека показано, что микрокапсулы характеризуются меньшей цитотоксичностью, чем непосредственно наночастицы. Однако, возможность применения предложенных микрокапсул, загруженных наночастицами, в способах лечения злокачественных новообразований с помощью магнитной гипертермии в указанном документе не раскрыта. Кроме того, не исследована цитотоксичность микрокапсул под действием переменного электромагнитного поля.

Несмотря на то, что полимерные микрокапсулы, загруженные магнитными наночастицами, в целом, известны из уровня техники, не исследовано изменение характеристик и биологические эффекты полимерных микрокапсул, в частности, цитотоксичность, под действием переменного электромагнитного поля *in vitro* и *in vivo*; не определены физические параметры, которые могут обеспечить эффективное повреждение или разрушение опухолевых клеток, при введении микрокапсул в организм.

Таким образом, существует необходимость в разработке улучшенных способов магнитного гипертермического лечения с устранением одного или более недостатков согласно предшествующему уровню техники. По мнению авторов настоящего изобретения, способы магнитной гипертермии, основанные на применении полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, являются перспективным высокоэффективным подходом для терапии ряда онкологических заболеваний, поскольку способны обеспечить повышенную цитотоксичность магнитотерапевтических препаратов, улучшенный профиль безопасности вследствие наличия полимерной

оболочки, нивелирующей токсические эффекты ферромагнитных наночастиц, и точечное воздействие на орган-мишень. Авторы настоящего изобретения также полагают, что будущий успех в области разработки способов МГ и их применения для лечения рака зависит от возможности создавать индивидуальные протоколы для каждого типа рака, подлежащего лечению с помощью гипертермии у субъектов, вместо разработки общего универсального способа.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является разработка улучшенного способа гипертермического лечения различных заболеваний и расстройств, в частности, злокачественных новообразований, с помощью полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, обеспечивающий локализацию МНЧ в области опухоли и их контролируемый равномерный нагрев под действием переменного электромагнитного поля в зависимости от желаемых предварительно определенных для каждого типа опухоли значений, а также повышенную эффективность гипертермии при снижении нежелательных побочных явлений вследствие возможности применения МНЧ в более низких дозах.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что способ магнитного гипертермического лечения злокачественных новообразований, включающий стадии доставки в область опухоли полимерных микрокапсул, содержащих магнитные наночастицы из группы магнитных оксидов металлов, и воздействия на область опухоли переменным электромагнитным полем с предварительно определенными параметрами, обеспечивает сопутствующее и/или последующее селективное повреждение или разрушение опухолевых клеток в области опухоли без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани.

Согласно одному аспекту изобретения предложен способ лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии, включающий стадии (i) доставки в область опухоли полимерных микрокапсул в эффективной концентрации, содержащих магнитные наночастицы, выбранные из группы магнитных оксидов металлов, (ii) воздействия на область опухоли переменным электромагнитным полем (ПемП) с амплитудой от 50 до 300 Э и частотой от 50 до 400 кГц, где время воздействия указанного магнитного поля при температуре от 38 до 51°C составляет от 10 до 70 мин, и (iii) селективного повреждения или разрушения опухолевых клеток в области опухоли без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани.

Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы содержат коровую частицу и полимерное покрытие. В предпочтительном варианте реализации указанные полимерные микрокапсулы содержат коровую частицу на основе  $\text{CaCO}_3$  и полимерное покрытие, состоящее из полиэлектролита или биоразлагаемого полимера. В наиболее предпочтительном варианте реализации указанное полимерное покрытие получено из натриевой соли сульфата декстрана (DexS) и поли-L-аргинина (PArg).

Согласно одному варианту реализации изобретения магнитные наночастицы, входящие в состав полимерных микрокапсул, представляют собой наночастицы на основе магнитных оксидов металлов. В предпочтительном варианте реализации указанные магнитные наночастицы представляют собой магнитные наночастицы на основе оксида железа  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  или Zn-замещенные магнитные наночастицы на основе феррита марганца формулы  $\text{Zn}_x\text{Mn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$ , где  $x = 0-0,3$ .

Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы

выбраны на основе предварительно определенной зависимости эффективности магнитной гипертермии для определенного типа опухоли по меньшей мере от одного параметра, выбранного из состава коровой частицы и полимерного покрытия, среднего размера микрокапсул, среднего значения коэрцитивной силы, концентрации/количества входящих в состав магнитных наночастиц для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90 %, предпочтительно, 95 % опухолевых клеток.

Согласно одному варианту реализации изобретения магнитные наночастицы, входящие в состав полимерных микрокапсул, выбраны на основе предварительно определенной зависимости эффективности магнитной гипертермии для определенного типа опухоли по меньшей мере от одного параметра, выбранного из химического состава, среднего размера частиц, температуры Кюри, среднего значения коэрцитивной силы для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90 %, предпочтительно 95 % опухолевых клеток.

Согласно одному варианту реализации изобретения параметры переменного электромагнитного поля, включая амплитуду и частоту, выбраны на основе предварительно определенной зависимости эффективности магнитной гипертермии от типа опухоли и доставляемой концентрации и/или типа полимерных микрокапсул и/или наночастиц для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90 %, предпочтительно 95 % опухолевых клеток.

Согласно дополнительному варианту реализации изобретения способ обеспечивает механическое разрушение под действием переменного электромагнитного поля и последующее повреждение или гибель опухолевых клеток или злокачественных новообразований без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани.

Согласно другому аспекту изобретения предложена композиция для применения в способе лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии, содержащая полимерные микрокапсулы в эффективной концентрации, содержащие магнитные наночастицы, выбранные из группы магнитных оксидов металлов, и подходящее вспомогательное вещество.

Указанные и другие варианты реализации изобретения подробно описаны ниже.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Прилагаемые графические материалы иллюстрируют варианты реализации описанного в настоящей заявке изобретения и вместе с описанием изобретения раскрывают некоторые из неограничивающих примеров изобретения.

На Фигуре 1 показаны результаты исследования морфологии и размеров наночастиц  $Fe_3O_4$  в СА с помощью ТЕМ- и SEM-изображения полимерных микрокапсул, содержащих указанные наночастицы. (а) ТЕМ-изображение и распределение частиц  $Fe_3O_4$  по размерам. (b, c) SEM-изображение полимерных микрокапсул, содержащих наночастицы  $Fe_3O_4$ .

На Фигуре 2 показаны кривые намагничивания наночастиц  $Fe_3O_4$  и полимерных микрокапсул.

На Фигуре 3 показана графическая схема общей схемы эксперимента.

На Фигуре 4 показаны результаты оценки поглощения наночастиц и капсул клетками. Было проведено 2 серии экспериментов - с дозой 10 капсул и 5 капсул на клетку. Показано взаимодействие фибробластов L929 с микрокапсулами: а - распределение клеток по количеству поглощенных капсул; b, c - изображение клетки, поглощающей капсулы, полученное с помощью световой микроскопии; e - количество поглощенного

железа в случаях МНЧ и капсул.

На Фигуре 5 показаны результаты оценки жизнеспособности фибробластов L929 после 24 часов инкубации с микрокапсулами и наночастицами  $Fe_3O_4$  и воздействия ПеМП. Эксперименты включали несколько контрольных серий. В дополнение к полностью отрицательному контролю (интактные клетки без какой-либо обработки) клетки инкубировали с капсулами и наночастицами без воздействия магнитного поля, а также прикладывали магнитное поле к клеткам, не контактирующим с МНЧ и капсулами. На вставке показана температура инкубационной среды во время эксперимента.

На Фигуре 6 показана морфология клеток L929 после 24 часов инкубации с микрокапсулами и наночастицами  $Fe_3O_4$  до и после воздействия ПеМП, окрашенных по Перльсу (увеличение 400х). В контрольной серии, включавшей воздействие переменного электромагнитного поля на клетки без магнитных наночастиц и капсул, морфологических изменений не обнаружено.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В целом, настоящее изобретение описывает способ лечения злокачественных новообразований или тканей-мишеней с помощью локальной гипертермии с использованием полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами из группы магнитных оксидов металлов, обеспечивающих селективное воздействие на область опухоли и повышенную эффективность гипертермии при снижении нежелательных побочных явлений вследствие возможности применения магнитных наночастиц в более низких дозах.

### 1. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

На всем протяжении настоящей заявки и формулы изобретения термины “включает” и “содержит” и их вариации, такие как “содержащий”, “включающий”, “имеет” и “имеющий”, следует интерпретировать как инклюзивные. Употребление объектов в единственном числе в контексте описанного изобретения относится как к единственному, так и множественному числу указанных объектов, если иное не указано в настоящей заявке или явно не следует из контекста.

Следует понимать, что каждый диапазон, описанный в настоящей заявке, представляет собой ряд чисел, принадлежащих указанному диапазону. Таким образом, каждый диапазон включает все и каждое значение, принадлежащее указанному диапазону, а также любой из его поддиапазонов. Если не указано иное, предполагается, что пограничные точки диапазона являются частью указанного диапазона.

При использовании в настоящей заявке термин “магнитная гипертермия” (аббревиатура “МГ”) обозначает способ медицинского лечения, включающий воздействие на организм, его локальную область или ткань повышенной температурой, которое осуществляется с помощью электромагнитного поля и обеспечивает повреждение, частичное или полное уничтожение опухолевых клеток, без повреждения или с минимальным повреждением окружающих здоровых тканей.

Термин “полимерные микрокапсулы” при использовании в настоящей заявке относится к микрокапсулам, которые можно доставлять в требуемую область организма с помощью электромагнитного поля. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы загружены магнитными наночастицами, а также содержат коровую частицу и полимерное покрытие. В наиболее предпочтительном варианте реализации полимерные микрокапсулы содержат коровую частицу на основе  $CaCO_3$  и полимерное покрытие, состоящее из полиэлектролита или биоразлагаемого

полимера. В еще одном наиболее предпочтительном варианте реализации указанное полимерное покрытие получено из натриевой соли сульфата декстрана (DexS) и поли-L-аргинина (PArg).

5 Термин “магнитные наночастицы” (аббревиатура “МНЧ”) при использовании в настоящей заявке относится к классу наночастиц, которыми можно управлять с помощью градиентов магнитного поля. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения указанный термин относится к магнитным наночастицам на основе оксида железа  $Fe_3O_4$  или Zn-замещенным магнитным наночастицам на основе феррита марганца. Указанные частицы обеспечивают нагрев области опухоли до 10 желаемой температуры, составляющей от примерно 40 до примерно 46°C, при использовании их низкой концентрации и без перегрева областей с высокой концентрацией частиц при минимальных значениях частоты и амплитуды прилагаемого поля.

15 При использовании в настоящей заявке термины “переменное электромагнитное поле” или “магнитное поле переменного тока” (аббревиатура “ПеМП”) означают магнитное поле, вызванное переменным током.

В целом, термин “эффективность нагрева” означает отношение тепла, образующего в ходе процесса, к общей затраченной энергии или поглощенному теплу. При 20 использовании в настоящей заявке указанный термин определяет способность магнитных наночастиц нагреваться до оптимальной температуры в описанном способе магнитной гипертермии. Указанная оптимальная температура обеспечивает быстрый и равномерный нагрев злокачественных новообразований, снижая риск термального повреждения здоровой ткани.

25 Термин “температура Кюри” (обозначается как “ $T_c$ ”) означает температуру, при которой конкретные материалы утрачивают постоянные магнитные свойства с приобретением индуцированного магнетизма. Размер частиц в кристаллической решетке материала изменяет температуру Кюри. Благодаря малому размеру частиц колебания спина электрона становятся более значительными, что приводит, таким образом, к 30 снижению  $T_c$  при снижении размера частиц, поскольку колебания вызывают разупорядоченность [19].

Термины “коэрцитивная сила” или “коэрцитивность”, используемые в отношении ферромагнитного материала, означают интенсивность прилагаемого магнитного поля, 35 необходимую для снижения намагниченности указанного материала до нуля после доведения намагниченности образца до насыщения. Другими словами, указанный параметр измеряет устойчивость ферромагнитного материала к размагничиванию.

40 При использовании в настоящей заявке термины “композиция” или “терапевтическая (фармацевтическая) композиция” являются взаимозаменяемыми и относятся к составу или смеси активных ингредиентов, при необходимости, в комбинации с подходящими вспомогательными веществами, которые предназначены для терапии или профилактики какого-либо заболевания или состояния у пациента, нуждающегося в этом. Конкретные композиции, которые можно применять в способе согласно настоящему изобретению, описаны в настоящей заявке.

45 При использовании в настоящей заявке термины “злокачественное новообразование”, “злокачественная неоплазма”, “раковая клетка”, “опухолевая клетка” или “опухоль” относятся к любому неопластическому росту у пациента, включая любые метастазы. Конкретные типы рака, которые можно лечить с использованием способов согласно настоящему изобретению, описаны в настоящей заявке.

При использовании в настоящей заявке термины “селективно” и “селективность” (например, “селективность лечения”) означают влияние с высоко специфичной активностью, обеспечивающее строго локализованный эффект. Термин “коэффициент повреждения клеток” означает процент раковых клеток, претерпевающих видимые морфологические изменения через 24 часа после воздействия ПемП в присутствии полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами.

При использовании в настоящей заявке термин “введение” означает введение полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, в соответствии с изобретением или содержащей их композиции субъекту, нуждающемуся в указанном введении. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения указанный термин относится к внутривенному или внутриопухолевому введению.

Термины “субъект” и “пациент” используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к животному, такому как млекопитающее, более предпочтительно к человеку.

При использовании в настоящей заявке термины “лечить” и “лечение” относятся к подавлению или снижению развития патологического состояния, расстройства или заболевания, или его клинических симптомов с помощью конкретной терапии.

Термин “биологически активная молекула” используется для определения молекулы вещества, которую вводят субъекту, способной вызывать конкретный клеточный ответ. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения биологически активная молекула выбрана из противоракового агента, распознающего опухолевые клетки антигена или аптамера.

## II. ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно одному аспекту изобретения предложен способ лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии, включающий следующие стадии:

(i) доставка в область опухоли полимерных микрокапсул в эффективной концентрации, содержащих магнитные наночастицы, выбранные из группы магнитных оксидов металлов,

(ii) воздействие на область опухоли переменным электромагнитным полем (ПемП), и

(iii) селективное повреждение или разрушение опухолевых клеток в области опухоли без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани.

Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы содержат коровую частицу и полимерное покрытие. Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы содержат коровую частицу, полученную из любого подходящего органического вещества, например, коровую частицу на основе  $\text{CaCO}_3$  или коровую частицу на основе полимолочной кислоты. В предпочтительном варианте реализации указанные полимерные микрокапсулы содержат коровую частицу на основе  $\text{CaCO}_3$ .

Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы содержат полимерное покрытие (полимерную оболочку), состоящее из полиэлектролита или биоразлагаемого полимера. Указанное полимерное покрытие состоит из любых подходящих полимеров, включая, но не ограничиваясь: полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропилен, поливинилдифторид (ПВДФ), поливинилпирролидон (ПВП), полиакриловую кислоту, бычий сывороточный альбумин, поли-L-аргинин, декстран, декстрансульфат, полиаллиламина гидрохлорид, полистиролсульфонат натрия, поли-L-лизин, полиглутаминовую кислоту, или их комбинации. В предпочтительном варианте

реализации изобретения указанные полимерные микрокапсулы содержат полимерное покрытие, полученное из натриевой соли сульфата декстрана (DexS) и поли-L-аргинина (PArg). В наиболее предпочтительном варианте реализации изобретения указанные полимерные микрокапсулы содержат коровую частицу на основе  $\text{CaCO}_3$  и полимерное

5 покрытие, полученное из натриевой соли сульфата декстрана (DexS) и поли-L-аргинина (PArg).

Согласно одному варианту реализации изобретения предпочтительный средний размер полимерных микрокапсул составляет от 0,2 до 10 мкм. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения средний размер полимерных микрокапсул находится

10 в диапазоне от 0,2 до 1 мкм, от 0,5 до 4 мкм, от 2 до 5 мкм, от 3 до 6 мкм, от 4 до 7 мкм, от 5 до 8 мкм, от 6 до 9 мкм, или от 7 до 10 мкм. В предпочтительном варианте реализации изобретения средний размер полимерных микрокапсул составляет от 3 до 6 мкм.

Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы характеризуются средним значением коэрцитивной силы, составляющим от 3 до 250 Э. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения среднее значение коэрцитивной силы составляет от 3 до 40 Э, от 10 до 45 Э, от 15 до 35 Э, от 20 до 50 Э, от 25 до 55 Э, от 30 до 90 Э, от 45 до 120 Э, от 60 до 110 Э, от 80 до 190 Э, или от 95 до 250 Э. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения значение

15 коэрцитивной силы для указанных полимерных микрокапсул составляет от 3 до 30 Э.

Согласно одному варианту реализации изобретения магнитные наночастицы, входящие в состав полимерных микрокапсул, представляют собой наночастицы на основе магнитных оксидов металлов. В предпочтительном варианте реализации изобретения указанные магнитные наночастицы представляют собой магнитные

20 наночастицы на основе оксида железа  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Согласно другому предпочтительному варианту реализации изобретения указанные магнитные наночастицы представляют собой Zn-замещенные магнитные наночастицы на основе феррита марганца формулы  $\text{Zn}_x\text{Mn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$ , где  $x = 0-0,3$ , наиболее предпочтительно формулы  $\text{Zn}_{0,2}\text{Mn}_{0,8}\text{Fe}_2\text{O}_4$ .

Согласно дополнительным вариантам реализации изобретения магнитные наночастицы, входящие в состав полимерных микрокапсул, представляют собой любые подходящие магнитные наночастицы, например, содержащие Mg, Mn, Zn, Co, включая, но не ограничиваясь, следующие наночастицы:  $\text{Mg}_{0,285}\text{Mn}_{0,715}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Zn}_{0,4}\text{Mn}_{0,6}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Co}_{0,7}\text{Fe}_{2,3}\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Zn}_{0,47}\text{Mn}_{0,53}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Zn}_{0,5}\text{Mn}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Zn}_{0,3}\text{Fe}_{2,7}\text{O}_4$ ,  $\text{Zn}_{0,468}\text{Fe}_{2,532}\text{O}_4$ ,

30  $\text{Mg}_{0,13}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Zn}_{0,9}\text{Fe}_{0,1}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Mn}_{0,2}\text{Fe}_{1,8}\text{O}_3$ ,  $\text{Mg}_{0,5}\text{Fe}_{2,5}\text{O}_4$ .

Согласно одному варианту реализации изобретения предпочтительный средний размер магнитных наночастиц равен или составляет менее 50 нм. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения средний размер наночастиц находится в диапазоне

40 от 1 до 20 нм, от 2 до 30 нм, от 4 до 35 нм, от 10 до 40 нм, или от 15 до 50 нм. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения средний размер наночастиц составляет от 5 до 30 нм.

Согласно одному варианту реализации изобретения температура Кюри магнитных наночастиц может составлять от  $39^\circ\text{C}$  до  $550^\circ\text{C}$ . Согласно некоторым вариантам реализации изобретения температура Кюри наночастиц составляет от  $40^\circ\text{C}$  до  $100^\circ\text{C}$ , от  $45^\circ\text{C}$  до  $150^\circ\text{C}$ , от  $50^\circ\text{C}$  до  $200^\circ\text{C}$ , от  $60^\circ\text{C}$  до  $250^\circ\text{C}$ , от  $65^\circ\text{C}$  до  $300^\circ\text{C}$ , от  $70^\circ\text{C}$  до  $350^\circ\text{C}$ , от  $80^\circ\text{C}$  до  $400^\circ\text{C}$ , от  $85^\circ\text{C}$  до  $450^\circ\text{C}$ , или от  $90^\circ\text{C}$  до  $550^\circ\text{C}$ . Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения температура Кюри наночастиц составляет от  $42^\circ\text{C}$  до  $45^\circ\text{C}$ .

Согласно одному варианту реализации изобретения магнитные наночастицы

характеризуются средним значением коэрцитивной силы, составляющим от 1 до 250 Э. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения среднее значение коэрцитивной силы составляет от 1 до 30 Э, от 5 до 35 Э, от 15 до 40 Э, от 20 до 50 Э, от 25 до 55 Э, от 30 до 90 Э, от 45 до 120 Э, от 60 до 140 Э, от 80 до 190 Э, или от 95 до 250 Э. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения значение коэрцитивной силы для указанных магнитных наночастиц составляет от 1 до 30 Э.

Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы содержат от 100 до 1000 магнитных наночастиц. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения полимерные микрокапсулы содержат от 100 до 300 МНЧ, от 200 до 400 МНЧ, от 300 до 500 МНЧ, от 400 до 600 МНЧ, от 500 до 700 МНЧ, от 600 до 800 МНЧ, от 700 до 900 МНЧ, или от 800 до 1000 МНЧ.

Согласно одному варианту реализации изобретения удельный вес магнитных наночастиц по отношению к полимеру в составе полимерной оболочки составляет от 0,1 до 50 % по весу. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения удельный вес магнитных наночастиц по отношению к полимеру в составе полимерной оболочки составляет от 0,1 до 1 %, от 0,5 до 5 %, от 3 до 10 %, от 5 до 15 %, от 10 до 25 %, от 20 до 35 %, от 30 до 40 %, от 35 до 45 %, или от 40 до 50 %.

Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы содержат магнитные наночастицы на основе оксида железа  $Fe_3O_4$ , коровую частицу на основе  $CaCO_3$  и полимерное покрытие, полученное из натриевой соли сульфата декстрана (DexS) и поли-L-аргинина (PArg), и имеют следующий состав: PArg/DexS/(PArg/ $Fe_3O_4$ )<sub>4</sub>/(PArg/DexS)<sub>2</sub>.

Полимерные микрокапсулы, используемые в способе согласно настоящему изобретению, могут быть получены с помощью методов, известных специалисту в данной области техники. В частности, микрокапсулы могут быть синтезированы с помощью технологии мультислоев, включающей послойное нанесение полиэлектролитов и/или магнитных частиц на коровую частицу или ядро ("layer-by-layer" technology, LBL). При этом формируется оболочка из биосовместимых полимеров на неорганическом или органическом ядре, а МНЧ могут быть включены как в ядро, так и в оболочку.

Магнитные наночастицы, используемые в способе согласно настоящему изобретению, также можно легко синтезировать с помощью методов, известных специалисту в данной области техники. Способы, подходящие для получения МНЧ, включают ко-преципитацию, гидротермальный синтез, термальную декомпозицию, микроэмульсионные методы, синтез методом золь-гель, синтез пламенным распылением. Например, магнитные наночастицы для применения в описанном способе можно синтезировать с помощью способа ко-преципитации в атмосфере Ar.

Согласно одному варианту реализации изобретения предложенный способ обеспечивает селективный нагрев области опухоли под действием переменного электромагнитного поля до терапевтических температур. Согласно другому дополнительному варианту реализации предложенный способ обеспечивает механическое воздействие, конкретнее, механическое разрушение тканей или клеток-мишеней под действием переменного электромагнитного поля. Согласно еще одному дополнительному варианту реализации изобретения предложенный способ обеспечивает как нагрев области опухоли до терапевтических температур, так и механическое разрушение тканей или клеток-мишеней под действием переменного электромагнитного поля.

Согласно одному варианту реализации изобретения магнитное поле представляет собой переменное электромагнитное поле, созданное внешним источником и имеющее

амплитуду от 50 до 300 Э и частоту от 50 до 400 кГц. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения амплитуда переменного электромагнитного поля составляет от 50 до 90 Э, от 60 до 150 Э, от 70 до 200 Э, от 80 до 230 Э, от 90 до 250 Э, от 100 до 270 Э, от 120 до 290 Э, или от 150 до 300 Э. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения частота переменного электромагнитного поля составляет от 50 до 90 кГц, от 60 до 120 кГц, от 70 до 150 кГц, от 90 до 180 кГц, от 110 до 200 кГц, от 150 до 250 кГц, от 200 до 330 кГц, или от 250 до 400 кГц. Авторы обнаружили, что ПеМП с амплитудой 200 Э и частотой 100 кГц, обеспечивает эффективное повреждение клеток.

В Примере 3 описано устройство для создания переменного электромагнитного поля. Магнитным полем воздействуют на предварительно определенную область в течение предварительно определенного промежутка времени, что обеспечивает нагрев магнитных наночастиц в составе полимерных микрокапсул до температуры, достаточной для повреждения или разрушения опухолевых клеток без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани. Согласно другому дополнительному варианту реализации воздействие электромагнитного поля на целевую область в присутствии полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, приводит к механическому разрушению тканей или клеток-мишеней, тем самым обеспечивая повреждение или разрушение опухолевых клеток без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани. Согласно еще одному дополнительному варианту реализации изобретения воздействие электромагнитного поля на целевую область в присутствии полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, приводит как к нагреву магнитных наночастиц в составе полимерных микрокапсул до терапевтических температур, достаточных для повреждения или разрушения опухолевых клеток, так и к механическому разрушению тканей или клеток-мишеней, тем самым обеспечивая повреждение или разрушение опухолевых клеток без повреждения или с минимальным повреждением здоровой окружающей ткани.

Согласно одному варианту реализации изобретения переменное электромагнитное поле создается с помощью внешнего источника поля со значением градиента поля от 3 до 100 Т/м для точного определения движения и расположения полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, в месте опухоли во время лечения, в частности, после стадии доставки указанных полимерных микрокапсул в опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения внешний источник поля, создающий переменное электромагнитное поле, помещают внутри или снаружи тела пациента, нуждающегося в указанном лечении.

Согласно одному варианту реализации изобретения время воздействия переменного электромагнитного поля может варьировать от 10 до 70 мин. Указанное время, как правило, является достаточным для нагрева опухолевой ткани до терапевтических температур и/или температур абляции (предпочтительно, 38-51°C). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения время воздействия указанного переменного электромагнитного поля составляет от 10 до 30 мин, от 15 до 35 мин, от 20 до 40 мин, от 30 до 50 мин, от 40 до 60 мин, или от 50 до 70 мин. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения время воздействия переменного электромагнитного поля составляет от 30 до 45 мин. Указанный временной диапазон является достаточным для эффективного нагрева области опухоли до терапевтических температур, составляющих 42-45°C, при сниженном риске термального повреждения здоровой ткани.

Согласно одному варианту реализации изобретения область опухоли нагревают до

38-51°C под воздействием переменного электромагнитного поля. Температуры, превышающие 45-50°C, обычно применяют для локальной индукции некроза ткани (способы термоабляции), при этом температуры в диапазоне от 41 до 45°C можно использовать для повреждения раковых клеток (что является предпочтительным для малых опухолей), связанного с дефектами мембран, конформационными изменениями, ингибированием синтеза РНК, ДНК и белка, и т.д. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения область опухоли нагревают до температуры от 39 до 45°C, от 40 до 42°C, от 41 до 45°C, от 43 до 47°C или от 45 до 51°C. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения область опухоли нагревают до температуры от 42 до 45°C. Указанный диапазон температур обеспечивает эффективное повреждение раковых клеток с коэффициентом повреждения более 50 %.

Клеточная гибель представляет собой каскадный процесс, который включает ряд стадий, от ранних морфологических изменений до апоптоза, которые имеют разную продолжительность. Согласно одному варианту реализации изобретения стадия селективного повреждения или разрушения опухолевых клеток в области опухоли может варьировать от 1 часа до 96 часов. Продолжительность указанной стадии зависит от конкретных факторов, таких как тип, размер и расположение опухоли, температура нагрева, время воздействия переменного электромагнитного поля. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения стадия селективного повреждения или разрушения опухолевых клеток в области опухоли имеет продолжительность от 2 до 18 часов, от 8 до 24 часов, от 20 до 48 часов, от 35 до 72 часов, от 54 до 96 часов. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения стадия селективного повреждения или разрушения опухолевых клеток в области опухоли с коэффициентом повреждения клеток более 50 % составляет примерно 24 часа.

Согласно одному варианту реализации изобретения стадия (ii) включает один или несколько циклов воздействия переменным электромагнитным полем. При этом, продолжительность и количество циклов воздействия выбраны на основе предварительно определенной зависимости эффективности гипертермии от типа опухоли и/или характеристик полимерных микрокапсул/магнитных наночастиц для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90 %, предпочтительно 95 % опухолевых клеток.

Согласно одному варианту реализации изобретения способ лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии, описанный в настоящей заявке, может включать стадию неинвазивного и/или инвазивного измерения температуры опухоли. Возможные пути измерения температуры опухоли при МГ включают, например, инвазивные и неинвазивные подходы, такие как применение терморпарного зонда, измерение температуры с помощью магнитно-резонансной визуализации или температурной зависимости высших гармоник намагниченности. Согласно одному варианту реализации изобретения на стадии неинвазивного измерения температуры опухоли используется измерение температуры с помощью магнитно-резонансной визуализации или температурной зависимости высших гармоник намагниченности. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения стадия неинвазивного измерения температуры опухоли включает измерение температуры с помощью магнитно-резонансной визуализации. Согласно другому варианту реализации изобретения указанный способ включает стадию инвазивного измерения температуры опухоли, например, с применением терморпарного зонда. Измерение температуры опухоли предпочтительно осуществляют во время стадии воздействия на область опухоли переменным электромагнитным полем (стадия (ii)).

Согласно одному варианту реализации изобретения способ лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии также может включать выбор параметров электромагнитного поля (амплитуда, частота), характеристик полимерных микрокапсул (состав, средний размер, среднее значение коэрцитивной силы, концентрация/количество входящих в состав МНЧ) и магнитных наночастиц (состав, средний размер, температура Кюри, среднее значение коэрцитивной силы), продолжительности и количества циклов воздействия переменным электромагнитным полем и способа инъекции, с учетом локализации и типа опухоли, для обеспечения повышенной эффективности и селективности лечения.

Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы выбраны на основе предварительно определенной зависимости эффективности магнитной гипертермии для определенного типа опухоли по меньшей мере от одного параметра, выбранного из состава коровой частицы и полимерного покрытия, среднего размера микрокапсул, формы, среднего значения коэрцитивной силы, концентрации/количества входящих в состав магнитных наночастиц, восприимчивости к внешнему электромагнитному полю для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90 %, предпочтительно, 95 % опухолевых клеток.

Согласно одному варианту реализации изобретения магнитные наночастицы, входящие в состав полимерных микрокапсул, выбраны на основе предварительно определенной зависимости эффективности магнитной гипертермии для определенного типа опухоли по меньшей мере от одного параметра, выбранного из химического состава, формы, среднего размера частиц, температуры Кюри, тепловыделения под действием электромагнитного поля, среднего значения коэрцитивной силы для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90 %, предпочтительно 95 % опухолевых клеток.

Согласно одному варианту реализации изобретения параметры переменного электромагнитного поля, включая амплитуду и частоту, выбраны на основе предварительно определенной зависимости эффективности магнитной гипертермии от типа опухоли и доставляемой концентрации и/или типа полимерных микрокапсул и/или наночастиц для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90 %, предпочтительно 95 % опухолевых клеток.

Согласно одному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы, загруженные магнитными наночастицами, используемые в описанном способе, можно вводить любым эффективным удобным способом, включая внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутриопухолевое, перитуморальное, пероральное, интраназальное, ингаляционное, ректальное, интравагинальное или местное введение. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения полимерные микрокапсулы, загруженные магнитными наночастицами, вводят внутривенно, внутрь опухоли или перитуморально в конкретные участки тела пациента, нуждающегося в указанном введении. Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации изобретения указанные полимерные микрокапсулы вводят путем инъекции или инфузии. Дозировка, режим и продолжительность лечения зависят от типа опухоли, подвергаемой гипертермии, а также возраста, массы тела и ответа на лечение конкретного пациента и должны определяться специалистом в индивидуальном порядке для каждого клинического случая.

Согласно одному варианту реализации изобретения заболевание или расстройство, подлежащее лечению у субъекта с помощью способа, описанного в настоящей заявке, может включать, но не ограничивается указанными, рак молочной железы, рак легких,

рак глотки, рак гортани, рак пищевода, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак матки, рак шейки матки, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак яичка, рак предстательной железы, рак кости, рак мозга, метастатические поражения серозных полостей. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения указанное заболевание представляет собой рак желудка, рак предстательной железы или рак мозга.

Согласно другому варианту реализации изобретения предложена композиция для применения в способе лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии, содержащая полимерные микрокапсулы в эффективной концентрации, загруженные магнитными наночастицами, выбранными из группы магнитных оксидов металлов, и подходящее вспомогательное вещество. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения указанные полимерные микрокапсулы содержат коровую частицу на основе  $\text{CaCO}_3$  и полимерное покрытие, полученное из натриевой соли сульфата декстрана (DexS) и поли-L-аргинина (PArg). Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения указанные магнитные наночастицы представляют собой наночастицы на основе оксида железа  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  или Zn-замещенные магнитные наночастицы на основе феррита марганца формулы  $\text{Zn}_x\text{Mn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$ , где  $x = 0-0,3$ , предпочтительно, формулы  $\text{Zn}_{0,2}\text{Mn}_{0,8}\text{Fe}_2\text{O}_4$ . Подходящее вспомогательное вещество относится к фармацевтически приемлемому материалу или носителю, такому как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или растворитель, и может включать сахара (лактозу, глюкозу, сахарозу и т.д.), крахмал (кукурузный крахмал или картофельный крахмал), целлюлозу и ее производные, солод, желатин, гликоли (например пропиленгликоль), полиолы (глицерин, сорбит, маннит и т.д.), буферные агенты, изотонический солевой раствор, этиловый спирт и другие нетоксичные биосовместимые вещества.

Композиция для применения в способе лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии может быть представлена в виде раствора для инфузии, раствора для инъекций, порошка или лиофилизата. Специалист в области медицины определяет дозировку, режим и продолжительность лечения в индивидуальном порядке для каждого клинического случая в зависимости от характеристик пациента, подлежащего лечению. Композицию, описанную в настоящей заявке, можно вводить субъекту с помощью различных способов, включая внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутриопухолевое, перитуморальное, пероральное, интраназальное, ингаляционное, ректальное, интравагинальное или местное введение.

Композиция согласно изобретению подходит для лечения с помощью магнитной гипертермии злокачественного новообразования или рака у пациента, нуждающегося в указанном лечении. Указанное злокачественное новообразование или рак может представлять собой рак молочной железы, рак легких, рак глотки, рак гортани, рак пищевода, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак матки, рак шейки матки, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак яичка, рак предстательной железы, рак кости, рак мозга, метастатические поражения серозных полостей. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения указанное заболевание представляет собой рак желудка, рак предстательной железы или рак мозга.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанная композиция для применения в способе лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии может содержать биологически активную молекулу, например,

такую как противоопухолевый агент, антитело, распознающее опухолевые клетки, или аптамер. Примеры биологически активных молекул, подходящих для применения в составе композиции согласно изобретению, включают, но не ограничиваются указанными: в качестве противоопухолевых агентов - такие как карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, метотрексат, паклитаксел, тамоксифен, винкристин; в качестве антител - такие как алемтузумаб, бевацизумаб, цетуксимаб, матузумаб, обинтузумаб, офатумумаб, панитумумаб, пертузумаб, ритуксимаб, трастузумаб; в качестве аптамеров - такие как агонисты толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLRs) или лиганды рецептора GCS. Авторы предполагают, что применение полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, в комбинации с биологически активными веществами в описанном способе может приводить к повышению эффективности и селективности лечения.

Далее следуют неограничивающие примеры, иллюстрирующие настоящее изобретение.

## 15 ПРИМЕРЫ

### ПРИМЕР 1. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОКАПСУЛ, ЗАГРУЖЕННЫХ МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ.

#### *Реагенты*

Для получения полимерных микрокапсул, загруженных магнитными наночастицами, согласно настоящему изобретению использовали следующие реагенты: хлорид железа (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (99,99 %, Sigma-Aldrich); хлорид железа (II) ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (99,99 %, Sigma-Aldrich); гидроксид аммония 25 % (99,8 %, Вектон); лимонная кислота (99,99 %, Sigma-Aldrich); карбонат натрия (99,9 %, Вектон); хлорид кальция (99,9 %, Вектон); декстрансульфат натрия (натриевая соль сульфата декстрана, DexS) (M ~ 40 кДа, Sigma-Aldrich); гидрохлорид полиаргинина (PArg) (M ~ 15-70 кДа, Sigma-Aldrich); хлорид натрия (99,9 %, Вектон); динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) (99,9 %, Вектон); сульфосалициловая кислота (99,9 %, Вектон); соляная кислота (37 %, Вектон).

#### *Получение магнитных наночастиц на основе оксида железа*

Наночастицы оксида железа получали ко-преципитацией хлоридов железа (II, III) (молярное отношение 1:2) в щелочной среде. Синтез проводили в атмосфере Ar.  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,43 г) и  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,17 г) растворяли в 40 мл деионизированной воды. Затем 2 мл 25 % гидроксида аммония быстро вливали в раствор солей железа при интенсивном перемешивании. В качестве стабилизатора роста частиц использовали лимонную кислоту (CA). Через 5 минут к полученным частицам  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  добавляли 2 мл лимонной кислоты (0,3 г/мл). Раствор частиц оставляли перемешиваться на 90 минут при комнатной температуре. Полученный коллоидный раствор наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в CA очищали диализом на целлюлозных мембранах с размером пор 12-14 кДа ("Orange Scientific", Бельгия) в течение 72 часов. Средой для диализа служила деионизированная вода, которую меняли каждые 12 часов на стадии очистки. Очищенный коллоидный раствор центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 минут для удаления крупных агрегатов. Полученный супернатант использовали для дальнейших экспериментов.

#### *Синтез полиэлектролитных микрокапсул, загруженных наночастицами на основе оксида железа*

Полимерные микрокапсулы, используемые в способе согласно настоящему изобретению, синтезировали с помощью технологии мультислоев ("layer-by-layer" technology, LBL), путем попеременной адсорбции противоположно заряженных

полиэлектролитов и наночастиц оксида железа на сферических коровых частицах  $\text{CaCO}_3$ . Коровые частицы синтезировали быстрым смешиванием 0,3 М водных растворов хлорида кальция и карбоната натрия в равных объемных соотношениях. Полученные коровые частицы со средним размером 4-5 мкм осаждали центрифугированием (1500 об/мин в течение 30 секунд) и промывали 3 раза деионизированной водой. Затем к суспензии добавляли 1 мл водного раствора (0,15 М NaCl) PArg с концентрацией 1 мг/мл. Суспензию перемешивали на шейкере при 1600 об/мин в течение 15 минут, затем осаждали центрифугированием и промывали 3 раза деионизированной водой для удаления неадсорбированного полимера. Далее, суспензию подвергали кратковременной (5 секунд) обработке ультразвуком для предотвращения агрегации частиц. В качестве следующего слоя наносили DexS (концентрация 1 мг/мл в 0,15 М NaCl) по тому же протоколу, что и полиаргинин. Аналогичным образом, процесс нанесения покрытия повторяли для следующих адсорбционных слоев. МНЧ с отрицательным поверхностным зарядом наносили на слой положительно заряженного PArg. На последнем этапе синтеза капсул коровые частицы  $\text{CaCO}_3$  растворяли в 0,2 М растворе EDTA с pH = 7,2. После этого микрокапсулы промывали 3 раза деионизированной водой. Полученные микрокапсулы имели следующий состав: PArg/DexS/(PArg/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)<sub>4</sub>/(PArg/DexS)<sub>2</sub>. Для удаления агрегатов суспензию полученных микрокапсул пропускали через металлический фильтр с размером пор 5 мкм. Концентрацию микрокапсул в суспензии определяли с помощью световой микроскопии. Для применения в качестве контроля синтезировали аналогичные микрокапсулы, не содержащие магнитных наночастиц.

## **ПРИМЕР 2. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОКАПСУЛ И МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ПОЛУЧЕННЫХ В ПРИМЕРЕ 1.**

### *Методы*

Измерение дзета-потенциала и распределения наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> по размерам проводили с помощью анализатора Stabinoanalyzer и устройства NANO-flex (Microtrac Inc., Крефельд, Германия), соответственно. Также морфологические характеристики магнитных наночастиц исследовали посредством просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ, transmission electron microscopy) (FEI Tecnai Osiris, США). Размер и морфологию полиэлектролитных микрокапсул исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM, scanning electron microscopy) (QUANTA 200i 3D, FEI, США).

Намагниченность образцов измеряли индукционным методом с помощью вибрационного магнитометра EZ11 (Microsense Inc., Лоуэлл, Массачусетс, США) при комнатной температуре ( $\approx 25^\circ\text{C}$ ).

Количественное определение железа в коллоидном растворе и суспензии микрокапсул осуществляли с помощью фотоколориметрического метода. Он основан на измерении оптической плотности комплексов окрашенных ионов железа (III) с сульфосалициловой кислотой в щелочной среде. Железо переводили из нерастворимой формы в свободную ионную форму путем растворения оксида железа в концентрированной соляной кислоте. Оптическую плотность анализируемых растворов, содержащих комплексы железа (III) с сульфосалициловой кислотой, измеряли при  $\lambda = 430$  нм (спектрофотометр Shimadzu UV 2600, Япония). Концентрацию железа определяли по калибровочной кривой.

### *Результаты*

Результаты исследования морфологии и размеров наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> с помощью ТЕМ и SEM изображений полимерных микрокапсул, содержащих указанные наночастицы,

представлены на Фиг. 1. На Фиг. 1а представлено ТЕМ-изображение и распределение по размеру наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , на Фиг. 1b, 1c представлены SEM-изображения полимерных микрокапсул, содержащих указанные наночастицы.

Анализ ТЕМ-изображений позволил установить, что наночастицы оксида железа достаточно однородны, имеют округлую форму и средний размер  $9,2 \pm 3$  нм. Согласно данным, полученным с использованием метода динамического рассеяния света (ДРС) (Фиг. 1b), гидродинамический диаметр наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  составляет  $15,7 \pm 5,2$  нм.

Различия в размерах, полученные с помощью указанных методов, являются следствием наличия органической оболочки вокруг кристаллического ядра.

Согласно данным SEM, средний размер полимерных микрокапсул составляет  $4,2 \pm 0,8$  мкм. Капсулы имеют округлую форму и утолщенную оболочку из-за большого количества слоев полиэлектролитов, содержащих МНЧ.

Проведенный количественный анализ позволил установить, что концентрация железа в коллоидном растворе наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в СА и суспензии микрокапсул составляла 3,2 мг/мл и 1,73 мг/мл, соответственно. На основании значений концентрации капсул и железа в суспензии рассчитывали среднюю массу железа в одной капсуле. Она составляла  $4,1 \cdot 10^{-12}$  г.

На Фиг. 2 представлены кривые намагниченности МНЧ и микрокапсул.

Намагниченность насыщения наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  составляла 77 эме/г. Это ниже известного значения намагниченности кристаллического  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , которое близко к 90 эме/г. Более низкое значение намагниченности наночастиц, как правило, связано с перераспределением катионов, поверхностными и размерными эффектами. Кроме того, цитрат-ионы представляют собой комплексообразующие группы, которые легко связываются с ионами  $\text{Fe}^{3+}$  на поверхности наночастиц оксида железа и могут изменять анизотропию и магнитный момент атомов металла.

Намагниченность насыщения для микрокапсул составляла 69 эме/г. В этом случае меньшая намагниченность, вероятно, связана с полимерным покрытием. Из уровня техники известно о снижении намагниченности наночастиц магнетита, когда они имеют покрытие на основе декстрана или полиаргинина [14, 15]. При этом функциональные группы ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_4^-$ ,  $-\text{OH}$ ) полиэлектролитов PArg и DexS могут взаимодействовать с атомами железа на поверхности частиц магнетита по донорно-акцепторному механизму, что может приводить к уменьшению магнитного момента частиц.

Значения остаточной намагниченности составляли 0,86 и 0,65 эме/г, а значения коэрцитивной силы - 3,8 и 7,26 Э для наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и полимерных микрокапсул, соответственно. Небольшие значения гистерезиса для данных образцов указывают на их суперпарамагнитные свойства. Однако различия в этих значениях можно рассматривать как результат возможного влияния неравномерного распределения МНЧ по поверхности микрокапсул, а также слишком большой загрузки капсул наночастицами.

### **ПРИМЕР 3. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК**

#### *Методы*

#### *1. Культура клеток*

Исследование выполняли на культуре клеток фибробластов мыши L929 (получена из коллекций культур тканей Института вирусологии им. Д.И. Ивановского). Клетки культивировали в стандартных условиях на среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10 % FBS (HyClone, США) и антибиотиками (пенициллин-стрептомицин) при 5 %  $\text{CO}_2$  и  $t = 37^\circ\text{C}$

(инкубатор Sanyo, Япония).

В исследовании использовали клетки в фазе экспоненциального роста. Концентрацию клеток подсчитывали на гемоцитометре, окрашивая 0,4 % раствором трипанового синего. Затем клетки помещали в культуральную колбу на 25 см<sup>2</sup> при концентрации 3×10<sup>6</sup> на колбу. Клетки инкубировали в течение 24 часов при стандартных условиях: 5 % CO<sub>2</sub> и 37°C.

## *2. Дизайн эксперимента*

Графическая схема дизайна эксперимента представлена на Фиг. 3.

Для определения эффективных доз микрокапсул и магнитных наночастиц было проведено предварительное исследование цитотоксичности. На основании данных этого эксперимента подбирали дозы микрокапсул и МНЧ для эксперимента с магнитной гипертермией.

Для микрокапсул использовали 2 дозы: 1) максимальную дозу, не влияющую на клетки, и 2) половину указанной максимальной дозы. Для МНЧ дозы выбирали таким образом, чтобы конечная концентрация магнетита в инкубационной среде была эквивалентна его концентрации в соответствующем количестве капсул. Для оценки цитотоксического эффекта исследуемых воздействий проводили несколько контрольных и экспериментальных серий опытов.

Контроль включал следующие типы образцов: 1 - клетки без какого-либо воздействия; 2 - клетки, на которые воздействовали переменным электромагнитным полем; 3 и 4 - клетки, инкубированные, соответственно, с магнитными наночастицами и с микрокапсулами без воздействия магнитного поля.

Экспериментальные серии были следующими: 5 - капсулы в дозе 5 капсул/клетку + воздействие ПеМП; 6 - МНЧ в дозе 0,085 мг/мл (в пересчете на магнетит) + воздействие ПеМП; 7 - капсулы в дозе 10 капсул/клетку + воздействие ПеМП; 8 - МНЧ в дозе 0,17 мг/мл (в пересчете на магнетит) + воздействие ПеМП. Доза магнетита в сериях 6 и 8 была эквивалентна ей в сериях 5 и 7, соответственно. Время воздействия ПеМП составляло 0,5, 1, 2, 5, 10 и 15 минут.

## *3. Воздействие на клетки переменным электромагнитным полем*

На культуру клеток воздействовали ПеМП с помощью специального устройства производства ООО “Фармаг” (АМТ&С Group), генератор которого подключен к колебательному контуру. Устройство генерирует переменное электромагнитное поле со среднеквадратичным значением амплитуды 200 Э и частотой  $f = 100$  кГц. Рабочая зона представляет собой внутреннюю полость соленоида диаметром 20 мм и высотой 80 мм. Соленоид оснащен системой водного охлаждения для предотвращения нагрева образцов вследствие тепловых потерь.

В ходе эксперимента образцы помещали в центр катушки и подвергали воздействию ПеМП. Температуру образцов измеряли с помощью термпарного датчика и тепловизора Seek Thermal Compact PRO (США).

## *4. Исследование жизнеспособности клеток*

Клетки инкубировали с исследуемыми объектами (капсулами и МНЧ) в течение 24 часов. После этого их трижды промывали PBS для удаления невключенных частиц, извлекали из колб с 0,25 % раствором трипсина-EDTA (ПанЭко) и добавляли в стерильные пробирки (700 мкл клеточной суспензии в каждую пробирку). Пробирки подвергали воздействию переменного электромагнитного поля (100 кГц, 200 Э) с экспозицией в соответствии с экспериментальной схемой, приведенной на Фиг. 3. Для каждой серии эксперимент проводили 3 раза. После воздействия ПеМП клетки L929

из пробирок переносили в 96-луночный планшет в дублетах по 100 мкл и инкубировали в течение 24 часов.

Далее проводили МТТ-тест для определения жизнеспособности клеток. Для этого в каждую лунку добавляли 30 мкл МТТ, растворенного в свежей 1 %-ной среде, и клетки инкубировали в течение 3,5 часов в стандартных условиях. Затем добавляли 150 мкл DMSO для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 492 нм против эталонной 620 нм. Жизнеспособность клеток оценивали по отношению к клеткам контрольной серии № 1 (без воздействия ПеМП, капсул и МНЧ).

#### 5. Исследование поглощения наночастиц и капсул клетками. Исследование морфологии клеток

Клетки помещали в 6-луночный планшет в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/лунку. Затем к клеткам добавляли микрокапсулы и МНЧ в экспериментальных дозах 0,085 мг/мл (5 капсул/клетку) и 0,17 мг/мл (10 капсул/клетку). После 24 часов инкубации дополнительно проводили окрашивание берлинской лазурью (специфическое для железа окрашивание) для получения изображений поглощения железа и определения локализации частиц. Данный метод окрашивания достаточно чувствителен для обнаружения самых низких концентраций внутриклеточного железа.

Кроме того, указанный метод использовали для анализа морфологии клеток после воздействия ПеМП на фибробласты, содержащие микрокапсулы и МНЧ. С этой целью клетки из пробирок после воздействия ПеМП помещали в 6-луночный планшет. После 1 часа инкубации проводили окрашивание берлинской лазурью. Перед введением реагентов клетки трижды промывали PBS для удаления свободных частиц. Клетки фиксировали в течение 40 минут с использованием 4 % параформальдегида. Затем клетки промывали PBS и инкубировали со свежеприготовленным реагентом Перльса (4 % ферроцианид калия/12 % HCl, 1: 1, об/об) в течение 30 минут. Далее клетки трижды промывали PBS, контрастировали нейтральным красным (0,02 %) для лучшей визуализации клеточных структур и исследовали с помощью инвертированного оптического микроскопа (Микромед, Россия).

#### Результаты

##### 1. Оценка поглощения наночастиц и капсул клетками

С целью оценки эффективности применения микрокапсул, нагруженных магнитными наночастицами, в способах магнитной гипертермии необходимо выявить возможность интернализации капсул и наночастиц клетками. Для этого оценивали два показателя: 1) количество клеток, взаимодействующих с капсулами, и 2) среднее количество капсул, поглощенных одной клеткой. Для оценки указанных показателей проводили две серии экспериментов, в которых применяли микрокапсулы в дозе 10 капсул/клетку и 5 капсул/клетку. Результаты представлены на Фиг. 4.

Среднее количество клеток, содержащих капсулы во внутренней среде или на поверхности мембраны, практически не зависело от дозы капсул (88 и 86 % для серий из 10 и 5 капсул/клетку соответственно). Напротив, среднее количество капсул, поглощенных одной клеткой, увеличивалось с увеличением их концентрации в растворе и составило 3,4 и 4,6 капсул для серий из 5 капсул/клетку и 10 капсул/клетку, соответственно. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными в работе [14], где при исследовании аналогичных капсул было показано, что при сходных размерах количество абсорбированных капсул составляет 3-4 на клетку.

Известно, что полиэлектролитные микрокапсулы, а также другие аналогичные объекты подобного размера подвергаются клеточному захвату путем эндоцитоза,

который следует рассматривать как основной путь поглощения. Из уровня техники известно, что поглощение капсул клетками может происходить даже без присутствия определенных лигандов на поверхности. Однако, некоторые типы полимеров способны стимулировать процесс захвата капсул клетками. В частности, было показано, что фибробласты более активно захватывают частицы, покрытые декстраном. Также, было обнаружено, что частицы микронного размера попадают в клетку по клатрин-независимому пути, который основан на опосредованной кавеолами интернализации. Кроме того, полиэлектролитные микрокапсулы могут интернализироваться благодаря механизму, опосредованному липидными рафтами. Указанные механизмы типичны для нефагоцитирующих эукариотических клеток при интернализации частиц большого размера. Захват мелких частиц клетками осуществляется по другому механизму - с помощью трансмембранной диффузии. В частности, известно, что магнитные наночастицы на основе оксида железа, стабилизированные лимонной кислотой, адсорбируются на поверхности клетки и интернализуются за счет трансмембранной диффузии.

Чаще всего захваченные клетками полиэлектролитные капсулы локализируются в эндосомах или лизосомах, но они также могут располагаться в цитозоле. Следует также отметить, что капсулы достаточно хорошо адсорбируются на клеточной мембране. Адсорбции способствует наличие заряженных полимеров в оболочке капсулы, взаимодействующих с белками на поверхности клетки.

Результаты оценки содержания интернализированного железа продемонстрированы на Фиг. 4. При обработке клеток микрокапсулами, загруженными МНЧ, содержание железа в них было значительно выше, чем в случае применения магнитных наночастиц. Разница составила 6,5 и 5,2 раза в сериях по 10 и 5 капсул/клетку, соответственно. Подобная разница может быть связана с описанными выше механизмами взаимодействия частиц с клетками.

Как отмечено выше, микрокапсулы хорошо адсорбируются на клеточной мембране, и при этом проникают во внутриклеточную среду за счет эндоцитоза. Более высокое количество связанного с клетками оксида железа в серии с микрокапсулами можно объяснить двумя моментами. Во-первых, в случае адсорбции на поверхности мембраны капсулы, имеющие значительно больший объем, с той же площадью контакта с клеткой, содержат значительно больше железа, чем наночастицы. Во-вторых, по-видимому, эндоцитоз является более эффективным, чем прямая трансмембранная диффузия, поскольку гидрофильные МНЧ плохо проникают через гидрофобный липидный бислой клеточной мембраны. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о большей эффективности связывания клеток с целевым веществом в случае микрокапсул по сравнению с наночастицами.

## *2. Оценка жизнеспособности клеток*

Как отмечено выше, в разделе *Дизайн эксперимента* исследование включало несколько типов контрольных образцов. В дополнение к полностью отрицательному контролю (интактные клетки без какой-либо обработки) ряд клеток инкубировали с магнитными наночастицами и микрокапсулами без воздействия магнитного поля, а также применяли ПеМП к клеткам, которые не были в контакте с МНЧ и капсулами. Результаты оценки жизнеспособности представлены на Фиг. 5.

Как следует из гистограмм, представленных на Фиг. 5, инкубация клеток с капсулами и наночастицами без воздействия магнитного поля не приводила к снижению их жизнеспособности. Аналогичный результат был получен для клеток, подвергавшихся воздействию ПеМП, в отсутствие микрокапсул и МНЧ. В случае инкубации клеток с

магнитными наночастицами воздействие переменного электромагнитного поля также не приводило к снижению их выживаемости.

В экспериментальной серии, включавшей инкубацию клеток с микрокапсулами, загруженными наночастицами, после воздействия ПеМП отмечали зависимое от дозы и времени воздействия снижение их жизнеспособности. Жизнеспособность составляла 75 и 28 % в сериях опытов, включавших применение микрокапсул в дозе 5 и 10 капсул/клетку, соответственно. Максимальный цитотоксический эффект отмечался при воздействии ПеМП в течение 20 минут; дальнейшее увеличение времени воздействия не приводило к значительному снижению жизнеспособности клеток.

Обсуждая возможный механизм цитотоксичности полиэлектролитных микрокапсул в комбинации с переменным электромагнитным полем, следует отметить следующее. На первый взгляд, повреждение клеток может быть вызвано тепловым воздействием. В то же время результаты экспериментов свидетельствуют об отсутствии повышения температуры среды для инкубации клеток в течение всего времени наблюдения (Фиг. 5).

Феномен гибели клеток с интернализированными магнитными наночастицами в нормальных температурных условиях наблюдался рядом исследователей. В частности, в публикации [20] описана гибель клеток линии MDA-MB-468 под действием ПеМП после инкубации с EGFR-содержащими магнитными наночастицами без заметного повышения температуры.

Авторы предполагают, что механизм повреждения клеток связан с локальным повышением температуры внутри фагосом и фаголизосом без заметного перегрева цитоплазмы и внеклеточной жидкости. Необходимым условием реализации этого механизма является интернализация магнитных наночастиц и интеграция фагосомы с лизосомой с образованием фаголизосомы. Возможность повышения температуры внутри этих структур обусловлена значительно меньшей теплопроводностью клеточной мембраны по сравнению с водной фазой цитоплазмы. Термическое разрушение фагосомы приводит к высвобождению липосомальных гидролаз и индукции апоптоза клетки без значительного повышения ее температуры.

Сравнивая данные МТТ-теста с результатами количественной оценки фагоцитоза капсул, можно отметить интересную закономерность. Число нежизнеспособных клеток было близко к числу клеток, интернализировавших три или более капсул. Таким образом, указанное количество захваченных клеткой капсул можно считать достаточным для инициации ее гибели.

Обнаруженный феномен повреждения клеток без повышения температуры инкубационной среды может иметь большое значение с точки зрения селективности разрушения патологически измененных клеток. Если капсулы нацелены на патологически измененные клетки, воздействие переменного электромагнитного поля приведет только к гибели этих клеток, не затрагивая соседние клетки, что может быть чрезвычайно полезно, например, в терапии рака.

### *3. Оценка морфологии клеток*

Результаты анализа морфологии клеток представлены на Фиг. 6. Они коррелировали с данными, полученными при оценке жизнеспособности клеток. В контрольной серии опытов, включавшей воздействие ПеМП на клетки в отсутствие микрокапсул и МНЧ, морфологических изменений не обнаружено. Фибробласты имели типичную веретеновидную или звездчатую форму, контуры клеток ровные, ядро округлой формы располагалось в центре клетки, цитоплазма светлая, без посторонних включений.

В других контрольных сериях, включавших инкубацию клеток с капсулами и

наночастицами без воздействия магнитного поля, клетки имели веретеновидную форму, характерную для фибробластов. В серии опытов с наночастицами цитоплазма приобрела сине-зеленый оттенок за счет включенных в нее частиц оксида железа. В большинстве случаев сине-зеленое окрашивание цитоплазмы было равномерным, но в некоторых клетках частицы располагались преимущественно в перинуклеарной зоне. При инкубации клеток с микрокапсулами их морфология не изменялась. Капсулы имели вид округлых синих структур, расположенных как внутри контуров клеток, так и по их периферии, частично перекрывая мембрану.

Воздействие ПеМП в разных сериях опытов по-разному влияло на морфологию клеток. В серии, где клетки инкубировали с МНЧ, структура клеток не изменялась после воздействия поля. Следует отметить, что в данном исследовании величина магнитного поля была на порядок ниже, а значения частоты ПеМП были примерно на порядок выше, чем значения амплитуды и частоты ПеМП, которые могут привести к механической деформации клетки и/или повреждению макромолекул.

В экспериментальной серии, где клетки инкубировали с капсулами в дозе 5 капсул/клетку, большинство клеток сохраняло свою форму после воздействия магнитного поля. Однако, при этом, встречались единичные круглые клетки и клетки с недифференцированным ядром. Количество клеток в поле зрения, как и количество микрокапсул, было таким же, как в начале эксперимента. Микрокапсулы сохраняли округлую форму и характерный синий цвет.

В экспериментальной серии, где клетки инкубировали с капсулами в дозе 10 капсул/клетку, наблюдали наиболее выраженные изменения морфологии клеток. Типичные веретенообразные клетки отсутствовали. Визуализировавшиеся клетки имели неправильную форму, у некоторых отсутствовало ядро. Многие клетки имели нетипичную для фибробластов овальную или круглую форму со смещенным к периферии ядром. Некоторые клетки характеризовались нечеткими внешними границами. На фоне клеток и их теней визуализировались капсулы, морфология которых не изменилась после воздействия переменного электромагнитного поля.

Таким образом, и микрокапсулы, и МНЧ способны взаимодействовать с клетками, однако, при этом, применение микрокапсул, нагруженных магнитными наночастицами, обеспечивает большее накопление железа в клетке по сравнению с МНЧ. Инкубация клеток с МНЧ в сочетании с воздействием переменного электромагнитного поля не приводила к гибели клеток. Напротив, инкубация клеток с микрокапсулами с последующим воздействием ПеМП приводила к дозозависимой цитотоксичности. Увеличение такого параметра, как количество капсул на клетку, приводит к снижению жизнеспособности клеток. В частности, в экспериментальной серии, включавшей применение 5 капсул/клетку, жизнеспособность составила 75 %, в то время как двукратное увеличение этого параметра в серии, включавшей применение 10 капсул/клетку, приводило к падению жизнеспособности до 28 %. Также было обнаружено, что при воздействии ПеМП на клетки, инкубировавшиеся с капсулами и магнитными наночастицами, температура инкубационной среды не изменялась, что подтверждает гипотезу об отсутствии существенного поглощения тепла всей средой.

Обнаруженные эффекты открывают перспективы использования микрокапсул, нагруженных магнитными наночастицами, для магнитной гипертермии. Во-первых, гибель только тех клеток, которые способны поглощать или адсорбировать микрокапсулы, нагруженные МНЧ, может повысить селективность воздействия в случае целевого введения, обеспечивая повреждение или разрушение только патологически измененных клеток. Во-вторых, капсулы в сочетании с ПеМП могут найти применение

в химиотерапии опухолей серозных полостей, поскольку в данном случае нет препятствий для их поглощения злокачественными клетками, которые, согласно имеющимся сведениям, способны к интенсивной интернализации. При этом, они не вызовут глубокого ожога серозной оболочки, обеспечивая разрушение только

5 поверхностного слоя клеток.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что полимерные микрокапсулы, загруженные магнитными наночастицами на основе магнитных оксидов металлов, преимущественно, на основе ферритов, характеризующиеся повышенной цитотоксичностью, низкой токсичностью вследствие возможности применения

10 магнитных наночастиц в более низких дозах и точечным воздействием на орган-мишень, можно успешно использовать для подавления роста раковых клеток или их разрушения в способах магнитной гипертермии.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Hilger I. In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. Int J Hyperthermia  
15 2013; 29(8): 828-834.

[2] Gray BN, Jones SK. Targeted hysteresis hyperthermia as a method for treating diseased tissue. US6565887 (2003).

[3] Mallory M, Gogineni E, Jones GC, Greer L, Simone CB. Therapeutic hyperthermia: the old, the new, and the upcoming. Crit Rev Oncol Hematol 2016; 97: 56-64.

20 [4] Hergt R, Dutz S, Muller R, Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. J Phys: Condens Matter 2006; 18: S2919-S2934.

[5] Tong W, Song X, Gao C. Layer-by-layer assembly of microcapsules and their biomedical applications. Chem Soc Rev 2012; 41(18): 6103-6124.

25 [6] Borodina TN, Rumsh LD, Kunizhev SM, Sukhorukov GB, Vorozhtsov GN, Feldman BM. Polyelectrolyte microcapsules as systems for delivery of biologically active substances. Biomed Khim 2007; 53: 557-565.

[7] Caruso F, Susha AS, Giersig M, Möhwald H. Magnetic core-shell particles: preparation of magnetite multilayers on polymer latex microspheres. Adv Mater 1999; 11: 950-953.

30 [8] Nakamura M, Katagiri K, Koumoto K. Preparation of hybrid hollow capsules formed with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and polyelectrolytes via the layer-by-layer assembly and the aqueous solution process. J Colloid Interface Sci 2010; 341: 64-68.

[9] Podgórna K, Szczepanowicz K. Synthesis of polyelectrolyte nanocapsules with iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles for magnetic targeting. Colloids Surf Physicochem Eng Aspects 2016; 1-  
35 6.

[10] Novoselova MV, German SV, Sindeeva OA, Kulikov OA, Minaeva OV, Brodovskaya EP, Ageev VP, Zharkov MN, Pyataev NA, Sukhorukov GB, Gorin DA. Submicron-sized nanocomposite magnetic-sensitive carriers: controllable organ distribution and biological effects. Polymers 2019; 11(6): 1-23.

40 [11] Minaeva V, Brodovskaya EP, Pyataev MA, Gerasimov MV, Zharkov MN, Yurlov IA, Kulikov OA, Kotlyarov AA, Balykova LA, Kokorev AV, Zaborovskiy AV, Pyataev NA, Sukhorukov GB. Comparative study of cytotoxicity of ferromagnetic nanoparticles and magnetite containing polyelectrolyte microcapsules. Journal of Physics: Conference Series 2017; 784: 12-38.

45 [12] Mayorova OA, Sindeeva OA, Lomova MV, Gusliakov OI, Tarakanchikova YV, Tyutyayev EV, Pinyaev SI, Kulikov OA, German SV, Pyataev NA, Gorin DA, Sukhorukov GB. Endovascular addressing improves the effectiveness of magnetic targeting of drug carrier. Comparison with the conventional administration method. Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine 2020;

28: 102184.

[13] Cazares-Cortes E, Cabana S, Boitard C, Nehlig E, Griffete N, Fresnais J, Wilhelm C, Abou-Hassan A, Ménager C. Recent insights in magnetic hyperthermia: from the “hot-spot” effect for local delivery to combined magneto-photo-thermia using magnetoplasmonic hybrids. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2019; 138: 233-246.

[14] Luo D, Poston RN, Gould DJ, Sukhorukov GB. Magnetically targetable microcapsules display subtle changes in permeability and drug release in response to a biologically compatible low frequency alternating magnetic field. *Materials Science & Engineering* 2019; 94: 647-655.

[15] Cristofolini L, Szczepanowicz K, Orsi D, Rimoldi T, Albertini F, Warszynski P. Hybrid polyelectrolyte/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocapsules for hyperthermia applications. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016; 8(38): 25043-50.

[16] Герман СВ, Новоселова МВ, Горин ДА, Сухоруков ГБ. Способ загрузки неорганических наночастиц или органических молекул в пористые частицы микронного или субмикронного размера. RU2721562 (2020).

[17] Haik Y, Chen CJ. Magnetic particle composition for therapeutic hyperthermia. US 7842281 (2010).

[18] Navolokin NA, German SV, Bucharskaya AB, Godage OS, Zuev VV, Maslyakova GN, Pyataev NA, Zamyshliaev PS, Zharkov MN, Terentyuk GS, Gorin DA, Sukhorukov GB. Systemic administration of polyelectrolyte microcapsules: where do they accumulate and when? In vivo and ex vivo study. *Nanomaterials* 2018; 8(812): 1-14.

[19] Lopez-Dominguez V, Hernández JM, Tejada J, Ziolo RF. Colossal reduction in curie temperature due to finite-size effects in CoFeO nanoparticles. *Chemistry of Materials* 2013; 25 (1): 6-11.

[20] Creixell M, Bohórquez AC, Torres-Lugo M, Rinaldi C. EGFR-targeted magnetic nanoparticle heaters kill cancer cells without a perceptible temperature rise. *ACS Nano* 2011; 5 (9): 7124-9.

### (57) Формула изобретения

1. Способ лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии, включающий следующие стадии:

(i) доставка в область опухоли полимерных микрокапсул на основе декстрансульфата натрия и гидрохлорида полиаргинина в эффективной концентрации, содержащих магнитные наночастицы на основе оксида железа Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>,

(ii) воздействие на область опухоли переменным электромагнитным полем (ПемП) с амплитудой от 50 до 300 Э и частотой от 50 до 400 кГц, где время воздействия указанного магнитного поля при температуре от 38 до 51 °С составляет от 10 до 70 мин, и

(iii) селективное повреждение или разрушение опухолевых клеток в области опухоли по существу без повреждения здоровой окружающей ткани.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные полимерные микрокапсулы содержат сферическую частицу и полимерное покрытие.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанные полимерные микрокапсулы содержат сферическую частицу на основе CaCO<sub>3</sub>.

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанное полимерное покрытие состоит из полиэлектролита или биоразлагаемого полимера.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанное полимерное покрытие получено из натриевой соли сульфата декстрана (DexS) и поли-L-аргинина (PArg).

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что средний размер указанных полимерных

микрокапсул составляет от 0,2 до 10 мкм.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что средний размер указанных полимерных микрокапсул составляет от 3 до 6 мкм.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что среднее значение коэрцитивной силы для указанных полимерных микрокапсул составляет от 3 до 250 Э.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что среднее значение коэрцитивной силы для указанных полимерных микрокапсул составляет от 3 до 30 Э.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные магнитные наночастицы представляют собой наночастицы на основе оксида железа  $Fe_3O_4$ .

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные магнитные наночастицы представляют собой Zn-замещенные магнитные наночастицы на основе феррита марганца формулы  $Zn_xMn_{1-x}Fe_2O_4$ , где  $x = 0-0,3$ .

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанные магнитные наночастицы представляют собой Zn-замещенные магнитные наночастицы на основе феррита марганца формулы  $Zn_{0,2}Mn_{0,8}Fe_2O_4$ .

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что средний размер указанных магнитных наночастиц составляет менее 50 нм.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что средний размер указанных магнитных наночастиц составляет от 5 до 30 нм.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что температура Кюри указанных магнитных наночастиц составляет от 42 °С до 45 °С.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что среднее значение коэрцитивной силы для указанных магнитных наночастиц составляет от 1 до 30 Э.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные полимерные микрокапсулы имеют следующий состав оболочки: PArg / DexS / (PArg /  $Fe_3O_4$ )<sub>4</sub> / (PArg / DexS)<sub>2</sub>.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные полимерные микрокапсулы содержат от 100 до 1000 наночастиц.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные полимерные микрокапсулы вводят внутривенно или внутрь опухоли в конкретные участки тела пациента, нуждающегося в этом.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанные полимерные микрокапсулы вводят путем инъекции или инфузии.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что переменное электромагнитное поле на стадии (ii) создают с помощью внешнего источника поля.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что внешний источник поля, создающий переменное электромагнитное поле на стадии (ii), помещают внутри или снаружи тела пациента, нуждающегося в указанном лечении.

23. Способ по п. 1, отличающийся тем, что стадия (ii) включает один или несколько циклов.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что на стадии (ii) период времени и количество циклов воздействия выбирают на основе типа опухоли для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90%, предпочтительно 95% опухолевых клеток.

25. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает стадию неинвазивного измерения температуры опухоли на стадии (ii).

26. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает стадию инвазивного измерения температуры опухоли на стадии (ii).

27. Способ по п. 1, отличающийся тем, что область опухоли нагревают до температуры от 42 °С до 45 °С.

28. Способ по п. 1, отличающийся тем, что на стадии (i) полимерные микрокапсулы выбирают на основе их характеристик, включающих средний размер, форму, количество  
5 входящих в состав магнитных наночастиц, восприимчивость к внешнему электромагнитному полю, и типа опухоли для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90%, предпочтительно, 95% опухолевых клеток.

29. Способ по п. 1, отличающийся тем, что на стадии (i) магнитные наночастицы, входящие в состав полимерных микрокапсул, выбирают на основе их характеристик,  
10 включающих химический состав, форму, средний размер, тепловыделение под действием электромагнитного поля, температуру Кюри, и типа опухоли для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90%, предпочтительно, 95% опухолевых клеток.

30. Способ по п. 1, отличающийся тем, что на стадии (ii) параметры переменного  
15 электромагнитного поля, включая амплитуду и частоту, выбирают в зависимости от типа опухоли для обеспечения повреждения или разрушения по меньшей мере от 80 до 90%, предпочтительно, 95% опухолевых клеток.

31. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное злокачественное новообразование представляет собой рак молочной железы, рак легких, рак глотки,  
20 рак гортани, рак пищевода, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак матки, рак шейки матки, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак яичка, рак предстательной железы, рак кости или рак мозга.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что указанное злокачественное новообразование представляет собой рак желудка, рак предстательной железы или рак  
25 мозга.

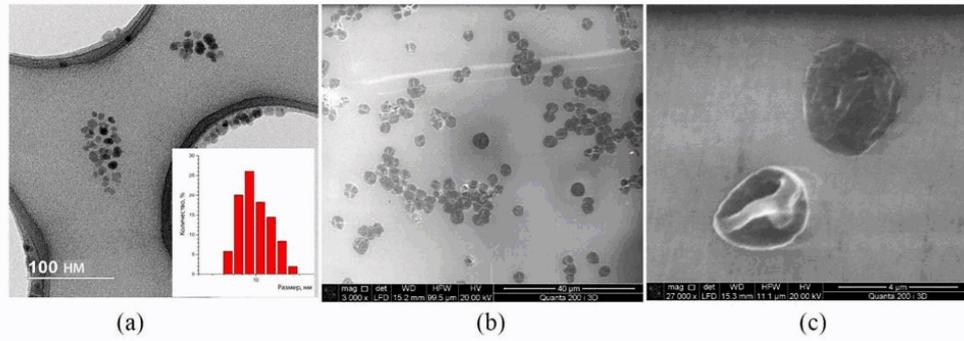
33. Применение композиции, содержащей полимерные микрокапсулы на основе декстрансульфата натрия и гидрохлорида полиаргинина в эффективной концентрации, содержащие магнитные наночастицы на основе оксида железа Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и фармацевтически  
30 приемлемое вспомогательное вещество, в способе лечения злокачественного новообразования с помощью магнитной гипертермии по любому из пп. 1-32.

35

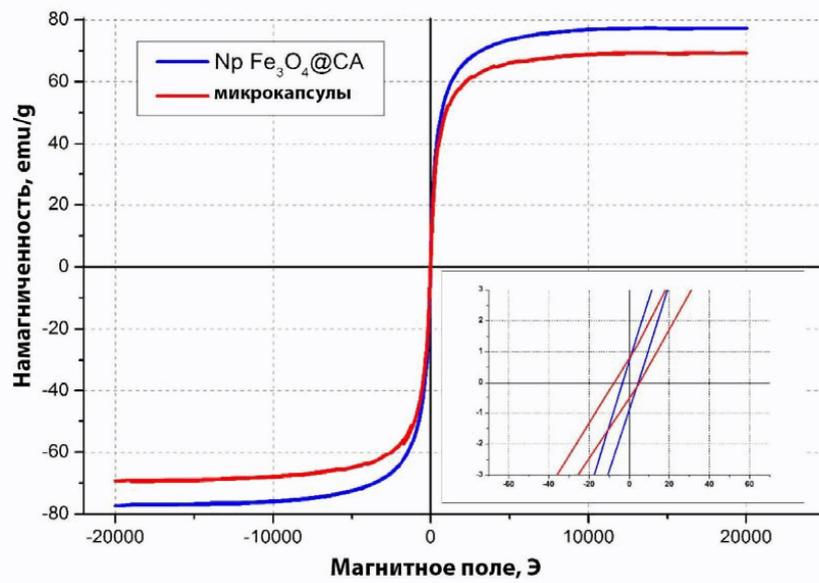
40

45

1

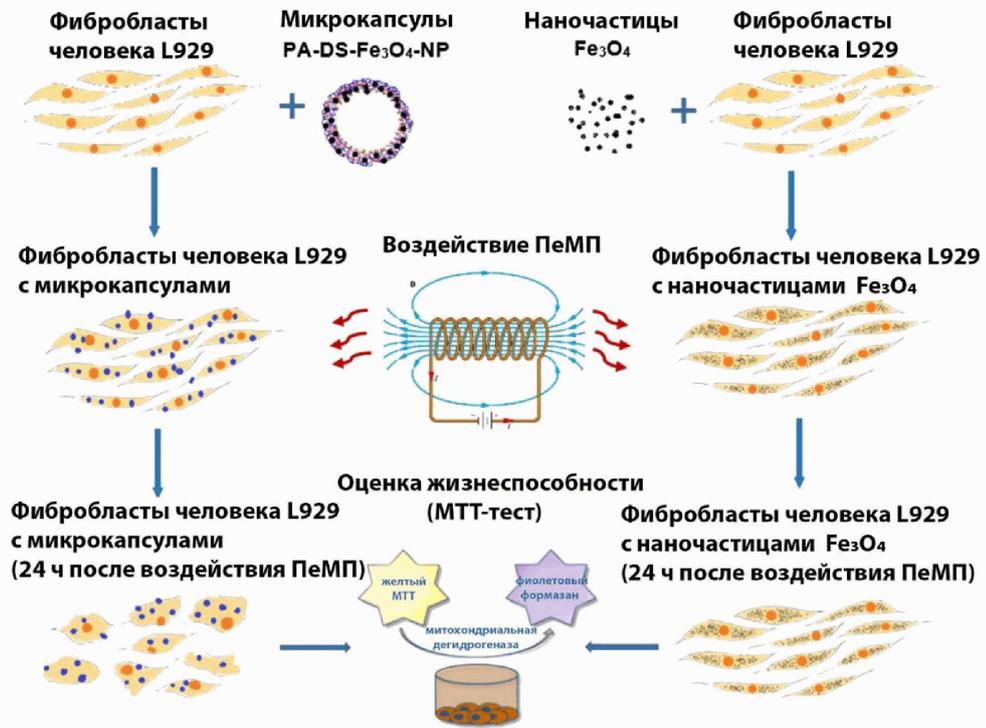


Фиг. 1

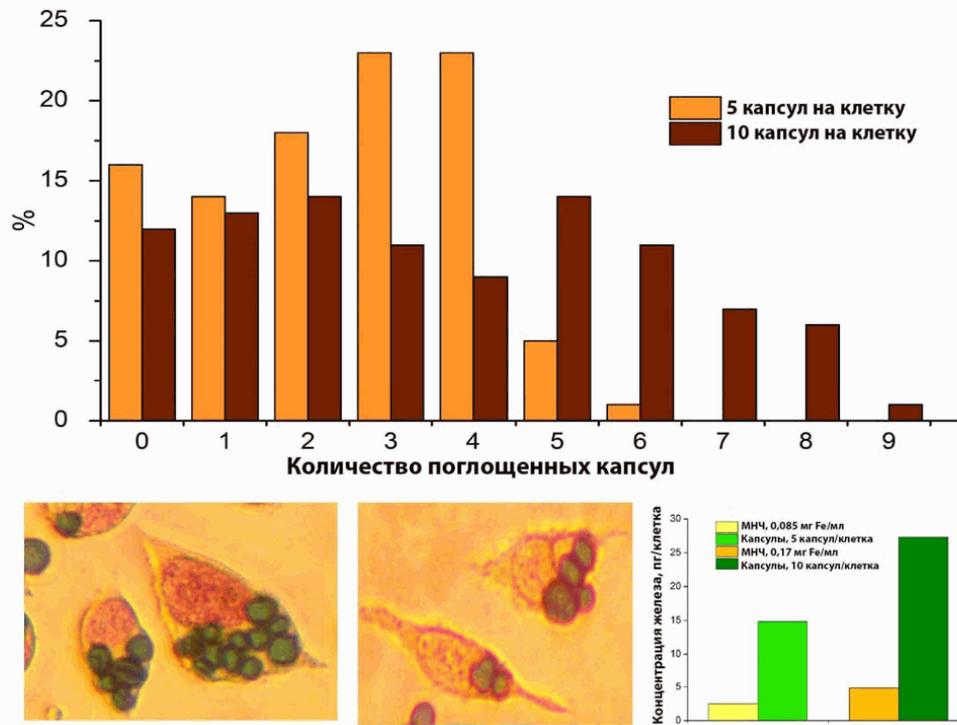


Фиг. 2

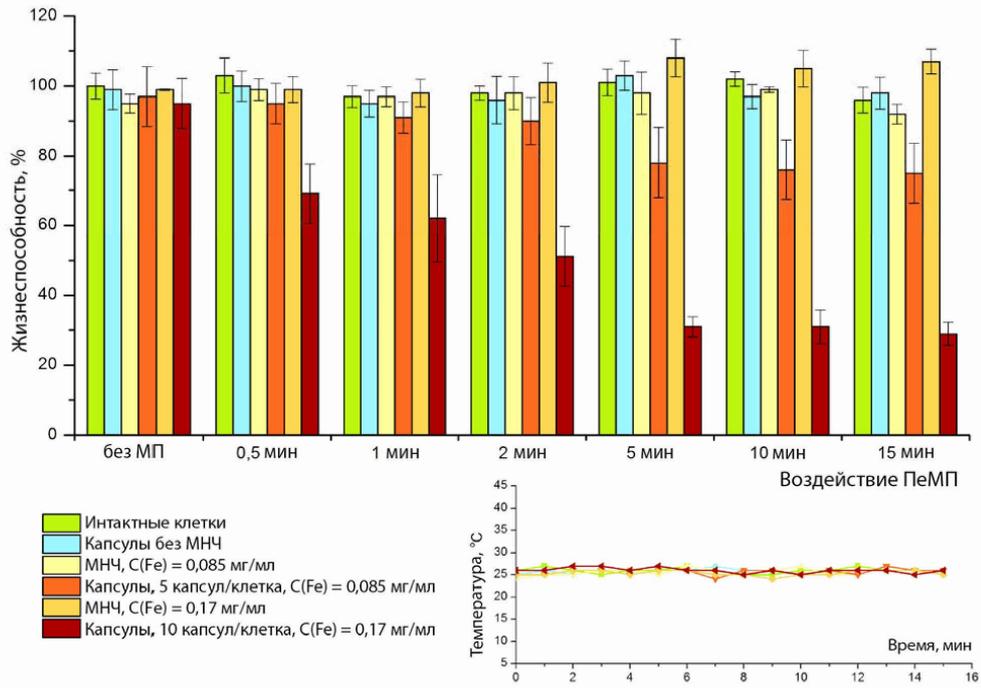
2



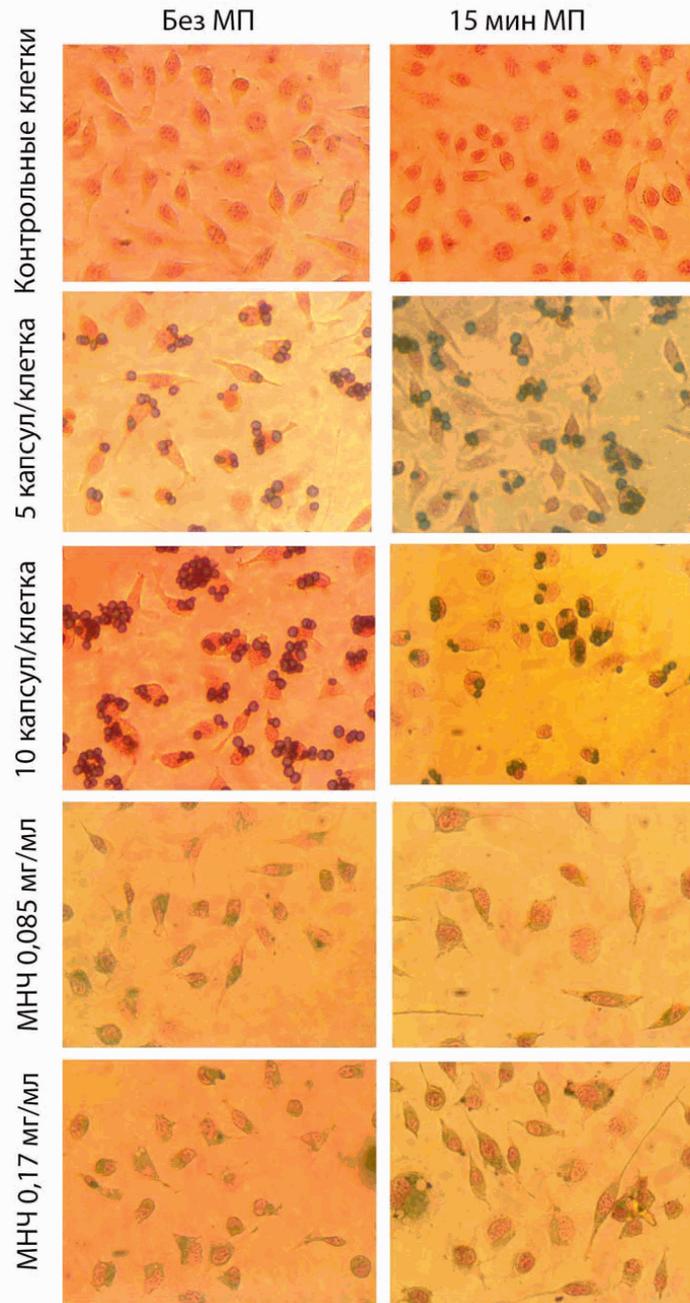
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6