SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

# ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 20.09.93

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 07/948 113

(32) Dátum priority: 21.09.92

(33) Krajina priority: US

(43) Dátum zverejnenia: 08.05.1996

(86) Číslo PCT: PCT/CA93/00382, 20.09.93

(21) Číslo dokumentu:

**352-95**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

**A 61K 31/40**

(71) Prihlasovateľ: QUADRA LOGIC TECHNOLOGIES, INC., Vancouver, British Columbia, CA;

(72) Pôvodca vynálezu: Richter Anna M., Vancouver, British Columbia, CA;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob in vivo transkutánnej aktivácie fotosenzitívnych činidiel v krvi**

(57) Anotácia:
Je opísaný spôsob zničenia alebo poškodenia cieľových buniek v krvnom riečišti intaktného živočícha, ktoré selektívne akumulovali fotosenzitívne činidlo. Ožarovanie sa aplikuje aspoň na časť intaktného živočícha a intenzitou dostatočnou na selektívne poškodenie alebo zničenie cieľových buniek, pričom ponecháva ostatné bunky krvi relatívne nepoškodené. Cieľovými bunkami sú leukemické bunky, bunky obsahujúce vírusy, parazity a iné mikroorganizmy.

PV 352-95



# Spôsob in vivo transkutánnej aktivácie fotosenzitívnych činidiel v krvi

## Oblasť techniky

Predložený vynález sa všeobecne týka oblasti medicíny a farmakoterapeutík s fotosenzitívnymi činidlami. Špecificky vynálezom je metóda zničenia alebo poškodenia v krvi sa nachádzajúcich buniek, ktoré prijali fotosenzitívne činidlo, aplikáciou ožiarenia transkutánne, pre selektívne poškodenie alebo zničenie cieľových buniek, pričom necieľové bunky zostávajú relatívne nepoškodené.

## Doterajší stav techniky

Fotodynamická terapia zahrňuje podanie fotosenzitívnej zlúčeniny a následné ožiarenie tkaniva, v ktorom sa fotosenzitívna zlúčenina selektívne usadí, svetlom. Cieľové tkanivo, obsahujúce dostatočne vysokú koncentráciu fotosenzitívnej zlúčeniny, selektívne absorbuje svetlo, čo vedie k poškodeniu alebo zničeniu buniek v bezprostrednom okolí. US patentový spis č. 5095030 opisuje postupy, pri ktorých sú fotosenzitívne zlúčeniny podávané živočíchom, ktoré sú následne ožiarené za použitia vonkajšieho zdroja svetla. Napríklad príklad 5 tohto patentu opisuje subkutánne injektovanie myší nádorovými bunkami P815, ktoré rastú do hmatateľného tumoru. Fotosenzitívne zlúčeniny sú injektované následne a potom sú zvieratá udržované v tme tri hodiny. Pomer prežívajúcich bol u ošetrených zvierat voči neošetrenej kontrole zlepšený. Podobne príklad 8 tohto patentu opisuje použitie rhabdomyosarkómového systému u myší s podobným protokolom. Tieto príklady sú teda zamerané na ošetrenie lokalizovaných pevných tumorov, kde vonkajšie aplikované svetlo je vedené na tumor. V týchto prípadoch nie je cieľové tkanivo obsiahnuté v krvnom prúde, kde

ošetrenie musí vylúčiť poškodenie krvných ciev a necieľových krvných buniek.

US patent č. 4960408 opisuje ošetrenie obsahov krvného prúdu /HIV vírus a infikované T-bunky/ fotoforézou. Pri tejto technike pacientova krv prechádza mimotelovým prístrojom, v ktorom sa frakcia bielych krviniek vystaví ultrafialovému žiareniu pred tým, než sa biele krvinky vrátia pacientovi.

Benzoporfyrínové deriváty /BPD/, v kombinácii s červeným svetlom /400-900 nm/, boli opísané ako účinné pri odstránení ako voľných vírusov tak aj vírusmi infikovaných buniek z krvných produktov a z plnej krvi odobranej od viremických mačiek. Červené krvinky sa javia ako životaschopné po virucidálnom ošetrení /North a spol., Blood Cells 18:129-40, 1992/.

BPD tiež demonštruje vyššiu afinitu pre tumorové tkanivo, zahrňujúce leukemické bunky, než pre normálne nemaligné bunky /Jamieson a spol., Leukemia Res. 14:209-19, 1990/.

US patent č. 5095030, udelený 10.marca 1992, ktorý je tu zahrnutý ako literárny odkaz, opisuje a nárokuje rôzne činidlá špecifické k rôznym vlnovým dĺžkam, ktoré sú všeobecne nazvané ako "zelené porfyríny". Tieto zlúčeniny sú porfyrínové deriváty, ktoré sú modifikované Dielsovou - Alderovou reakciou, ovplyvňujúce posun vlnovej dĺžky absorpcie k dlhšej vlnovej dĺžke. Toto vedie k o niečo lepším vlastnostiam v porovnaní, napríklad s hematoporfyrínovým derivátom, keď tieto zlúčeniny sú používané všeobecne vo fotodynamickej terapii. Ako je opísané v tomto patente, tieto cytotoxické činidlá, ak sú podávané systémovo, "sa udomácňujú" v nechcených bunkách, predovšetkým v nádorových bunkách alebo patogénnych vírusoch a následné ožiarenie svetlom, ktoré tieto zlúčeniny absorbujú, spôsobí u nich takú premenu, že pôsobia cytotoxicky.

Prihláška v konaní č. 07/832,542 podaná 5. februára 1992

opisuje prípravu lipozómov porfyrínových fotosenzibilátorov.

Podstata vynálezu

Predložený vynález poskytuje spôsob zničenia alebo poškodenia cieľových buniek, ktoré selektívne akumulujú fotosenzitívne činidlo, pričom cieľové bunky sú v krvnom prúde intaktného živočícha. Krvný prúd a živočích tiež obsahujú necieľové bunky. Spôsob zahrňuje transkutánnu aplikáciu ožiarenia aspoň časti intaktného živočícha v intenzite, ktorá je účinná pre poškodenie alebo zničenie selektívne cieľových buniek a zanecháva necieľové bunky relatívne nepoškodené.

V inom uskutočnení je vynález aplikovaný na cieľové bunky, ktoré sa rýchle množia v porovnaní s necieľovými bunkami. V inom uskutočnení môžu byť cieľové bunky leukemické bunky, bunky, obsahujúce vírus, bunky, obsahujúce parazity, baktérie, voľné vírusy alebo iné infekčné činidlá v krvi.

Aj keď vynález poskytuje použitie akéhokoľvek činidla citlivého na svetlo, výhodne je činidlo vybrané z chlorínov (ako je chlorín e6), bakteriochlorínov, ftalokyanínov, porfyrínov, purpurínov, merokyanínov a prekurzorov liečiv ako je delta-aminolevulová kyselina, ktoré môžu produkovať liečivá ako je protoporfyrín v tkanive. V iných uskutočneniach sú fotosenzitívnymi činidlami BPD-MA a porfimer-sodík.

Predložený vynález predstavuje spôsob zničenia alebo poškodenia krvných cieľových buniek, ktoré selektívne akumulujú fotosenzitívne činidlo, zatiaľ čo necieľové bunky zostávajú relatívne nepoškodené. Spôsob zahrňuje aplikáciu ožiarenia transkutánne aspoň časti intaktného živočícha v intenzite účinnej pre selektívne poškodenie alebo zničenie cieľových buniek.

Tu použitý výraz "cieľové bunky" zahrňuje tie bunky, ktoré majú byť poškodené alebo zničené týmto spôsobom ošetrenia. Cieľové bunky prijímajú fotosenzitívne činidlo. Ak je potom aplikované dostatočné ožiarenie, sú cieľové bunky poškodené alebo zničené. Cieľovými bunkami môžu byť akékoľvek z buniek, nachádzajúcich sa v krvi.Cieľové bunky zahrňujú, ale nie sú tým obmedzené, leukemické bunky, bunky, obsahujúce vírus, a bunky, obsahujúce parazity. Medzi cieľové bunky patria bunky, ktoré prechádzajú rýchlym delením v porovnaní s necieľovými bunkami. Výraz "cieľové bunky" tiež zahrňuje, ale nie je tým obmedzený, mikroorganizmy, ako sú baktérie, vírusy, parazity a iné infekčné činidlá. Výraz "cieľové bunky" tak nie je obmedzený na žijúce bunky, ale zahrňuje tiež infekčné častice ako sú vírusy.

"Necieľové bunky" sú všetky bunky intaktného živočícha, ktoré nie sú zamýšľané pre to, aby boli poškodené alebo zničené liečebnou metódou. Tieto necieľové bunky zahrňujú, ale nie sú tak obmedzené, zdravé krvné bunky, normálne bunky krvného riečiska, podrobené ožiareniu, bunky tkaniva pod alebo nad krvným riečiskom podrobené ožiareniu.

"Zničenie" tu znamená usmrtenie cieľovej bunky. "Poškodenie" znamená zmenu cieľovej bunky takým spôsobom, ktorý sa dotýka jej funkcie. Napríklad North a spol. pozorovali, že po vystavení BPD-ošetrených, vírusom infikovaných T buniek svetlu, sa objavujú v T bunkovej membráne otvory, ktorých veľkosť sa zväčšovala, až bola membrána celkom rozložená (Blood Cells 18:129-40, 1992). Cieľové bunky prechádzajú poškodením alebo zničením i keď sú cieľové bunky okamžite vystavené makrofágom.

"Fotosenzitívne činidlo" je chemická zlúčenina, ktorá sa usadí v jednom alebo viacerých typoch vybraných cieľových buniek a, ak je vystavená ožiareniu, absorbuje svetlo, čím dochádza k poškodeniu alebo deštrukcii cieľových buniek.

Vlastne môže byť akákoľvek zlúčenina, ktorá sa usadí vo zvolenom cieli a absorbuje svetlo, použitá v predloženom vynáleze. Výhodne je chemickou zlúčeninou zlúčenina netoxická pre živočícha, ktorému je podávaná, alebo je schopná byť upravená do netoxického prípravku. Výhodne je chemická zlúčenina vo svojej fotodegradovanej forme tiež netoxická. Zoznam takýchto fotosenzitívnych chemikálií je možné nájsť v práci Kreimera-Birnbauma, Sem.Hematol. 26:157-73, 1989. Fotosenzitívne zlúčeniny zahrňujú, ale nie sú tak obmedzené, chloríny, bakteriochloríny, ftalokyaníny, porfyríny, purpuríny, merokyaníny, psoralény a prekurzory liečiv ako je kyselina delta-aminolevulová, ktoré produkujú liečivá ako je protoporfyrín. Preferované sú benzoporfyrínové deriváty /BPD/ a porfimer-sodík. Najvýhodnejší je benzoporfyrínový derivát monokyselinového kruhu A "benzoporphyrine derivative monoacid ring A" (BPD-MA).

"Ožiarenie", ako je tu uvedené, zahrňuje všetky vlnové dĺžky. Výhodne je vlnová dĺžka ožiarenia vybraná tak, že je to vlnová dĺžka (vlnové dĺžky), ktoré excituje fotosenzitívna zlúčenina. Výhodnejšie je vlnová dĺžka ožiarenia vlnovou dĺžkou pôsobiacou excitáciu fotosenzitívnej zlúčeniny a má malú absorpciu necieľovými bunkami a zbytkom intaktného živočícha, včítane krvných proteínov. Napríklad je preferovanou vlnovou dĺžkou pre BPD-MA rozmedzie 600 až 900 nm.

Ožiarenie je ďalej definované v tomto vynáleze svojou intenzitou, trvaním a načasovaním s ohľadom na dávkovanie fotosenzitívneho činidla. Intenzita musí byť postačujúca pre to, aby ožiarenie penetrovalo kožou a dosiahlo krvné cieľové bunky. Trvanie musí byť postačujúce pre fotoaktiváciu fotosenzitívneho činidla tak, aby pôsobilo v cieľových bunkách. Ako intenzita, tak trvanie musia byť obmedzené, aby sa zabránilo nadmernému ošetreniu živočícha. Načasovanie s ohľadom na dávkovanie fotosenzitívneho činidla je dôležité, pretože 1) podávané fotosenzitívne činidlo vyžaduje určitú dobu pre to,

aby sa usadilo v cieľových bunkách a 2) hladina mnohých fotosenzitívnych činidiel v krvi sa rýchlo znižuje v závislosti na čase.

Tento vynález poskytuje spôsob ošetrenia živočíchov, ktorý zahrňuje, ale nie je tým obmedzený, ľudí a iných cicavcov. Výraz "cicavce" tiež zahrňuje poľnohospodárske zvieratá ako sú kravy, ošípané a ovce, ako aj domácich miláčikov alebo športové zvieratá ako sú kone, psi a mačky.

"Intaktným živočíchom" je mienené, že celý, nedelený živočích je schopný byť vystavený ožiareniu. Žiadna časť živočícha nie je odstránená pre separátne ožiarenie, na rozdiel od fotoforézy, v ktorej krv cirkuluje mimo jeho tela preto, aby bola vystavená ožiareniu. Celý živočích nemusí byť vystavený ožiareniu. Iba časť intaktného živočícha môže alebo musí byť vystavená ožiareniu. Prakticky povedané, môže byť preferované ožiarenie plôch s krvnými riečiskom tesne pod povrchom pre selektívne ožiarenie.

"Transkutánne" ako je tu použité, znamená cez kožu /kožou/ živočícha.

Stručne vyjadrené je fotosenzitívne činidlo všeobecne podávané živočíchovi pred tým, než je tento podrobený ožiareniu.

Preferované fotosenzitívne činidlá zahrňujú, ale nie sú tým obmedzené, chloríny, bakteriochloríny, ftalokyaníny, porfyríny, purpuríny, merokyaníny, psoralény a prekurzory liečiv ako je delta-aminolevulová kyselina, ktoré produkujú liečivá ako je protoporfyrín. Preferovanejšie sú benzoporfyrínové deriváty /BPD/ a porfimer-sodík. Najpreferovanejší je benzoporfyrínový derivát monokyselinového kruhu A (BPD-MA).

Fotosenzitívne činidlo je podávané lokálne alebo systémo-

vo. Fotosenzitívne činidlo je podávané orálne alebo injekciou, ktorá môže byť intravenózna, subkutánna, intramuskulárna alebo intraperitoneálna. Fotosenzitívne činidlo tiež môže byť podané enterálne alebo topicky cez náplaste alebo implantáty.

Fotosenzitívne činidlo môže byť syntetizované ako dimér, aby absorbovalo viacej svetla na mólovej báze. Fotosenzitívne činidlo môže tiež byť konjugované ku špecifickým ligandom reagujúcim s cieľom, ako sú receptorové ligandy alebo imunoglobulíny alebo imunošpecifické časti imunoglobulínov, čo im umožňuje, aby boli viac koncentrované v požadovanej cieľovej bunke alebo mikroorganizme. Táto konjugácia môže umožniť zníženie požadovanej dávkovej hladiny, pretože materiál je selektívnejšie cielený a má menšie straty pri distribúcii do iných tkanív, ktorých deštrukciu je nutné vylúčiť.

Fotosenzitívne činidlo môže byť podávané v suchom prípravku, ako sú piluly, kapsle, čapíky alebo náplaste. Fotosenzitívne činidlo tiež môže byť podané v kvapalných prípravkoch, buď samotné s vodou, alebo farmaceuticky prijateľnými prísadami, ako sú opísané v Remington s Pharmaceutical Sciences. Kvapalný prípravok môže byť tiež suspenzia alebo emulzia. Najviac sú žiadúce lipozomálne alebo lipofilné prípravky. Ak sú ako suspenzie alebo emulzie, zahrňujú vhodné prísady vodu, salinický roztok, dextrózu, glycerín a podobne. Tieto prípravky môžu obsahovať malé množstvá netoxických pomocných substancií ako sú zmáčacie alebo emulgačné činidlá, antioxidanty, pH pufrovacie činidlá a podobne.

Dávka fotosenzitívneho činidla sa bude meniť s cieľovými bunkami, optimálnou hladinou v krvi a načasovaním ožiarenia. Podľa použitého fotosenzitívneho činidla sa stanoví zodpovedajúca optimálna terapeutická hladina. Výhodne sa dávka vypočíta tak, aby bola dosiahnutá hladina v krvi asi 0,01 až 100 µg/ml. Výhodne bude dávka poskytovať krvnú hladinu medzi asi 0,01 a 10 µg/ml. Ak je fotosenzitívnym činidlom BPD-MA, je

krvná hladina výhodne medzi asi 0,01 a 4 µg/ml. Výhodnejšie je BPD-MA krvná hladina udržovaná na asi 0,01 až 2 µg/ml.

Intenzita ožiarenia v krvnom prúde je výhodne medzi asi 2 a 150 $mW/cm^2$. Výhodnejšia je intenzita ožiarenia v krvnom prúde medzi asi 15 a 70 $mW/cm^2$.

Doba trvania ožarovania je výhodne medzi asi 0,25 min a 24 hodinami. Výhodnejšie trvá ožarovanie medzi asi 0,25 min a 6 hodinami. Najvýhodnejšie trvá ožarovanie medzi asi 0,25 min a 2 hodinami.

Bez akéhokoľvek obmedzovania teóriou vynálezca predpokladá, že BPD môžu byť v podstate fotoaktivované v krvi v relatívne krátkej dobe a bez nadbytočnej toxicity. Terapeutická voľba sa tak javí byť vymedzená dávkou BPD a dávkou ožiarenia. Tvorba fotodegradačných produktov BPD bola použitá ako indikátor fotoaktivácie. Fotoaktivácia BPD bola postulovaná vyvolaním tvorby radikálového kyslíka, ktorý má cytotoxický účinok. Z hľadiska problémov spojených s buď extrakorporálnym ošetrením krvi alebo s intravenóznou svetelnou aktiváciou pomocou optických vlákien, sa javí uvedené ožiarenie celého tela v "lôžku červeného svetla" u pacientov injektovaných BPD ako atraktívne riešenie pre liečbu infekčných činidiel v krvi.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1A predstavuje spektrum svetla dodávaného zo svetelného zdroja, a obr. 1B predstavuje spektrum svetla, ktoré aktivuje BPD.

Obr. 2 predstavuje koncentráciu BPD v myšej plazme v rôznych časoch po injekcii lipozomálneho BPD v dávke 20 µg/myš (0,9 mg/kg).

Obr. 3 predstavuje koncentráciu BPD v myšej plazme v rôznych časoch po injekcii lipozomálneho BPD v dávke 20 µg/myš (0,9 mg/kg) na myš vystavenú svetlu a kontrolnú myš udržovanú v tme.

Obr. 4 predstavuje *in vitro* fotodegradáciu BPD /1 µg/ml) v myšej krvi vystavenej svetlu počas rôznej doby.

Obr. 5 predstavuje percentuálne grafické vyjadrenie BPD fotodegradovaného v myšej krvi *in vivo* a *in vitro* vystavením svetlu v porovnaní s nevystavenou krvou.

Obr. 6 je grafickým znázornením (µg/ml) BPD fotodegradovaného v myšej krvi vystavenej červenému svetlu /600 až 900 nm/ *in vitro* a *in vivo* /ožiarenie celého tela/ v porovnaní s nevystavenou krvou.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklady, ktoré nasledujú, sú mienené ako dokladujúce účinnosť vynálezu a pre priblíženie praktického uskutočnenia vynálezu. Nasledujúce príklady uvádzajú jedno z fotosenzitívnych činidiel a poskytujú prostriedky pre vyhľadávanie iných fotosenzitívnych činidiel alebo nových zlúčenín pre použitie v spôsobe podľa vynálezu. Nasledujúce príklady sú mienené iba ako príklady a v žiadnom prípade predložený vynález nijako neobmedzujú.

Všeobecná poznámka

Nasledujúce všeobecné poznámky, týkajúce sa materiálov a postupov, sú aplikované v príkladoch 1 až 4, pokiaľ nie je uvedené inak.

Materiály

BPD-MA bol syntetizovaný ako je opísané v US patente č. 4,920,143 a 4,883,790. BPD-MA bol získaný od QuadraLogic Technologies, Inc. a uchovávaný rozpustený v DMSO /4,5 mg/ml/ pri -70 °C. Lipozomálny BPD /4,95 mg/ml/ bol pripravený ako je opísané v US patentovej prihláške č. 07/832542, podanej 5.februára 1992.
Bolo použité nasledujúce zloženie:

| Zložka | Množstvo |
|---|---|
| BPD-MA | 4,95 |
| dimyristoyl-fosfatidyl cholín | 23,27 |
| vaječný fosfatidyl glycerol | 16,09 |
| laktóza alebo trehalóza | 148,50 |
| askorbylpalmitát | 0,05 |
| butylovaný hydroxytoluén | 0,005 |
| voda pre injekcie | q.s. |

Lipozomálny BPD bol sušený a uchovávaný zmrazený pri -20 °C po 1 ml podieloch. Vhodný počet podielov bol roztopený bezprostredne pred použitím a zriedený 5 % dextrózou vo vode pre injekcie pre živočíchy.

V týchto pokusoch boli použití samci myší Balb/c /7-11 týždňov starí, Charles River, Kanada/, pokiaľ nie je uvedené inak. Myši Balb/c boli zvolené pre tieto štúdie, pretože nemajú na svojej koži pigment. Oholenie a depilačné odstránenie chlpov je veľmi účinné po celom tele s výnimkou hlavy. Potom sa koža myší javí ako transparentná. Vnútorné orgány, predovšetkým tmavočervené orgány ako sú pečeň a slezina, sú kožou viditeľné. Myši boli oholené a zbavené chĺpkov komerčne dostupným depilátorom /Neet$^{R}$ alebo Nair$^{R}$/ 5 dní pred tým, než boli použité v týchto experimentoch. Kontrolné myši, injekto-

vané BPD, ale nevystavené svetlu, neboli oholené. Po injekcii boli myši udržované v tme počas rôzne dlhej doby, ako je uvedené ďalej.Pred a po pokusoch boli myši udržované v ustajnení s 12 hodinami svetla a 12 hodinami tmy. Po pokusoch, za účelom zníženia množstva svetla, dopadajúceho na myš, boli ich klietky umiestnené čo najnižšie a prikryté hliníkovou fóliou.

Svetelný box bol vyrobený v dielňach University of British Columbia. Bol zložený z dvoch vrstiev 14 75 W reflektorov volfrám-halogén /General Electric/, ktoré osvetľujú ošetrovanú plochu zhora a zospodu. Svetlo bolo filtrované 1/ sadou filtrov, obsahujúcich žlté a červené plastové fólie, ktoré absorbujú väčšinu svetla s vlnovými dĺžkami kratšími než 600 nm a 2/ 15 mm silnými vodnými filtrami, ktoré absorbujú svetlo nad 900 nm. Chladenie bolo uskutočňované trvalým prietokom studenej vody vo vodných filtroch a usporiadaním 5 ventilátorov. Svetelná intenzita bola meraná na prístroji IL 1350 Photometer /International Light/.

Svetelné spektrum dodávané zo svetelného boxu je uvedené na obr. 1. Pre porovnanie je absorpčné spektrum BPD uvedené na obr. 1B. Zhruba 1/3 dodávaného svetla bola v rozsahu spektra, aktivujúceho BPD.

Intenzita svetla dodávaného vrchnými a spodnými sadami žiaroviek nebola jednotná. Spodná časť dodávala 33 až 40 $mW/cm^2$ merané v hladine podlahy ožarovanej komôrky, zatiaľ čo horná sada dodávala 27 až 33 $mW/cm^2$ merané na povrchu kože chrbáta zvierat. Uvedený rozsah vznikol z nekonzistentného ovplyvňovania v horizontálnej rovine ožarovania. Navyše sa myši pohybujú počas ožarovania svetlom, takže rôzne časti ich tela sú ožarované rôznymi dávkami svetla. Preto dávky dodávané na povrch kože myší musia byť aproximované a výpočty boli založené na intenzite 30 $mW/cm^2$.

Postupy

Krvné testy:

Krv bola odobraná do striekačiek, obsahujúcich 50 µl heparínu /1000 jednotiek/ml salinického roztoku/. Krvné vzorky /0,45 ml/ od najmenej 1 myši na časový bod, boli zaslané do diagnostického laboratória University Hospital, University of British Columbia, na analýzu pomocou Coulter Counter. Krvná morfológia bola stanovená na krvných filmoch pripravených zo zvolených vzoriek laborantom.

Stanovenie koncentrácie BPD v plazme:

Vzorky plazmy boli získané odstredením krvi odobranej myšiam a boli uložené zmrazené na -20 °C do použitia. Koncentrácia BPD vo vzorkách bola stanovená fluorometricky s použitím spektrofluorometra Jasco Model FP-77 /Japan Spectroscopic Co./ a mikrokyvety /Far UV Quartz Cell, Starna Cells Inc./. Excitačné a emisné vlnové dĺžky sú 439 a 699 nm. Vzorky plazmy boli zriedené 20 násobne s PBS obsahujúcim 1% Tritonu$^{R}$ X-100 bezprostredne pred stanovením fluorescencie. BPD štandardy boli pripravené v 5% myšej plazme v PBS s 1% Tritonu $^{R}$ X-100. Za týchto podmienok bol vzťah medzi koncentráciou BPD a jednotkami fluorescencie lineárny /korelačný koeficient > 0,99/ pre koncentrácie medzi 0,1 ng/ml a 1 µg/ml. Hranica stanovenia bola pod 0,1 ng/ml vzorky, čo zodpovedá 2 ng/ml plazmy. Maximálna plazmová autofluorescencia bola pozorovaná pri 520 nm. 699 nm fluorescenčný pík BPD bol vlastne zbavený akejkoľvek interferencie.

Príklad 1

Testy fotosenzitivity kože

Šesť Balb/c myší /22+1 g hmotnosť/ bolo pripravených ako je opísané vyššie. Päť myší bolo dvakrát injektovaných /24 hodinový interval/ BPD z DMSO zásobného roztoku /nelipozomálny BPD/ a vystavených svetlu po dobu 1 hodiny po injekcii. Jedna myš nebola injektovaná, ale bola vystavená svetlu /kontrola - iba svetlo/. Počas prvého ošetrenia boli myši injektované 15 µg BPD/myš v 200 µl PBS. Počas druhého ošetrenia boli myši injektované 20 µg BPD/myš /0,9 mg/kg/. Jedna myš bola použitá ako kontrola v oboch ošetreniach.

Ihneď po injekcii /v oboch prípadoch/ boli zvieratá udržované 1 hodinu vo tme a potom boli umiestnené do individuálnych plastových kontajnerov /9 x 4 x 5 cm/, ktoré boli umiestnené vo svetelnom boxe a vystavené svetlu. Jednotlivo boli myši odstraňované zo svetelného boxu v rôznych intervaloch: 15, 30, 45, 60 a 75 min. Svetelné dávky dodané na povrch kože boli 27, 54,81, 108 a 135 $J/cm^2$.V druhom prípade boli použité rovnaké svetelné dávky, avšak myši, ktoré dostali vyššie svetelné dávky prvý deň, dostali nižšie dávky druhý deň. Kontrolná myš bola vystavená svetlu po dobu 60 min v oboch prípadoch. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 1. Počas vystavenia svetlu boli myši nepretržite pozorované z hľadiska prejavov nepohodlia alebo svrbenia. Po druhom vystavení svetlu bola u myší pozorovaná denne po dobu 2 týždňov pokožka a správanie sa.

Dva týždne po ošetrení boli získané vzorky krvi srdečnou punktúrou pri anestézii halotanom. Potom boli myši usmrtené a bola uskutočnená autopsia. Ich slezina, pečeň a ľadviny boli zvážené.

BPD-injektované myši dostali všetky dávky svetla /27, 54, 81, 108 a 135 $J/cm^2$/ a opakované ošetrenie taktiež. Oba dni ošetrenia sa chovali normálne za svetla, bez známok nepohodlia, s výnimkou občasného škrabania sa, ktoré mohlo byť spôsobené pôsobením liečiva na kožu. Neboli pozorované žiadne

veľké zmeny na myšej koži ani ihneď po vystavení alebo počas nasledujúcej dvojtýždennej periódy. Neboli takisto pozorované žiadne zmeny v správaní sa. S prekvapením myš, ktorá vykazovala známky nepohodlia vo forme otáčania a škrabania sa, bola myš zo svetelnej kontroly. Preto bola udržovaná iba 60 min na svetle /nie 75 min ako bolo pôvodne zamýšľané/.

Počet myší bol príliš malý pre urobenie definitívnych záverov pokiaľ ide o vplyv liečby na vnútorné orgány ako sú pečeň, slezina a ľadviny, predsa však v testovanej skupine, ktorá bola skúšaná 2 týždne po dvojitom ošetrení, boli morfológia rastu a hmotnosti normálne.Hmotnosť celého tela a zodpovedajúce hmotnosti orgánov sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 3 predstavuje parametre myšej krvi dva týždne po ošetrení, zahrňujúce počet bielych krviniek /WBC/, počet červených krviniek /RBC/, hemoglobín /HB/, hematokryt /Hct/, priemerný korpuskulárny objem /MCV/ a počet doštičiek /PLT/. Morfológia červených krviniek, stanovená 2 týždne po ošetrení, je uvedená v tabuľke 4. Všetky hodnoty sú v normálnom rozsahu. Agregácia doštičiek bola pričítaná o niečo nižšiemu počtu doštičiek a vyššiemu počtu WBC.

Tabuľka 1

| | Deň 1 (15 µg/myš 0.68 mg/kg) | | Deň 2 (20 µg/myš 0.9 mg/kg) | |
|---|---|---|---|---|
| Myš č. | BPD mg/kg | Svetlo $J/cm^2$ | BPD mg/kg | Svetlo $J/cm^2$ |
| 1 | 0,75 | 27 | 1,0 | 135 |
| 2 | 0,71 | 54 | 0,95 | 108 |
| 3 | 0,71 | 81 | 0,95 | 81 |
| 4 | 0,63 | 108 | 0,87 | 54 |
| 5 | 0,71 | 135 | 0,95 | 27 |
| 6 | 0 | 108 | 0 | 108 |

Tabuľka 2

| Myš | Hmotnosť (g) celková hmotnosť | pečeň | slezina | ľadviny |
|---|---|---|---|---|
| | 22 | 1,105 | 0,077 | 0,172(1) |
| | 23 | 1,190 | 0,106 | 0,343 |
| Liek + | 24 | 1,208 | 0,094 | 0,380 |
| svetlo | 25 | 1,348 | 0,108 | 0,396 |
| | 21 | 0,958 | 0,078 | 0,310 |
| Iba | | | | |
| Svetlo | 22 | 1,125 | 0,05 | 0,371 |

Tabuľka 3

| Myš č. | WBC $10^6$/ml | RBC $10^9$/ml | HB g/l | Hct | MCV fl | PLT $10^6$/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4,0 | 7,11 | 122 | 0,352 | 49,5 | 328 |
| 2 | 14,7* | 7,76 | 126 | 0,382 | 49,2 | 274 |
| 3 | 8,2 | 7,46 | 124 | 0,365 | 48,9 | 119 |
| 4 | 7,6 | 7,65 | 123 | 0,364 | 47,6 | 438 |
| 5** | 2,9 | 6,47 | 108 | 0,316 | 48,8 | 134 |
| 6*** | 5,3 | 5,97 | 109 | 0,297 | 49,8 | 388 |

* k tomuto číslu môže byť priradená doštičková agregácia

** krv bola zriedená dvojnásobným objemom heparínu

*** kontrola - iba svetlo

Tabuľka 4

| Myš č. | % WBC granulocyty | lymfocyty | monocyty |
|---|---|---|---|
| 1 | 9 | 90 | 1 |
| 2 | 11 | 88 | 1 |
| 3 | 19 | 78 | 3 |
| 4 | 36 | 62 | 2 |
| 5 | 7 | 92 | 1 |
| normálny (rozsah) | 12-15 | 65-85 | N/A |

Príklad 2

Farmakokinetické (PK) štúdie

Za účelom stanovenia hladiny BPD v plazme počas ošetrenia svetlom, bol uskutočnený nasledujúci pokus. Štrnásť myší Balb/c (22 ± 1 g hmotnosti) bolo injektovaných lipozomálnym BPD v dávke 20 µg/myš /0,9 mg/kg/ v 200 µl PBS na myš. Vzorky krvi boli získané srdečnou punktúrou v rôznych časových intervaloch medzi 15 min a 2 hodinami po injekcii. Vystavenie svetlu začalo 15 min po injekcii u niektorých myší. BPD koncentrácia v plazme bola stanovená ako je opísané vyššie. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 5 a obr. 2.

Tieto údaje boli použité pre test účinnosti načasovania vystavenia svetlu. 2 hodiny po injekcii tj. v dobe zodpovedajúcej koncu 1 hodiny vystavenia svetlu /108 J/cm$^2$/ v prvom príklade, bola hladina BPD v plazme 2,44 µg/ml. Na začiatku vystavenia svetlu v rovnakom príklade bola hladina BPD asi 4 µg/ml. Pre ďalšie hodnotenie fotosenzitivity v týchto níz-

kych hladinách boli myši vystavené svetlu v čo najkratšej dobe po injekcii, tj. asi po 15 min, keď hladina BPD v plazme bola 6,32 µg/ml. Avšak myši, ktoré boli vystavené svetlu po 15 min boli väčšinou nespokojné a uhynuli po 30 min od vystavenia /54 $J/cm^2$/. Toto naznačuje, že počiatočná hladina BPD v plazme asi 6,5 µg/ml a svetelné vystavenie asi 50 $J/cm^2$ ožiarením celého tela boli pre myši letálne. Predsa však ako je demonštrované v príklade 1, ak sú hladiny v plazme nižšie, je rovnaká svetelná dávka zrejme neškodná.

Tabuľka 5

| Myš č. | Dávka BPD mg/kg | Doba po injekcii | Konc.v plazme µg/ml |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,87 | 15 min | 6,32 |
| 2 | 0,83 | 20 min | 4,68 |
| 3 | 0,95 | 1 h 23 min | 3,26 |
| 4 | 0,91 | 1 h 24 min | 2,92 |
| 5 | 0,91 | 1 h 32 min | 2,98 |
| 6 | 0,87 | 1 h 38 min | 1,80 |
| 7 | 0,87 | 1 h 42 min | 3,22 |
| 8 | 0,83 | 2 h 5 min | 2,44 |

Príklad 3

Transkutánna aktivácia BPD

Štrnásť myší bolo použitých (hmotnosť 22 ± 1 g) v tejto štúdii. Dvanásť myší bolo injektovaných 20 µg /0,9 mg/kg/ lipozomálneho BPD /v 200 µl/ a udržovaných v tme 1 hodinu pred vystavením svetlu. Každá myš bola vystavená svetlu na 30 min, 1 h alebo 1,5 hodiny, ktoré dodávalo svetelné dávky na povrch

kože 54, 108 a 162 J/cm$^2$. Ihneď po vystavení svetlu boli odobrané vzorky krvi. V zodpovedajúcich časoch boli odobrané vzorky krvi od dvoch myší injektovaných BPD, ale nevystavených svetlu. Dve ďalšie myši boli testované jednu hodinu po injekcii.

Cieľom tejto štúdie bolo stanoviť svetelnú penetráciu do tkanív pre aktiváciu BPD. Bolo zistené, že podstatná fotodegradácia BPD v krvi by mala predstavovať podstatnú aktiváciu BPD.

Koncentrácia BPD v plazme potom bola stanovená fluorescenčne. Koncentrácia nezmeneného BPD v plazme vystavenej a nevystavenej kontrolnej myši boli porovnané. Výsledky /tabuľka 6 a obr. 3/ ukazujú, že 36 až 76 % BPD bolo fotodegradovaných svetelnými dávkami 54 až 162 J/cm$^2$. Takýto rozsah fotodegradácie naznačuje, že svetlo dostatočne penetruje tkanivom a aktivuje a tým degraduje BPD v krvných cievach. Dôležité je, že tieto vystavenia svetlu a dávkam liečiva nespôsobujú citlivosť kože na svetlo, čo potvrdzuje bezpečnosť zistenú v príklade 1. Naviac neboli pozorované žiadne akútne vplyvy na krvné parametre /tabuľka 7/.

Tabuľka 6

| Skupina | Svetelná dávka J/cm$^2$ | Doba po injekcii | BPD v plazme µg/ml | Priemer ±SD | Fotodegradácia BPD (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1,428 | | |
| 0 h - C | 0 | 1 h | 1,058 | 1,243 ± 0,262 | - |
| 30 min | | | 0,618 | | |
| - C | 0 | 1,5 h | 1,242 | 0,930 ± 0,441 | - |
| | | | 0,646 | | |
| 1 h - C | 0 | 2 h | 1,242 | 0,944 ± 0,421 | - |
| 1,5 h | | | 0,724 | | |
| - C | 0 | 2,5 h | 0,656 | 0,690 ± 0,048 | - |
| | | | 0,566 | | |
| 30 min | 54 | 1,5 h | 0,626 | 0,596 ± 0,042 | 36 |
| | | | 0,258 | | |
| 1 h | 108 | 2 h | 0,344 | 0,301 ± 0,061 | 68 |
| | | | 0,191 | | |
| 1,5 h | 162 | 2,5 h | 0,145 | 0,168 ± 0,033 | 76 |

Tabuľka 7

| BPD mg/kg | Svetlo J/cm2 | Doba po injekcii | Krvné parametre | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | WBC $10^6$/ml | RBC $10^9$/ml | HB g/l | Hct | MCV fl | PLT $10^6$/ml |
| 0 | 0 | - | 4,5 | 6,58 | 113 | 0,326 | 49,5 | 417 |
| 0 | 0 | - | 2,3 | 7,53 | 127 | 0,370 | 49,1 | 399 |
| 0 | 0 | - | 6,0 | 7,61 | 132 | 0,378 | 49,7 | 498 |
| 0 | 0 | - | 7,3 | 7,64 | 133 | 0,382 | 50,0 | 613 |
| 0,87 | 0 | 1h | 5,5 | 7,61 | 124 | 0,368 | 48,4 | 608 |
| 0,87 | 0 | 1,5 h | 4,4 | 6,77 | 117 | 0,329 | 48,7 | 428 |
| 0,93 | 0 | 2 h | 11,4 | 7,79 | 129 | 0,382 | 49,1 | 475 |
| 0,87 | 0 | 2,5 h | 3,9 | 7,68 | 129 | 0,372 | 48,5 | 447 |
| 0,95 | 54 | 1,5 h | 7,0 | 7,28 | 127 | 0,363 | 49,9 | 613 |
| 0,95 | 108 | 2 h | 8,5 | 7,53 | 131 | 0,378 | 50,1 | 440 |
| 0,93 | 162 | 2,5 h | 4,9 | 7,17 | 116 | 0,353 | 49,2 | 506 |

Údaje získané v tomto príklade boli porovnané s údajmi, ktoré boli predtým publikované v štúdiách /Photochem. Photobiol.(1991)53/ po prepočte svetelnej dozimetrie na rovnaký fotometer, ktorý bol použitý v predloženej štúdii. V predtým publikovaných štúdiách boli myši DBA/2 /oholené a zbavené chlpov/ injektované 4 mg/kg a boli vystavené lokálne 153 $J/cm^2$ širokospektrálneho svetla /intenzita 170 $mW/cm^2$/ 3 hodiny po injekcii. Extrapoláciou z obr.2 bol získaný výsledok maxima koncentrácie v plazme po 3 hodinách /začiatok 30 min od vystavenia svetlu/ 2,987+0,312 /SD/ µg/ml. Výsledkom je, že i keď neboli pozorované ihneď po vystavení na koži žiadne zmeny,počas prvých 24 hodín po vystavení, sa u myší vyvinulo niekoľko kožných nekróz, ktoré sa rozvíjali počas 96 hodín a nasledovala perióda uzdravovania. Prípadné rany sa zahojili a znovu narástli chlpy.

V predloženej štúdii koncentrácie BPD v plazme na začiatku vystavenia svetlu boli nad 3 µg/ml a ešte nebola pozorovaná žiadna zmena na koži ani bezprostredne ani počas 2 týždňov po vystavení. Rozdiely medzi predchádzajúcimi a súčasnými štúdiami zahrňujú 1/vyššiu maximálnu koncentráciu v plazme vďaka vyššej dávke BPD /4 mg/kg oproti 0,9 mg/kg/, 2/ dlhšiu dobu medzi injekciou a vystavením svetlu /3 hodiny oproti 1 hodine/, čo umožňuje akumuláciu BPD v koži /BPD sa zjavne akumuluje v koži až do 5 hodín/ a 3/ vyššiu intenzitu svetla (170 $mW/cm^2$ oproti 30 $mW/cm^2$). Tieto hodnoty potvrdzujú, že všetky tieto faktory musia byť zahrnuté v definícii terapeutického okna pre ožiarenie celého tela.

Príklad 4

In vitro aktivácia BPD v myšej krvi

Za účelom vyhodnotenia množstva svetla penetrujúceho tkanivami, boli uskutočnené *in vitro* pokusy s myšou krvou.Bol

použitý rovnaký svetelný zdroj, preto bolo spektrum svetla rovnaké. Svetelné dávky boli v tomto pokuse zvolené tak, že napodobňovali dávky v pokusoch *in vivo*.

Lipozomálny BPD bol pridaný k čerstvo získanej heparinizovanej myšej krvi tak, aby bola dosiahnutá koncentrácia 1 µg/ml, a potom boli odobrané podiely 0,85 µl do Petriho misiek s priemerom 35 mm. Misky boli umiestnené do svetelného boxu a vystavené červenému svetlu. Misky boli ožarované vo svetelnom boxe iba zdola. Tri rôzne svetelné dávky, s vystavením 30 min, 1 h a 1,5 h, boli 63, 126 a 189 J/cm2. Duplikáty misiek boli prikryté hliníkovou fóliou. Ihneď po svetelnom vystavení bola krv z misiek odobraná. Potom bola plazma oddelená odstredením. Kontrolné nevystavené vzorky boli spracované v rovnakých časoch ako vzorky vystavené svetlu.

Koncentrácia BPD v plazme oddelenej z krvi vystavenej svetlu a krvi nevystavenej, bola stanovená fluorescenciou. Výsledky sú uvedené v tabuľke 8 a na obr. 4. Asi 51 až 83 % BPD bolo degradovaných v rozmedzí použitej svetelnej dávky.

Rozsah fotodegradácie *in vitro* BPD bol porovnaný s *in vivo* degradáciou pre vyhodnotenie množstva svetla aktuálne penetrujúceho tkanivami a dosahujúceho BPD v krvnom riečisku. Ak množstvá forodegradovaného BPD v oboch pokusoch sú vyjadrené ako percentá degradácie vo vzťahu k množstvu nezmeneného BPD prítomného v plazme za neprítomnosti svetla, sú percentá stanovené *in vitro* a *in vivo* relatívne rovnaké /tabuľka 9, obr. 5/. Avšak ak sa množstvo degradovaného BPD vyjadrí ako µg fotodegradovaného BPD na ml plazmy, porovnaním sa zistí, že asi 65 % svetelnej dávky dodanej na povrch kože *in vivo* dosiahlo aktuálne BPD v krvnom riečisku /tabuľka 9, obr. 6/.

Tabuľka 8

| Čas | Svetelná dávka $J/cm^2$ | BPD dávka µg/ml | Fotodegradovaný BPD % |
|---|---|---|---|
| 0 h | 0 | 0,760 | - |
| 0,5 h | 0 | 0,806 | - |
| 0,5 h | 63 | 0,394 | 51 % |
| 1 h | 0 | 0,810 | - |
| 1 h | 126 | 0,220 | 73 % |
| 1,5 h | 0 | 0,830 | - |
| 1,5 h | 189 | 0,144 | 83 % |

Tabuľka 9

| IN VITRO | | | IN VIVO | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Svetlo ($J/cm^2$) | Fotodegradácia % | Dávka µg/ml | Svetlo ($J/cm^2$) | Fotodegradácia % | Dávka µg/ml |
| 63 | 51 | 0,412 | 54 | 36 | 0,334 |
| 126 | 73 | 0,590 | 108 | 68 | 0,643 (?) |
| 189 | 83 | 0,686 | 162 | 76 | 0,522 |

Za účelom stanovenia hladiny BPD v plazme počas ošetrenia svetlOm, bol uskutočnený nasledujúci pokus.

Výsledky predchádzajúcich pokusov naznačujú, že je tu terapeutické okno pre aktiváciu BPD v krvi prostredníctvom ožiarenia celého tela. Po vystavení myší červenému svetlu /600 až 900 nm/ po dobu 1 hodiny po injekcii BPD v dávke 0,9 mg/kg, v rozmedzí svetelnej dávky medzi 27 až 135 $J/cm^2$

/intenzita svetla na úrovni kože bola asi 30 $mW/cm^2$), nevykazovala myš žiadne znaky citlivosti kože na svetlo počas dvoch týždňov po ošetrení. Naviac nebola detegovaná žiadna toxicita počas pokusu u pečene, sleziny a ľadvín, alebo zmeny krvných parametrov ako bolo stanovené 2 týždne po ošetrení. Približné hladiny v plazme počas vystavenia svetlu boli medzi 2,5 a 4 µg/ml.

Najvyššia koncentrácia BPD v plazme /6,3 µg/ml ihneď po podaní) v kombinácii s 54 $J/cm^2$ svetla bola pre myš smrteľná. Vystavenie svetlu *in vivo* vedie ku 36 až 76 % fotodegradácii BPD v krvi. Porovnanie s *in vitro* fotodegradáciou BPD v myšej krvi indikuje, že približne 65 % dávky dodanej na povrch kože penetruje myším tkanivom a dosahuje BPD v krvnom riečisku. Porovnanie týchto údajov s predtým publikovanými štúdiami indikuje, že fotosenzitivita kože je determinovaná maximálnou koncentráciou v plazme, dobou vystavenia svetlu vzhľadom k injekcii a intenzitou svetla.

Príklad 5

Dospelé samce DBA/2 a Balb/c myší boli injektované intravenózne P815 a L1210 bunkami, preinkubovanými po 1 h s BPD /lipozomálnou/ v dávke 100 ng/ml. Bezprostredne pred injekciou bol do striekačky, obsahujúcej bunky pridaný ďalší BPD v množstve 2 µg. Koncentrácia potom je 1 µg BPD/ml myšej plazmy bezprostredne po injekcii /súčet celkového objemu myšej krvi je asi 2 ml/. Jedna skupina myší /oholená a zbavená chlpov/ bola vystavená ihneď červenému svetlu /600 až 900 nm/ vo svetelnom boxe po dobu 1,5 hodiny /162 $J/cm^2$/, ďalšia skupina bola udržovaná v tme ako kontrola.

Ihneď po vystavení svetlu boli odobrané krvné vzorky srdečnou punkciou za halotanovej anestézy. Koncentrácia BPD v plazme svetlu vystavených a kontrolných myší bola stanovená

fluorescenciou. Počet klonogénnych tumorových buniek v myšej krvi bol stanovený kultiváciou krvných vzoriek v kultivačnom médiu doplnenom s 10 % hovädzieho séra, za použitia protokolu obmedzeného riedenia. Po ošetrení boli myši ako z kontrolnej tak aj ošetrenej skupiny pozorované z hľadiska zmien na koži a celkového správania sa po dobu dvoch týždňov. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 10 a 11.

Tabuľka 10

Balb/c myši injektované L1210 bunkami
1 hodina s BPD lipozómami

| | BPD koncentrácia v plazme | |
|---|---|---|
| Ošetrenie | ng/ml | % |
| kontrola v tme | 126,45 | 100 % |
| vystavené svetlu | 52,23 | 41 % |
| Percentá fotodegradácie | | 59 % |

Prežívajúce bunky v krvi/priemer 3 myši/skupina/:
kontrola v tme: 234 L1210 bunky /2 ml krvi/myš
vystavené svetlu: 21 L1210 bunky/2 ml krvi/myš

Tabuľka 11

DBA/2 myši injektované P815 bunkami

| | BPD v plazme | |
|---|---|---|
| Ošetrenie | ng/ml | % |
| Kontrola v tme | 94,09 | 100 % |
| Vystavené svetlu | 58,14 | 62 % |
| Percentá fotodegradácie | | 38 % |

Prežívajúce bunky v krvi/priemer 3 myši/skupina/:
kontrola v tme: 50 P 815 bunky /2 ml krvi/myš
vystavené svetlu: 8 P815 bunky/2 ml krvi/myš

Výsledky z predchádzajúcich príkladov ukazujú, že ak sa celé telo vystaví červenému svetlu, po injekcii BPD, spôsobí aktiváciu BPD v krvi. Výsledkom je, že časť BPD je fotodegradovaná a súčasne bol zničený veľký počet BPD zaťažených tumorových buniek. Po ošetrení nebola pozorovaná ani citlivosť na svetlo u pokožky ani zmena v chovaní zvierat /maximálna doba pozorovania bola 2 týždne/. Výsledky naznačujú existenciu terapeutického okna, kde je možná terapeutická kontrola v krvi obsiahnutých infekčných činidiel, bez poškodenie krvného riečiska a kože.

Predložený vynález bol opísaný v opise a príkladoch. Ako je uvedené vyššie, sú príklady mienené iba ako príklady a v žiadnom smere predložený vynález nijako neobmedzujú. Ďalej odborník po preštudovaní opisu a nárokov, ktoré nasledujú, bude schopný posúdiť skutočnosť, že v rozsahu nárokov sú možné ekvivalenty. Prípadné ekvivalenty riešenia spadajú taktiež do rozsahu predloženého vynálezu.

# P A T E N T O V É  N Á R O K Y

1. Spôsob zničenia alebo poškodenia cieľových buniek, ktoré selektívne akumulujú fotoaktívne činidlo, kde cieľové bunky sú v krvnom prúde intaktného živočícha, pričom krvný prúd a živočích ďalej obsahujú necieľové bunky, **vyznačujúci sa tým,** že zahrňuje transkutánne ožiarenie aspoň časti uvedeného intaktného živočícha intenzitou účinnou pre poškodenie alebo zničenie selektívne cieľových buniek, ponechanie necieľových buniek relatívne nepoškodených, a tým zničenie alebo poškodenie uvedených cieľových buniek.

2. Spôsob zničenia alebo poškodenia cieľových buniek v krvi živočícha, **vyznačujúci sa tým,** že zahrňuje

   a/ podanie fotoaktívneho činidla v dávke takej, že uvedené cieľové bunky selektívne akumulujú uvedené činidlo a

   b/ ožiarenie aspoň časti uvedeného živočícha svetlom s intenzitou účinnou pre zničenie alebo poškodenie selektívne cieľových buniek, zatiaľ čo ostatné bunky zostávajú relatívne nepoškodené,

   a tým zničenie alebo poškodenie uvedených cieľových buniek.

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, **vyznačujúci sa tým,** že uvedené cieľové bunky sú aktivované bunky, ktoré sa rýchlo delia v porovnaní s necieľovými bunkami, alebo sú to bunky, obsahujúce vírus, bunky, obsahujúce parazity alebo mikroorganizmy a/alebo kde uvedeným fotoaktivačným činidlom je chlorín, bakteriochlorín, ftalokyanín, porfyrín, purpurín, merokyanín alebo psoralén.

4. Spôsob podľa nároku 3, **vyznačujúci sa tým,** že chlorínom je chlorín e6, porfyrínom je BPD alebo porfimer-sodík a/alebo cieľovými bunkami sú leukemické bunky.

5. Spôsob podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým,** že BPD je BPD-MA.

6. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým,** že ďalej zahrňje podanie prekurzoru liečiva intaktnému živočíchovi, kde tento prekurzor liečiva sa premieňa na fotoaktívne činidlo v živočíchovi.

7. Spôsob podľa nároku 6, **vyznačujúci sa tým,** že prekurzorom liečiva je kyselina delta-aminolevulová.

8. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, **vyznačujúci sa tým,** že živočíchom je cicavec.

9. Spôsob podľa nároku 8, **vyznačujúci sa tým,** že cicavcom je človek.

10. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, **vyznačujúci sa tým,** že fotoaktívne činidlo má koncentráciu v krvnom prúde 0,01 až 4 µg/ml a/alebo kde intenzita ožiarenia v krvnom prúde je 15 až 100 $mW/cm^2$.

11. Spôsob zničenia alebo poškodenia cieľových buniek v krvi živočícha, obsahujúcej uvedené cieľové bunky a necieľové bunky, **vyznačujúci sa tým,** že zahrňuje

a/ kontakt krvi s fotoaktívnym činidlom tak, že uvedené cieľové bunky selektívne akumulujú fotoaktívne činidlo a

b/ ožiarenie krvi cez kutánnu vrstvu svetlom s intenzitou účinnou pre poškodenie alebo zničenie selektívne cieľových buniek, zatiaľ čo ostatné bunky zostávajú relatívne nepoškodené,

čím sa zničia alebo poškodia uvedené cieľové bunky.

12. Spôsob podľa nároku 11, **vyznačujúci sa tým**, že uvedené cieľové bunky sú aktivované bunky, ktoré sa rýchlo delia v porovnaní s necieľovými bunkami, alebo sú to bunky, obsahujúce vírus, bunky obsahujúce parazity alebo mikroorganizmy a/alebo kde uvedeným fotoaktivačným činidlom je chlorín, bakteriochlorín, ftalokyanín, porfyrín, purpurín, merokyanín alebo psoralén.

13. Spôsob podľa nároku 12, **vyznačujúci sa tým**,, že chlorínom je chlorín e6, porfyrínom je BPD alebo porfimer-sodík a/alebo cieľovými bunkami sú leukemické bunky.

14. Spôsob podľa nároku 13, **vyznačujúci sa tým**, že BPD je BPD-MA.

15. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 11 až 14, **vyznačujúci sa tým**, že fotoaktívne činidlo má koncentráciu v krvi 0,01 až 4 µg/ml a/alebo kde intenzita ožiarenia v krvi je 15 až 100 $mW/cm^2$.

16. Použitie fotoaktívneho činidla pre prípravu liečiva pre

použitie pri kontakte krvi živočícha s uvedeným liečivom tak, že cieľové bunky obsiahnuté v krvi uvedeného živočícha selektívne akumulujú fotoaktívne činidlo a ožiarením krvi cez kutánnu vrstvu svetlom s intenzitou účinnou pre poškodenie alebo zničenie selektívne cieľových buniek, zatiaľ čo ostatné bunky sú ponechané relatívne nepoškodené.

17. Použitie podľa nároku 16, kde uvedeným fotoaktivačným činidlom je chlorín, bakteriochlorín, ftalokyanín, porfyrín, purpurín, merokyanín alebo psoralén.

18. Použitie podľa nároku 17, kde chlorínom je chlorín e6, porfyrínom je BPD alebo porfimer-sodík.

19. Použitie podľa nároku 18, kde BPD je BPD-MA.

20. Prípravok pre použitie v spôsobe zničenia alebo poškodenia cieľových buniek v krvi živočícha, obsahujúcej uvedené cieľové bunky a necieľové bunky, kde tento spôsob zahrňuje

a/ kontakt krvi s fotoaktívnym činidlom tak, že uvedené cieľové bunky selektívne akumulujú fotoaktívne činidlo a

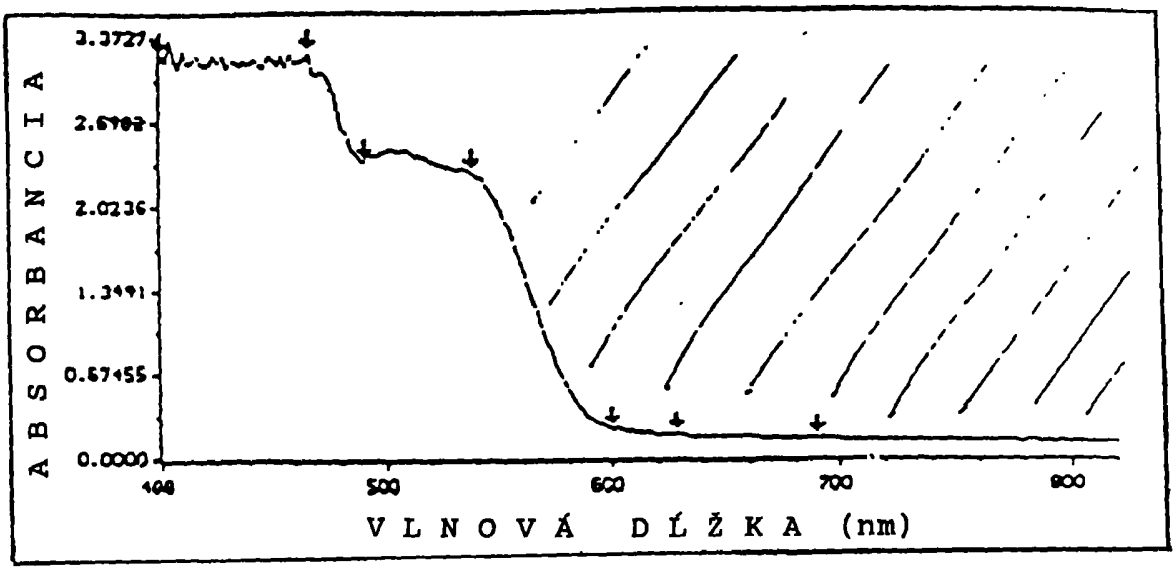
b/ ožiarenie uvedenej krvi cez kutánnu vrstvu svetlom s intenzitou účinnou pre poškodenie alebo zničenie selektívne cieľových buniek, zatiaľ čo ostatné bunky zostávajú relatívne nepoškodené,

kde prípravkom je fotoaktívne činidlo.

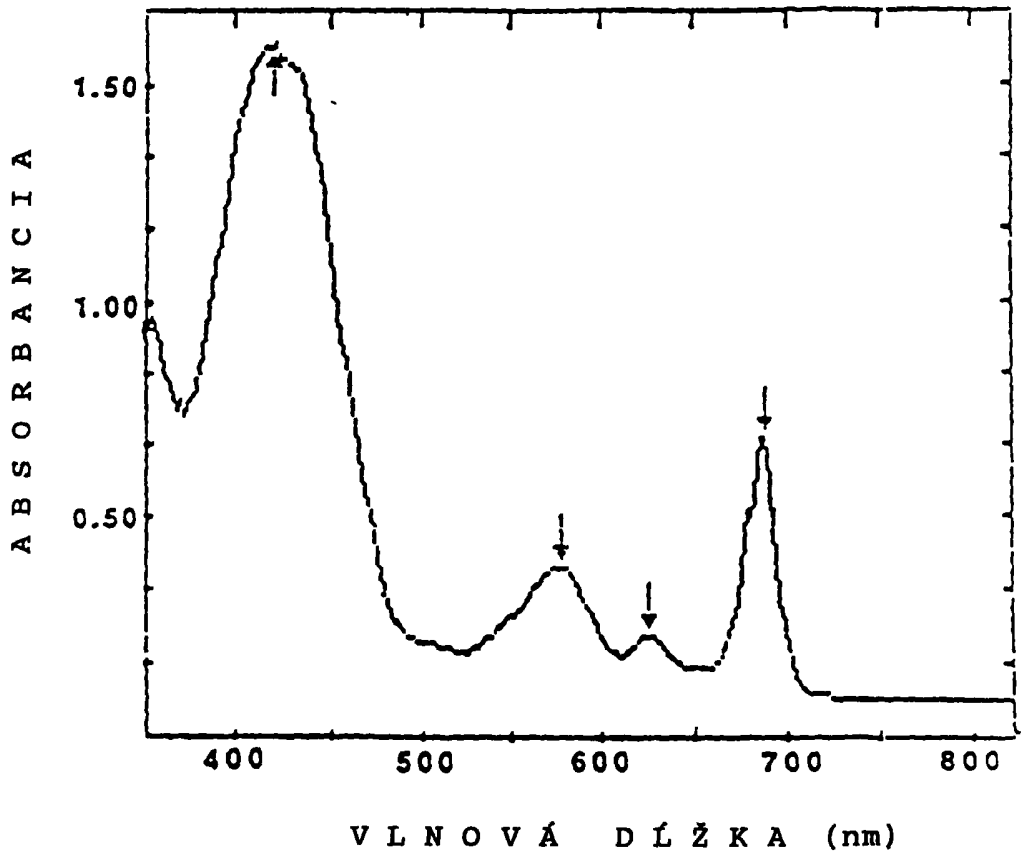
21. Prípravok podľa nároku 20, kde uvedeným fotoaktivačným činidlom je chlorín, bakteriochlorín, ftalokyanín, porfyrín, purpurín, merokyanín alebo psoralén.

22. Prípravok podľa nároku 20, kde chlorínom je chlorín e6, porfyrínom je BPD alebo porfimer-sodík.

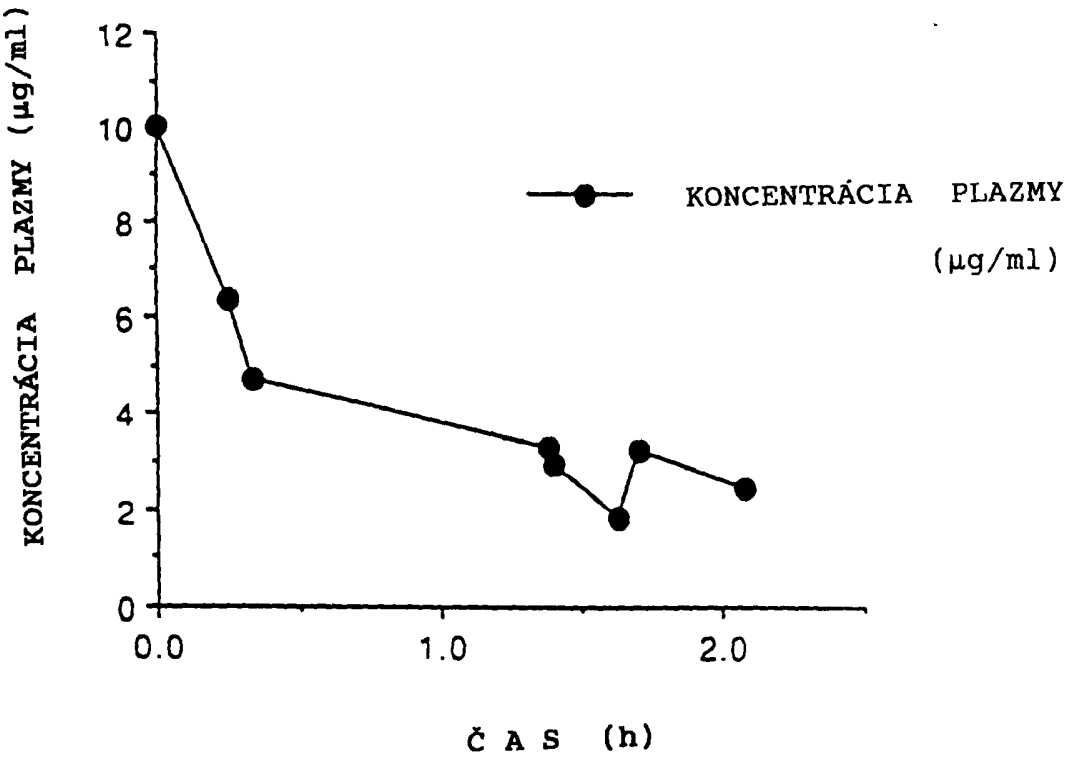
23. Prípravok podľa nároku 20,kde BPD je BPD-MA.


ABSORBANCIA
3.3727
2.6782
2.0236
1.3491
0.67455
0.0000
400
500
600
700
800
VLNOVÁ DĹŽKA (nm)

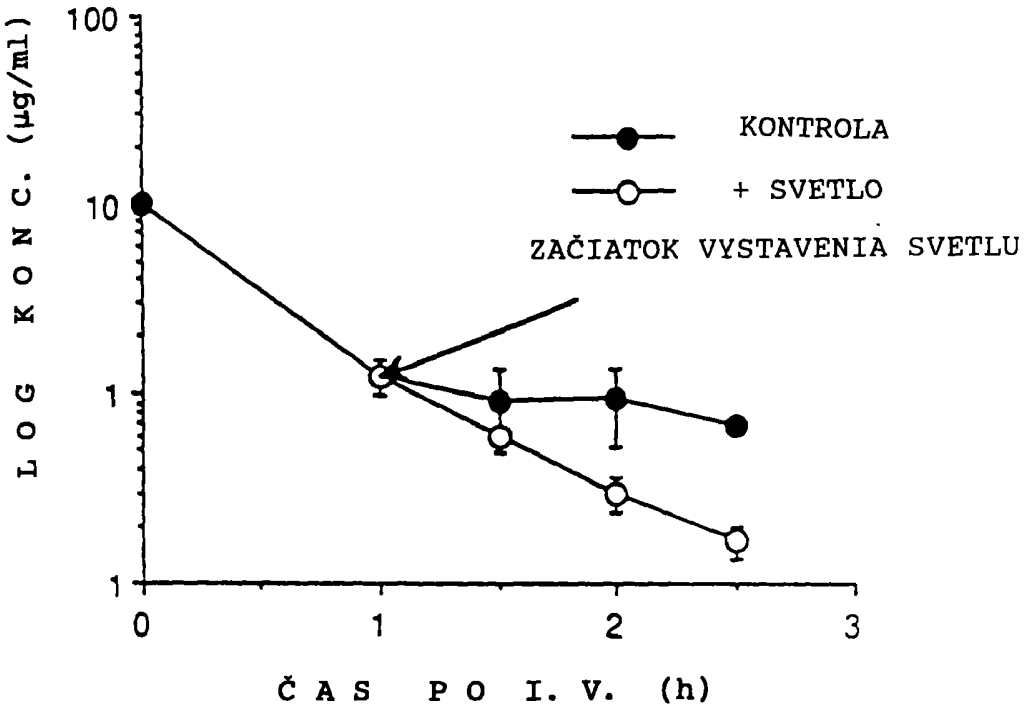
Obr. 1A


ABSORBANCIA
1.50
1.00
0.50
400
500
600
700
800
VLNOVÁ DĹŽKA (nm)

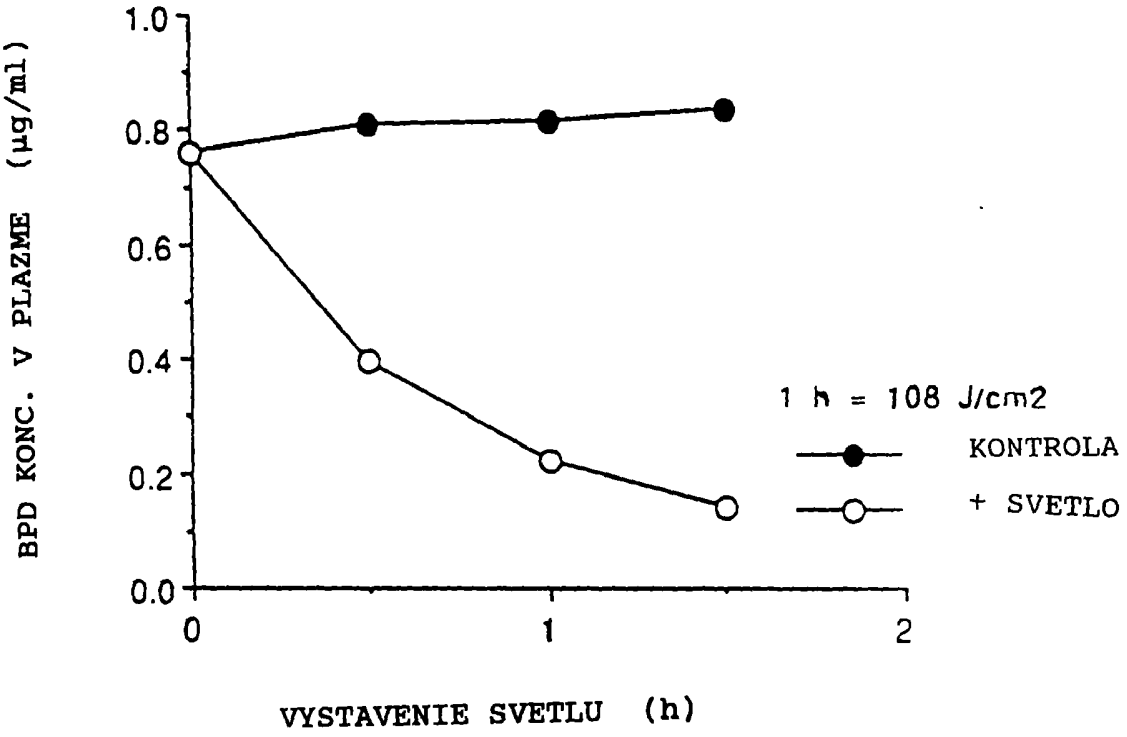
Obr. 1B


KONCENTRÁCIA PLAZMY (µg/ml)
12
10
8
6
4
2
0
0.0
1.0
2.0
ČAS (h)
KONCENTRÁCIA PLAZMY
(µg/ml)

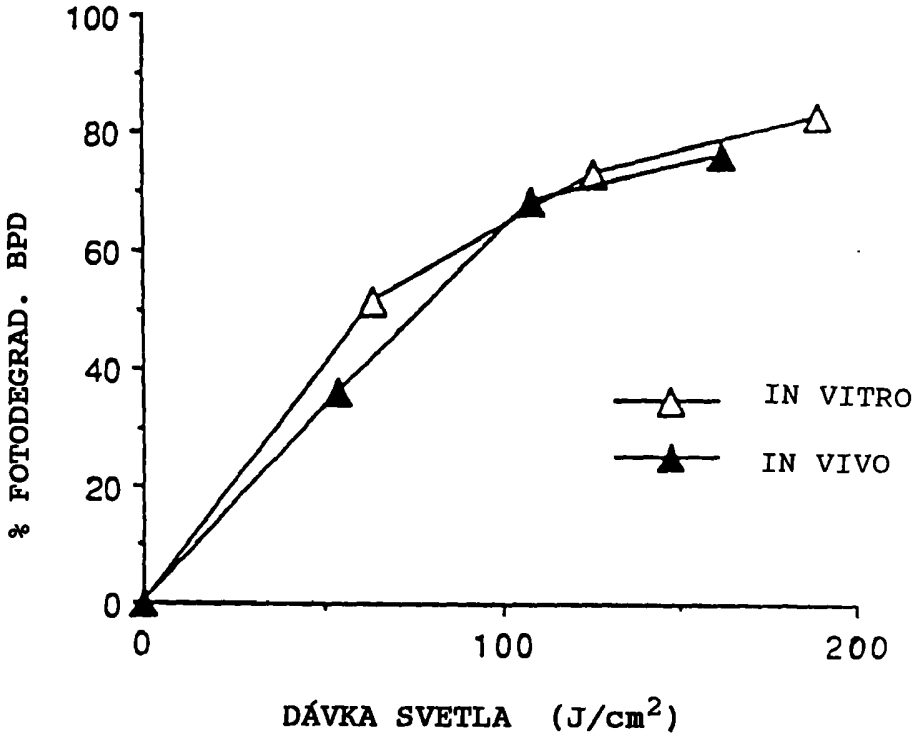
Obr. 2


100
10
1
1
0
1
2
3
LOG KONC. (µg/ml)
KONTROLA
+ SVETLO
ZAČIATOK VYSTAVENIA SVETLU
ČAS PO I. V. (h)

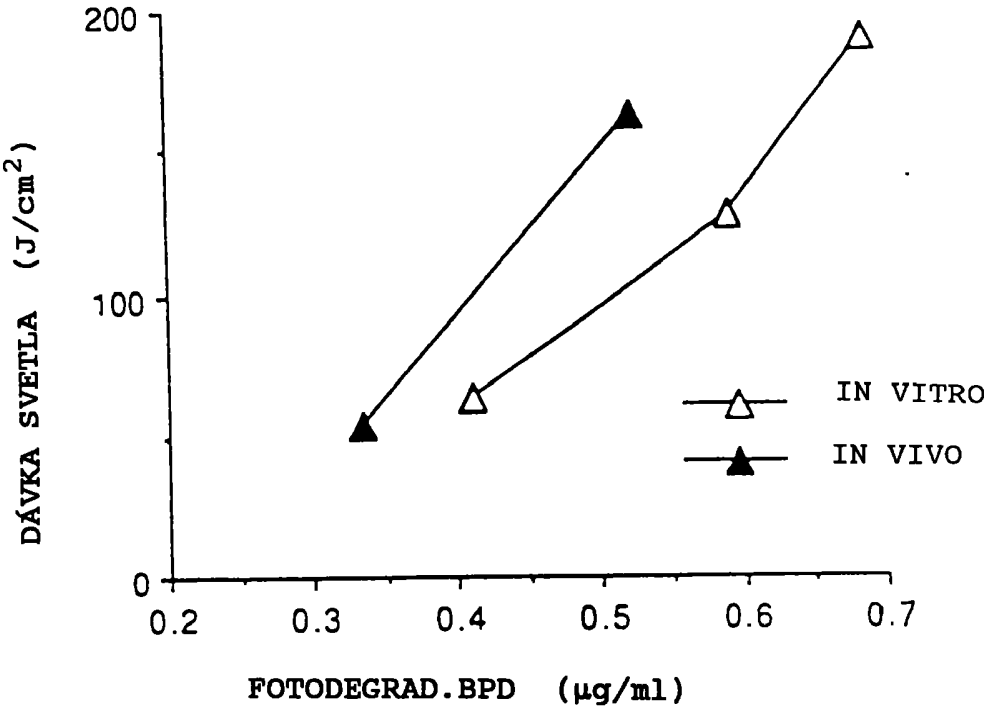
Obr. 3


BPD KONC. V PLAZME (µg/ml)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
2
VYSTAVENIE SVETLU (h)
1 h = 108 J/cm2
KONTROLA
+ SVETLO

Obr. 4


100
80
60
40
20
0
% FOTODEGRAD. BPD
0
100
200
DÁVKA SVETLA (J/cm2)
IN VITRO
IN VIVO

Obr.5


200
100
0
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
DÁVKA SVETLA (J/cm²)
FOTODEGRAD.BPD (µg/ml)
IN VITRO
IN VIVO

Obr. 6