

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 29.11.2001

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 29.11.2000 01.12.2000
15.06.2001

(31) Číslo prioritní přihlášky: 2000/0029142 2000/0029405
2001/0114696

(33) Země priority: GB GB GB

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 15.10.2003
(Věstník č. 10/2003)

(86) PCT číslo: PCT/GB01/05281

(87) PCT číslo zveřejnění: WO02/044395

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 1792

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/87

C 12 N 15/86

C 12 N 15/861

A 61 K 41/00

A 61 K 48/00

(71) Přihlašovatel:

PCI BIOTECH AS, Oslo, NO;

(72) Původce:

Hogset Anders, Oslo, NO;

Berg Kristian, Heggedal, NO;

Maelandsmo Gunnhild Mari, Oslo, NO;

Engesaeter Birgit Ovstebo, Oslo, NO;

Prasmickaite Lina, Oslo, NO;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob zavedení molekuly do buňky

(57) Anotace:

Předkládané řešení poskytuje způsob zavedení molekuly do cytosolu buňky, při němž se buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím činidlem, tato buňka se ozáří světlem o vlnové délce, jež je účinná k aktivaci fotosenzitizujícího činidla a v podstatě ve stejnou dobu, nebo po ozáření, se buňka uvede do styku se zaváděnou molekulou, zvláště pro použití k léčbě rakoviny, genové léčbě a vakcinaci.

CZ 2003 - 1792 A3

Způsob zavedení molekuly do buňky

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu zavádění molekul do buněk, při němž se používá fotosenzitizační činidlo a ozáření buněk světlem o takové vlnové délce, která je účinná pro aktivaci fotosenzitizačního činidla, přičemž molekula, která má být zavedena, je spojena (asociována) s virovým nosičem a zvláště pak s adenovirovým nosičem. Předkládaný vynález se dále týká použití tohoto způsobu v genové léčbě.

Dosavadní stav techniky

Genová léčba, tj. genetické pozměnění, modifikace buněk pacienta za účelem boje s chorobou, je uznávána jako metoda, mající široký léčebný potenciál vzhledem k různým onemocněním, jako jsou rakovina, infekční choroby včetně virových a bakteriálních infekcí, kardiovaskulární onemocnění, vrozené poruchy jako cystická fibróza, poruchy imunitního systému a mnohé další stavy. Tento klinický rozvoj genové léčby je ovšem stále stavěn před mnoho nevyřešených výzev, z nichž jednou z nejdůležitějších je nalezení způsobu účinného a specifického dodání léčebných genů do cílových buněk za podmínek *in vivo* (Verma a Somia, Nature 389, 239-242, 1997; Anderson, Nature 392, 25-30, 1998).

Genová léčba může zahrnovat mnoho odlišných možných přístupů a může zahrnovat i přenos klonovaných lidských genů nebo genových segmentů, dvouvláknových lidských genů nebo genových segmentů, genů z jiných genomů a organismů, oligonukleotidů a různých umělých genů nebo jejich fragmentů, jako jsou negativní (antisense) geny.

V současných metodách bylo navrženo mnoho různých nosičů či vektorů pro použití k přenosu genů při genové léčbě. Jako příklady je možné zmínit polykationtové sloučeniny, kationtové lipidy a virové systémy, ovšem až do nynějška měla genová léčba *in vivo* jen malou úspěšnost. Mezi mnoho známých nedostatků používaných postupů patří malá stálost vektoru v séru, omezená specifická při dodávání genu, nízká účinnost dodávání genu a podobně. K použití virových nosičů se přistupovalo se zvláštní opatrností, týkající se zavádění virových elementů, prvků, do hostitelů, u nichž by mohly vyvolávat nežádoucí účinky jako zánět, což by ve srovnání s použitím jiných metod nebylo kompenzováno zvýšeným přenosem.

Většina buněk neproniká buněčnou membránou snadno. Způsoby zavedení molekul do cytosolu živých buněk jsou vhodnými nástroji pro manipulační a studijní biologické postupy. Mezi nejběžněji používané současné způsoby patří mikroinjikace, permeabilizovanými červenými krvinkami zprostředkovaná fúze (red blood cell ghost-mediated fusion) a fúze liposomů, osmotická lyze pinosomů, vnášení poškrábáním (scrape loading), elektroporace, fosforečnanem vápenatým a virem zprostředkovaná transfekce. Tyto techniky jsou vhodné pro zkoumání buněk v kultuře, i když v mnoha případech mohou být nepraktické, časově náročné, neúčinné nebo mohou indukovat významné usmrcení buněk. Takové techniky tedy nejsou optimální pro použití v biologickém nebo lékařském výzkumu, nebo při léčbách, kde často nejsou dostatečně účinné, mohou mít nesnesitelné toxické účinky, nebo je nelze použít z technických důvodů.

Je dobře známo, že porfyriny a mnoho dalších fotosenzitizujících sloučenin může indukovat cytotoxické účinky na buňky a tkáně. Tyto účinky se zakládají na skutečnosti, že během vystavení světlu se může fotosenzitizující sloučenina stát toxickou nebo může uvolnit toxické látky, jako je singletní kyslík nebo jiné oxidační radikály, které poškozují



buněčný materiál či biomolekuly, včetně buněčných membrán a buněčných struktur a takové buněčné nebo membránové poškození může nakonec buňky usmrtit.

Tyto účinky již byly používány při léčbě různých abnormalit nebo poruch, včetně zejména nádorových onemocnění. Tato léčba se nazývá fotodynamická léčba (PDT, photodynamic therapy) a zahrnuje podání fotosenzitizujících (fotochemoterapeutických) činidel do zasažené oblasti těla, následné vystavení aktivačnímu světlu k aktivaci fotosenzitizujících činidel a jejich přeměně na cytotoxické formy tak, aby zasažené buňky byly usmrceny, nebo byla oslabena jejich proliferativní schopnost. Jsou známa taková fotosenzitizující činidla, která budou přednostně nebo výběrově lokalizovat požadované cílové místo, například nádor nebo jinou lezi.

Známa je široká škála fotosenzitizujících činidel, kam patří zejména psoraleny, porfyriny, chloriny a ftalocyaniny. Taková léčiva se po vystavení světlu stávají toxickými.

Porfyrinové fotosenzitizery působí nepřímo, prostřednictvím tvorby toxických kyslíkových látek a jsou považovány za zvláště výhodné kandidáty k PDT. Porfyriny jsou přírodně se vyskytujícími prekursory při syntéze hemu. Konkrétně je hem produkován tak, že se železo (Fe^{3+}) začlení do protoporphyrinu (Pp IX) účinkem enzymu ferrochelátázy. Protoporphyrin IX je extrémně účinným fotosenzitizerem, zatímco hem nemá žádný fotosenzitizační účinek. V oboru je známo velké množství senzitizerů na bázi porfyrinu nebo odvozených od porfyrinu, které jsou rovněž popsány v literatuře.

Cytotoxický účinek je zprostředkován zejména vytvářením singletního kyslíku, $^1\text{O}_2$. Tento reaktivní meziproduct má v buňkách velmi

krátký poločas rozpadu ($< 0,04 \mu s$). Primární cytotoxický účinek PDT je tedy vytvářen během vystavení světlu a v místech velmi blízkých oblastem vytváření 1O_2 . 1O_2 reaguje s proteiny (aminokyselinami histidin, tryptofan, methionin, cystein, tyrosin) DNA (guanin), nenasyčenými mastnými kyselinami a cholesterolem, přičemž je oxiduje. Jednou z výhod PDT je to, že tkáně nevystavené světlu zůstanou neovlivněné, což znamená, že lze získat selektivní účinek PDT.

Pokud se týká použití PDT ke zničení nežádoucích buněčných populací, například nádorových buněk, existuje k tomu rozsáhlá dokumentace. Patentová literatura popisuje množství fotodynamických sloučenin, ať už samotných nebo spojených s činidly umožňujícími jejich zacílení, například s imunoglobuliny namířenými vůči receptorovým determinantám nádorových buněk, které činí komplex buněčně specifitějším. Určité fotochemické sloučeniny, jako jsou hematoporfyrinové deriváty, mají nadto vrozenou schopnost koncentrovat se v maligních buňkách. Takové způsoby a sloučeniny jsou popsány v norském patentu č. 173 319 a v norských patentových přihláškách o číslech 900 731, 176 645, 176 947, 180 742, 176 786, 301 981, 300 499 a 891 491. Takové metody PDT jsou tedy závislé na rozrušení, destrukci buněčných struktur, vedoucích k usmrcení buněk.

WO 96/074 32 a WO 00/54 802 se na druhé straně týkají způsobů, které používají fotodynamický účinek jako mechanismus k zavedení membránou jinak neprostupných molekul do cytosolu buňky takovým způsobem, který nemá nezbytně za důsledek široké buněčné poškození nebo usmrcení buňky. Při tomto způsobu se molekula, která má být internalizována a fotosenzitizující sloučenina aplikují souběžně nebo následně do buněk tak, že jsou jak molekula, tak fotosenzitizující sloučenina endocytovány nebo přeneseny jinými způsoby do endosomů, lysozomů nebo do jiných, intracelulární membránou vymezených oddílů.

Molekula, která má být přenesena do intracelulárních oddílů buňky a fotosenzitizující sloučenina jsou do buňky aplikovány společně nebo následně (a výhodou odděleně a následně) a jsou buňkou zachyceny, pohlceny společně, do stejných intracelulárních (nitrobuněčných) oddílů (tj. jsou společně translokovány). Molekula, která má být internalizována do buňky, je potom uvolněna vystavením buňky světlu o vhodných vlnových délkách k aktivaci fotosenzitizující sloučeniny, což obratem vede k protržení membrán intracelulárního oddílu a k následnému uvolnění molekuly, která se nachází ve stejném oddílu jako fotosenzitizující činidlo, do cytosolu. Tato metoda byla nazvána "fotochemická internalizace", PCI. V těchto metodách je tedy výsledkem konečného kroku vystavení buněk světlu uvolnění příslušné molekuly ze stejného intracelulárního oddílu jako fotosenzitizující činidlo a její další přítomnost v cytosolu.

Předpokládalo se, že pro účinnost takové metody je nezbytné, aby jak fotosenzitizující sloučenina, tak i molekula, jež má být uvolněna do cytosolu, byly během ozáření světlem přítomné ve stejných intracelulárních oddílech. Ovšem od té doby již bylo zjištěno, že molekuly mohou být zavedeny do cytosolu buněk metodami podobnými PCI, u nichž však vystavení světlu není nezbytně konečným krokem a tyto metody nejsou závislé na tom, aby molekula a fotosenzitizující činidlo byly v době vystavení světlu přítomné ve stejných intracelulárních oddílech. V takových metodách může být fotosenzitizující činidlo uvedeno do styku s buňkami a aktivováno ozářením před tím, než je molekula, která má být internalizována a tedy uvolněna do cytosolu, uvedena do styku s buňkami. Navzdory skutečnosti, že molekula k internalizaci a fotosenzitizující činidlo nejsou v době vystavení světlu nezbytně umístěny ve stejných intracelulárních oddílech, molekula stále vstupuje do buňky a je uvolňována do cytosolu. Tyto výsledky jsou podrobně popsány v souběžné mezinárodní patentové přihlášce (podané 29. 11. 2001 výzkumnou nadací norské

nemocnice, The Norwegian Radium Hospital Research Foundation a týkající se způsobu), jejíž kopie je připojena a je zde začleněna jako odkaz.

Nyní bylo překvapivě zjištěno, že použití postupů PCI v kombinaci s virovými vektory může podstatně zlepšit virem zprostředkované dodání genu do buňky. Vzhledem k tomu, že fotochemická ovlivnění se klinicky používají (Dougherty se spoluautory, J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905, 1998) a obecně jsou velmi specifická a mají málo vedlejších účinků, má popsáný způsob zřetelný potenciál pro zlepšení jak účinnosti, tak i specifčnosti genové léčby *in vivo*.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález tedy poskytuje způsob zavedení molekuly do buňky, přičemž tento způsob zahrnuje kroky, v nichž se zmíněná buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím činidlem, zmíněná buňka se uvede do styku s molekulou jež má být zavedena a jež je připojena k virovému nosiči a zmíněná buňka se ozáří světlem o vlnové délce, účinné pro aktivaci fotosenzitizujícího činidla.

Tyto kroky mohou být prováděny v jakémkoliv vhodném pořadí za předpokladu, že konečným výsledkem je buněčné pohlcení virového nosiče a proto i molekuly, jež má být zavedena do buňky, tedy internalizace takové molekuly. Žádné další molekuly kromě virového nosiče a fotosenzitizujícího činidla nejsou pro provedení podle vynálezu vyžadovány.

Výraz "buňka", jak je zde používán, zahrnuje veškeré eukaryotické (jaderné) buňky, včetně buněk hmyzu a buněk hub a zahrnuje somatické a zárodečné buňky. Reprezentativní "buňky" tedy zahrnují všechny typy savčích i nesavčích živočišných buněk, rostlinné buňky, hmyzí buňky,

buňky hub, prvoků a protoplasty a s výhodou pak buňky jako jsou lidské, myši, krysy, kočičí, psí, ovčí, koňské, hovězí nebo kozí buňky.

Výraz "internalizace", jak je zde používán, se týká dodání molekul, které mají být zavedeny do buněk (zde někdy označovaných jako "přenášené buňky"), spolu s připojeným virovým nosičem nebo bez něho, do cytosolu. V předkládaném případě tedy "internalizace" zahrnuje krok uvolnění zaváděné molekuly, volitelně ve spojení s virovým nosičem nebo s jeho částí, z intracelulárních/membránou vymezených oddílů do cytosolu a poté případně i přenos do jádra. Jakmile byla molekula jednou internalizována, je považována za "zavedenou" do buňky podle způsobu popsaného v tomto vynálezu.

Oddílem vymezeným intracelulární membránou může být jakýkoliv takový oddíl, který je přítomný v buňce. S výhodou bude takovým oddílem membránový měchýřek, zvláště endosom nebo lysosom. Ovšem intracelulární oddíl může také zahrnovat Golgiho aparát či endoplasmatické retikulum.

Tak, jak je zde použit, týká se výraz "buněčné pohlcení" nebo "translokace" jednoho z kroků internalizace, při níž jsou molekuly nebo entity vně buněčné membrány přijmuty do buňky tak, že se ocitnou na vnitřní straně vnější buněčné membrány, například v oddílech vymezených intracelulární membránou nebo ve spojení s těmito oddíly, například v endoplasmatickém retikulu, Golgiho aparátu, lysosomech, endosomech a podobně, k čemuž dochází například endocytózou nebo jiným vhodným pohlcovacím mechanismem.

Vhodnými "molekulami" pro zavedení do buňky mohou být jakékoliv molekuly, které lze spojit s virovými nosiči, virovými vektory nebo s virovými částicemi a někdy se označují jako "přenášené molekuly". Takovými molekulami jsou obecně molekuly nukleových

kyselin a mohou zahrnovat celou délku genu, jenž má být zaveden do buňky, nebo délku jeho funkčního fragmentu, nebo mohou být například sekvencí cDNA, obsahující úplnou kódující sekvenci genu či jeho funkčního fragmentu. Alternativně mohou uvedené molekuly nukleové kyseliny kódovat negativní (antisense) molekuly RNA, ribozymy, aptamery nebo triplex vytvářející oligonukleotidy, nebo mohou obsahovat transkripční faktor "lákající", klamné DNA (transcription factor "decoy" DNA) a podobně. S výhodou mají molekuly nukleové kyseliny délku od 10 do 30 000 bazí, například 20 až 10 000.

Výraz "připojený k" či "spojený s" se tak, jak je zde používán, týká molekuly, která je nějakým způsobem začleněna do virového nosiče, virového vektoru nebo virové částice nebo je na ně nějakým způsobem připojena, například začleněním do genomu uvedené virové molekuly, nebo je od zmíněného genomu oddělena, ale je přenášena ve virové částici.

Obecně budou molekuly, které mají být zaváděny do buněk, zabaleny nebo začleněny do virových částic, tj. zapouzdřeny nebo začleněny do virového obalu nebo kapsidu. Molekulou, jež má být přenášena, je s výhodou polynukleotid a je s výhodou vložena do virového konstrukt, který obsahuje určité, od viru odvozené prvky, nezbytné k umožnění toho, aby byl konstrukt zabalen dovnitř virového nosiče. Molekula, jež má být přenášena, může být například klonována do klonovacího místa genomu virových nosičů. Alternativně lze použít dvou nebo i více samostatných molekul, přispívajících těmito rysy, jak je zde dále popsáno. Takové virové částice mohou být zvoleny tak, aby mohly, případně nemohly infikovat buňky samy o sobě a pokud mohou samy o sobě infikovat buňky poté, co byly do buněk internalizovány, mohou být zvoleny tak, aby mohly, případně pak nemohly zapojit endogenní buněčné zařízení k replikaci a sestavování nových virových komplexů pro jejich sekreci z buňky.

Ovšem obecně se při použití genové léčby nebo jiných aplikací *in vivo* vektory z bezpečnostních důvodů obvykle deaktivují tak, aby mohly infikovat hostitelské buňky, ale nemohly se replikovat, kompletovat nové viriony a infikovat nové buňky, to znamená, činí se nezpůsobilými k replikaci. Taková deaktivace může být prováděna jakýmkoliv vhodnými prostředky, ale vhodně se provádí delecí, vynecháním některých virových genů, nutných pro virovou replikaci a volitelným vložením léčebných genů, které mají být přenášeny, na jejich místo. Ovšem technika, popsaná v této přihlášce, může být použita také u virů schopných replikace nebo u virů s omezenou replikací, jako například ONYX-15 (F. R. Khure se spoluautory, *Nature Med.* 6, 879-885, 2000) nebo u adenovirů s omezenou replikací, kódujících thymidinkinázu viru Herpes simplex, popsaných Wildnerem a spoluautory (O. Wildner se spoluautory, *Gene Ther.* 6, 57-62; 1999; O. Wildner se spoluautory, *Cancer Res.* 59, 410-413; 1999), nebo například u replikujících se retrovirů, jak bylo popsáno D. Klatzmanem (ústní sdělení a abstrakt na 8th Meeting of the European Society of Gene Therapy, Stockholm, 7.-10. 10. 2000).

Celá molekulární entita, jež má být zavedena do buňky, tj. virový nosič, začleňující nebo opouzdřující molekulu jež má být zavedena, je zde někdy označována jako "přenášená částice".

Obecně je nukleová kyselina, která má být zavedena do buňky způsobem podle předkládaného vynálezu, částí konstruktů na bázi viru, například plasmidu na bázi viru, který obsahuje určité prvky odvozené (získané) z viru, nezbytné k umožnění toho, aby byl konstrukt zabalen dovnitř virového nosiče/virového kapsidu/virového vektoru. Alternativně může nukleová kyselina, jež má být zavedena, vytvářet část jedné molekuly, například plasmidu a přitomna může být i druhá molekula, obsahující sekvence, nezbytné pro vývoj virového nosiče obsahujícího první molekulu. Nadto, pokud závisí působení nukleové kyseliny v buňce

na expresi jí kódovaného proteinu nebo na vytvoření RNA z ní samé, je nukleová kyselina ze stran lemována vhodnými regulačními sekvencemi (například promotory) pro zajištění vysoké úrovně exprese v konkrétní cílové buňce. Takové regulační prvky mohou být získány (odvozeny) z virů (například promotor CMV z cytomegaloviru) nebo z jakýchkoliv jiných vhodných organismů a sestavení (design) vhodných virových konstruktů k umožnění dobré exprese proteinu, kódovaného molekulou nukleové kyseliny, je odborníkům v oboru dobře známé.

Například tkáňově specifické nebo regulovatelné promotory mohou být použity k získání tkáňově nebo vzhledem k onemocnění specifické či regulovatelné exprese. Použit může být například tkáňově specifický promotor, jako promotor melanomově specifické tyrosinázy. Dobře známé jsou i regulovatelné promotory, jako tetracyklinem regulované promotory. Více příkladů specifických nebo regulovatelných promotorů, které lze použít v předkládaném vynálezu, je možné najít v pracích I. R. Harta v Semin. Oncol. 23, 154-158, 1996; Millera a Whelana, Hum. Gene Ther., 1997; D. M. Nettelbecka a J. V. Mullera v Trends Genet. 16, 174-181, 2000; Speara v Anticancer Res. 18, 3223-3231, 1998 a v odkazech v nich uvedených.

"Virovou nosičovou" molekulou, k níž je přenášena molekula, připojena, může být jakýkoliv virový systém za předpokladu, že virové nosiče tohoto systému jsou schopné připojit, začlenit nebo opouzdřit molekuly, které mají být zavedeny do buněk. Obecně jsou tedy přenášené molekuly zabaleny do virové částice nebo do virového kapsidu a výrazy "virová částice", "virový kapsid" a "virový vektor" jsou zde rovněž používány k označení "virového nosiče". Tyto výrazy, jak jsou zde používány, nezahrnují plasmidy na bázi viru nebo DNA, i když k vytvoření virového nosiče lze takový plasmid použít.

Příklady vhodných virových systémů pro použití podle předkládaného vynálezu jsou adenoviry a adeno-asociované viry, retroviry, lentiviry, viry Herpes, bakteriofágy, chřipkový virus, virus Sendai, virus neštovic a Baculovirus, s výhodou pak adenoviry, adeno-asociované viry, retroviry, lentiviry a bakteriofágy. Upřednostňovaným virovým systémem pro použití ve způsobech podle tohoto vynálezu je adenovirus. Pro použití podle předkládaného vynálezu virové nosiče obecně vytvářejí pozměněné, modifikované formy přírodně se vyskytujících virů pro přidání požadovaných vlastností a k minimalizaci možné patogenity nebo jiných nežádoucích vedlejších účinků. Virové nosiče tedy představují varianty virů, rutinně používaných pro genovou léčbu a jsou v oboru dobře známé, ovšem uchovávají si podstatné a rozpoznatelné složky z výchozích virů.

Tak, jak je zde použit, týká se výraz "fotosenzitizující činidlo" takového činidla, které je fotosenzitivní a které je při aplikaci aktivačního světla přeměněno na cytotoxickou formu, nebo umožňuje vznik cytotoxických látek. Fotosenzitizujícím činidlem, jež má být použito podle předkládaného vynálezu, (a které je charakteristické a s výhodnou odlišující se od přenášené molekuly) je výhodně jakékoliv takové činidlo, soustřeďující se do intracelulárních oddílů a zvláště do endosomů nebo lysosomů. V oboru je známa celá škála takových fotosenzitizujících činidel a jsou také popsána v literatuře, včetně WO 96/07 432. V tomto ohledu je třeba zmínit di- a tetrasulfonovaný hlinitý ftalocyanin (například AlPcS_{2a}), sulfonované tetraphenylporfíny (TPPS_n), nilskou modř, deriváty chlorinu e_6 , uroporfyrin I, fyloerythrin, hematoporfyrin a methylenovou modř, u nichž bylo prokázáno, že se soustřeďují v endosomech a lysosomech buněk v kultuře. Ve většině případů je to způsobeno endocytickou aktivitou.

Fotosenzitizujícím činidlem je tedy s výhodou takové činidlo, které je přijímáno do vnitřních oddílů (kompartmentů) lysosomů nebo

endosomů. Použita však mohou být i další fotosenzitizující činidla, která se soustřeďují do jiných intracelulárních oddílů, jako například do endoplasmatického retikula nebo do Golgiho aparátu. Je také možné, že se může uplatňovat takový mechanismus, při němž účinky fotochemického ovlivnění působí na další složky buňky (tj. na složky odlišné od membránou vymezených oddílů). Jednou z možností může tedy být například destrukce molekul důležitých pro intracelulární transport nebo fúzi měchýřků fotochemickým ovlivněním. Takové molekuly nemusí být nezbytně soustředěny v membránou vymezených oddílech

Třídy vhodných fotosenzitizujících činidel, které lze zmínit, tedy zahrnují porfyriny, psoraleny, ftalocyaniny, purpuriny, chloriny, benzoporfyriny, naftalocyaniny, kationtová barviva, tetracykliny a lysomotropní slabé báze nebo jejich deriváty (Berg se spoluautory, J. Photochemistry and Photobiology 65, 403-409, 1997). Další vhodná fotosenzitizující činidla zahrnují texafyriny, theoforbidy, porfyceny, bakteriochloriny, ketochloriny, hematoporfyrinové deriváty a deriváty takových látek, endogenní fotosenzitizery indukované kyselinou 5-aminolevulinovou a jejich deriváty, dimery nebo jiné konjugáty fotosyntetizerů.

Fotosenzitizery jsou s výhodou ve volné formě, tj. nejsou konjugované s žádnou další makromolekulou. Zvláště výhodně je fotosenzitizující činidlo odděleno od virového nosiče, to znamená, že je samostatnou entitou. Ovšem fotosenzitizer může být alternativně spojen nebo konjugován s nosičem či připojen k nosiči nebo jiné molekule, jak bude popsáno dále, například může být připojen na zacílenou protilátku nebo být spojen s nosičem jako je polylysin. Alternativně, za určitých okolností, může být fotosenzitizující činidlo připojeno nebo být konjugováno na virový nosič nebo jeho část (například na okrajovou lipidovou membránu, například retriviru) přímo.

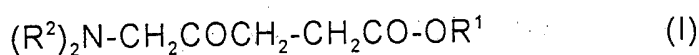
Upřednostňovaná fotosenzitizující činidla zahrnují TPPS₄, TPPS_{2a}, AlPcS_{2a} a jiné amfifilní fotosenzitizery.

V upřednostňovaném aspektu poskytuje předkládaný vynález způsob, v němž jsou fotosenzitizujícími činidly kyselina 5-aminolevulinová, estery 5-aminolevulinové kyseliny nebo farmaceuticky přijatelné sole takových sloučenin.

U zmíněných esterů může být 5-aminová skupina substituovaná nebo nesubstituovaná, ve druhém případě se pak jedná o estery ALA, kyseliny 5-aminolevulinové.

ALA estery pro použití v předkládaného vynálezu jsou konkrétněji estery kyseliny 5-aminolevulinové s volitelně substituovanými alkanoly, tj. alkylové estery nebo substituované alkylové estery.

Estery ALA, které mohou být použity, jsou výhodně sloučeniny o vzorci I,



(kde R¹ může představovat alkyl volitelně substituovaný hydroxylovými, alkoxylovými, aminovými, arylovými skupinami, acyloxyskupinami, alkoxykarbonyloxyskupinami, oxoskupinami nebo fluorovými skupinami a volitelně přerušeny kyslíkovými, dusíkovými, sírovými nebo fosforovými atomy; a skupina R², buď shodná nebo odlišná, představuje vodíkový atom nebo skupinu R¹),

nebo sole takových sloučenin.

Substituované alkylové R¹ skupiny mohou být monosubstituované nebo polysubstituované. Vhodné R¹ skupiny tedy zahrnují například

nesubstituovaný alkyl, alkoxyalkyl, hydroxyalkoxyalkyl, polyhydroxyalkyl, hydroxypolyalkylenoxyalkyl a podobně. Výraz "acyl", jak je zde používán, zahrnuje jak karboxylátové, tak karbonátové skupiny a tedy acyloxyskupinou substituované alkylové skupiny zahrnují například alkylkarbonyloxyalkyl. V takových skupinách mají kterékoliv alkýlenové částice s výhodou takový obsah uhlíkových atomů, jaký je definován níže pro alkylové skupiny. Upřednostňované arylové skupiny zahrnují fenyl a monocyklické, 5 až 7 členné heteroaromáty, zvláště pak fenyl a takové skupiny mohou být opět samy volitelně substituovány.

Reprezentativní substituované alkylové skupiny R^1 zahrnují alkoxy-methylové, alkoxy-ethylové a alkoxy-propylové skupiny nebo acyloxy-methylové, acyloxy-ethylové a acyloxy-propylové skupiny, například pivaloyloxy-methyl.

Upřednostňované estery ALA pro použití jako fotosenzitizující činidla podle tohoto vynálezu zahrnují takové estery ALA, kde R^1 představuje nesubstituovanou alkylovou skupinu a/nebo každá skupina R^2 představuje vodíkový atom.

Tak, jak je zde používán, zahrnuje výraz "alkyl" jakoukoliv alifatickou nasycenou nebo nenasyčenou uhlovodíkovou skupinu s krátkým nebo dlouhým řetězcem, rovným nebo rozvětveným. Nenasycené alkylové skupiny mohou být mono-nenasycené nebo poly-nenasycené a zahrnují jak alkenylové, tak alkynylové skupiny. Takové skupiny mohou obsahovat až 40 uhlíkových atomů. Přednost se však dává alkylovým skupinám obsahujícím nejvýše 10, například 8, lépe nejvýše 6 a zvláště pak nejvýše 4 uhlíkové atomy.

Zejména je potřeba zmínit ALA-methylester, ALA-ethylester, ALA-propylester, ALA-hexylester, ALA-heptylester a ALA-oktylester a

jejich sole, které představují upřednostňovaná fotosenzitizující činidla pro použití podle předkládaného vynálezu.

Způsoby podle předkládaného vynálezu mohou být používány *in vitro* nebo *in vivo*, buď pro systematickou nebo místní léčbou *in situ* (místně) nebo při léčbě *ex vivo* s následným podáním ovlivněných buněk do těla.

K provedení způsobu podle vynálezu mohou být kroky "vedení do styku" buněk s fotosenzitizujícím činidlem a odděleně s virovým nosičem prováděny jakýmkoliv běžným nebo požadovaným způsobem. Pokud má být krok vedení do styku prováděn *in vitro*, mohou být buňky výhodně udržovány ve vodném médiu, jako je například vhodné buněčné kultivační médium a fotosenzitizující činidlo nebo virový nosič mohou být ve vhodném časovém okamžiku jednoduše přidány do média za vhodných podmínek, například ve vhodné koncentraci a na vhodný časový úsek.

Fotosenzitizující činidlo se uvádí do styku s buňkami ve vhodné koncentraci a po vhodný časový úsek, což může být snadno stanoveno odborníkem za použití rutinních postupů a bude záviset na konkrétním použitém fotosenzitizujícím činidle a na typu buněk. Koncentrace fotosenzitizujícího činidla musí být taková, že jakmile je toto činidlo jednou přijato do buněk (například do jednoho nebo více z intracelulárních oddílů těchto buněk nebo je s takovými oddíly spojeno) a je aktivováno ozářením, jedna nebo více z buněčných struktur je rozrušena, například jeden nebo více z intracelulárních oddílů je lyzován nebo rozrušen. Například fotosenzitizující činidla, používaná ve zde uváděných příkladech, mohou být použita v koncentraci 10 až 50 $\mu\text{g/ml}$. Pro použití *in vitro* může být toto rozmezí ještě širší, například od 0,05 do 500 $\mu\text{g/ml}$. Pro humánní léčbu *in vivo* může být fotosenzitizující

čínidlo použito v rozmezí od 0,05 do 20 mg/kg tělesné hmotnosti při systematickém podávání, nebo v rozmezí od 0,1 do 20 % v rozpouštědle pro místní nanesení. U menších zvířat může být koncentrační rozmezí odlišné a může být odpovídajícím způsobem upraveno.

Doba inkubace buněk s fotosenzitizujícím čínidlem (tj. doba "styku") se může lišit, přičemž semůže pohybovat od několika minut do několika hodin, například až do 48 hodin nebo déle. Doba inkubace by měla být taková, aby bylo fotosenzitizující čínidlo přijato do vhodných buněk.

Po inkubaci buněk s fotosenzitizujícím čínidlem může volitelně následovat období inkubace s médiem bez přítomnosti fotosenzitizeru ještě před tím, než jsou buňky vystaveny světlu nebo než je přidána přenášená molekula.

Přenášenou molekulou může být jakákoliv molekula nukleové kyseliny, jak byla diskutována výše a taková molekula je uváděna do styku s buňkami ve spojení s virovým nosičem ve vhodné koncentraci/dávce a na vhodný časový úsek. Vhodná koncentrace virového nosiče může být stanovena v závislosti na účinnosti přijímání příslušného nosiče do buněk a na konečné koncentraci, jež má být v těchto buňkách dosažena. Jednou z překvapivých výhod použití PCI ve spojení s virovým nosičem je to, že k získání stejné účinnosti transfekce mohou být použity menší dávky virových částic, například až do 20x méně virových částic. Vhodné dávky virových nosičů, kterých má být použito, budou samozřejmě záviset na typu použitého viru, a u aplikací *in vivo* i na způsobu podání, typu léčeného onemocnění na tom, zda jsou použity zacíľující ligandy (viz níže) a podobně. Typicky by pro intratumorovou injikaci (do nádoru) nereplikativního adenovirového vektoru mělo být injikováno 10^3 až 10^{13} jednotek vytvářejících kolonie

(plaque forming units, pfu, tj. infekčních částic) na jednu injikaci. To by mělo obvykle odpovídat přibližně 10^5 až 10^{15} fyzických virových částic, neboť v "obvyklém" virovém přípravku pouze přibližně 1 % fyzických virových částic vyvolává infekci. Pro replikace schopné viry mohou být účinné i dávky nižší než ty výše uvedené, například až 10^3 částic, například je tedy možné použít 10^3 až 10^6 , 10^{10} nebo 10^{15} částic. Na druhé straně, pokud se používá systematické podávání, může být nezbytné dávku zvýšit.

Další výhodou, která byla pozorována, je možnost dosažení velkého zlepšení účinnosti transfekce, až do transfekce 100 % veškerých buněk v pokusu. Za použití dřívějších metod nebylo možné dosáhnout takových úrovní transfekce, nebo vyžadovaly nepřipustně vysoké dávky virů. Způsoby podle tohoto vynálezu tedy s výhodou poskytují transfekci vyšší než 50%, zvláště výhodně vyšší než 75, 85 nebo 95% vzhledem k celkovému počtu buněk.

"Doba transfekce" nebo "doba celulárního pohlcení" pro virové nosiče, tedy doba styku nosičů s molekulou, může proto být několik minut až několik hodin. Použita může být doba transfekce 10 minut až 10 nebo 24 hodin, například 15 minut až 10 hodin nebo například 15 až 30 minut až 2, 3, 4 nebo 6 hodin. Výsledkem prodloužení doby transfekce může být zvýšený příjem příslušného nosiče.

Virové nosiče mohou být aplikovány před ozářením, po něm nebo současně s ním. Pokud jsou aplikovány po ozáření, mohou být virové nosiče aplikovány například v čase 0 až 4 nebo 0 až 24 hodin po ozáření, například více než 1, 2, 4, 8, 10 nebo dokonce 12 hodin po ozáření. Po styku s virovým nosičem mohou být buňky volitelně převedeny do média bez obsahu nosiče, například před ozářením, a to například na více než 5 minut, jako na 15 minut až 2 hodiny, například na 30 minut. Pokud se provádí aplikace před ozářením, může to být

například 12 hodin před ozáření, například 15 minut až 2 hodiny před ozáření, volitelně s mezibdobím v médiu bez přítomnosti virového nosiče.

Bude zřejmé, že u aplikací *in vivo* bude čas, povolený pro transfekci během styku virového nosiče s buňkami, obtížné kontrolovat. Ovšem u provádění *ex vivo*, *in vitro* a u některých typů místního podávání může být doba styku řízena příslušným stykem a krokem promytí.

Fotosenzitizační činidlo a virový nosič, spojený s molekulou, jež má být zaváděna, mohou být k buňkám přidány odděleně nebo společně před světelným ovlivněním/ozáření, jak je popsáno ve WO 96/07432, ve WO 00/54802 a v souběžné mezinárodní patentové přihlášce (podané 29. 11. 2001 výzkumnou nadací norské nemocnice, The Norwegian Radium Hospital Research Foundation a týkající se způsobu), nebo může být fotosenzitizační činidlo nejprve přidáno k buňkám, poté následuje krok ozáření a následně přídavek virového nosiče, jak je popsáno v souběžné patentové přihlášce, která je připojena. Při posledně jmenovaném uspořádání se ozáření s výhodou provádí před buněčným pohlcením přenášené molekuly (zde virového nosiče) a zvláště výhodně se přenášená molekula uvádí do styku s buňkami po ozáření, například v čase 0 až 4 hodiny po ozáření. Alternativně se buňky uvedou do styku s přenášenou molekulou v podstatě ve stejné době, v jaké se provádí ozáření.

Jinak řečeno, krok ozáření se může provádět buď před buněčným pohlcením virových nosičů do kteréhokoli intracelulárního oddílu, nebo po takovém buněčném pohlcení, za předpokladu, že fotosenzitizační činidlo bylo zavedeno do intracelulárních oddílů před ozáření. Pokud byly jak fotosenzitizační činidlo, tak i virový nosič zavedeny do intracelulárních oddílů buňky v době vystavení světlu, mohou být virový

nosič i fotosenzitizační činidlo v době vystavení světlu soustředěny ve stejných nebo v rozdílných intracelulárních oddílech. Další podrobnosti, týkající se načasování přidavku různých složek k buňkám, jsou diskutovány v dokumentech dosavadního stavu techniky WO 96/07432 a WO 00/54802 uvedených výše, nebo v připojené souběžné patentové přihlášce, jejichž obsahy jsou zde začleněny jako odkaz.

V každém případě časové okno, v němž mohou být virové nosiče uvedeny do styku s buňkami a stále být do nich přijaty a internalizovány, může záviset na množství faktorů, jako například na buněčném typu, konkrétním nosiči, na konkrétním použitém fotosenzitizujícím činidle a na délce trvání světelného ovlivnění. Pokud je to nezbytné, může být toto časové okno stanoveno pro konkrétní sadu podmínek, což by mělo být v silách odborníka v oboru.

Doba, čas, kdy se virový nosič podává, se bude měnit v závislosti na tom, zda je postup prováděn *in vitro* nebo *in vivo*. Při postupech *in vitro* budou virové nosiče obecně přivedeny do styku se všemi cílovými buňkami souběžně, tj. doba podání se shoduje s dobou styku. Například pokud jsou buňky pěstovány v kultuře *in vitro* a je tedy poměrně snadné uvést nosiče do styku s buňkami v patřičný časový okamžik. V uspořádání *in vivo* je ovšem krok uvedení cílových buněk do styku s virovými nosiči jasně komplikovanější a bude záviset na způsobu podávání, typu virového nosiče a na umístění cílových buněk.

Pokud například mohou být virové nosiče podávány přímo do cílových buněk, například injekcí, potom budou virové nosiče do styku s cílovými buňkami (nebo alespoň s jejich částí) uvedeny poměrně rychle, například během minut nebo hodin po podání.

Na druhou stranu, pokud jsou virové nosiče podávány intravenózní injekcí pro dosažení vzdáleného cíle, pak může trvat déle než se

dostanou do styku s cílovými buňkami. Například může trvat 24 až 96 hodin, než se po podání dostanou do cílových buněk. Tato "doba vyjádřená ve dnech" musí být brána v úvahu při plánování vhodné doby, během níž mají být virové nosiče podávány vzhledem k aplikaci fotosenzitizačního činidla a doby ozáření.

Stejně úvahy samozřejmě platí i pokud se jedná o čas, v němž je podáváno fotosenzitizační činidlo. Ovšem na rozdíl od přenášené molekuly je důležité, že toto činidlo by mělo být podáváno dostatečně před ozářením, tak, aby při ozáření již bylo zmíněné činidlo zavedeno do intracelulárního oddílu. Výhodně je tedy takové činidlo aplikováno 1 až 72 hodin před ozářením, například 4 až 72 hodin, jako 4 až 48 hodin nebo 4 až 24 hodin před ozářením. Opět, jak bylo diskutováno výše s ohledem na krok uvedení virových nosičů (a tedy přenášených molekul) do styku s buňkami, načasování podávání fotosenzitizujícího činidla vzhledem k časovému okamžiku ozáření bude záviset na době, kterou bude potřebovat fotosenzitizační činidlo pro dosažení cílových buněk a pro své zavedení do těchto buněk. Tato doba se může lišit v závislosti na tom, zda jsou způsoby prováděny *in vitro* nebo *in vivo* a na tom, zda se podávání provádí přímo do cílové tkáně, nebo na vzdálenějším místě. Ve všech případech je pak důležité, aby fotosenzitizační činidlo bylo zavedeno do cílových buněk před jejich ozářením. Zmíněné činidlo může být udržováno ve styku s uvedenými buňkami bezprostředně až do ozáření, například 1 nebo 4 až 72 hodin, s výhodou 4 až 24 hodin, například 12 až 20 hodin, nebo může být ze styku uvolněno bezprostředně před ozářením, například pro více než 5 minut, například 10 minut až 8 hodin, jako například 1 hodinu až 4 nebo 6 hodin v médiu bez přítomnosti činidla a/nebo v médiu obsahujícím přenášenou molekulu.

Tedy i když je situace *in vivo* komplikovanější než *in vitro*, je základní koncept předkládaného vynálezu stále stejný, tj. doby podávání

musejí být takové, aby před ozářením bylo cílovými buňkami přijato příslušné množství fotosenzitizujícího činidla a buď: (i) před ozářením nebo během ozáření byla přenášena molekula (a její virový nosič) buď pohlcena buňkami, nebo došlo k jejímu pohlcení po dostatečném styku s cílovými buňkami, a to do stejných či odlišných intracelulárních oddílů jako fotosenzitizující činidlo, nebo (ii) po ozáření byla přenášena molekula a její připojený virový nosič ve styku s buňkami po dostatečné časové období k umožnění jejího pohlcení do buněk.

Volitelně může být fotosenzitizující činidlo asociováno, spojeno či konjugováno s jednou nebo více molekulami nosiče, cílovými molekulami nebo vektory, které mohou usnadnit nebo zvýšit pohlcení fotosenzitizujícího činidla nebo přenášené molekuly, nebo mohou zacílit či uvolnit tyto entity do zvláštního buněčného typu, tkáně nebo intracelulárního oddílu.

Příklady nosičových systémů zahrnují polylysin (například poly-L-lysin nebo poly-D-lysin), polyethylenimin či dendrimery (například kationtové dendrimery jako SuperFect®), nebo jiné polykationty, dextransulfát, různé kationtové lipidy jako DOTAP (1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylamino)propan) či lipofectin, nebo kationtové lipidy formulované s "pomocnými" lipidy jako jsou DOPE (dioleoylfosfatidylethanolamin), liposomy, rekonstituované LDL-částice, stericky stabilizované liposomy nebo různé částice, odvozené od virových systémů jako například adenovirů, lentivirů a jiných retrovirů, adeno-asociovaných virů, bakteriofágů a podobně. Tyto nosičové systémy mohou obecně zlepšit farmakokinetiky a zvýšit buněčné pohlcování fotosenzitizujícího činidla a mohou také nasměrovat fotosenzitizující činidlo do intracelulárních oddílů, které jsou zvláště výhodné pro dosažení fotochemické internalizace, ale obecně nejsou schopné zacílit fotosenzitizující činidlo do specifických buněk (například rakovinných buněk) nebo tkání.

Virové nosiče mohou být také spojeny nebo konjugovány s jednou nebo více z nosičových molekul, zacíľujících molekul nebo zacíľujících vektorů, anebo na ně být připojeny. Alternativně mohou být určité povrchové modifikace virové nosičové částice výhodné pro použití v předkládaném vynálezu. Možné přínosy, vyplývající z použití takových nosičů a/nebo povrchových modifikací jsou: i) zlepšení farmakokinetiky a biologické distribuce virového vektoru, obvykle prodloužením doby oběhu; ii) zamaskování schopnosti viru vázat se na svůj normální receptor k umožnění přesměrování viru na jiné receptory (a tedy tkáně, které normálně nejsou virem infikovány); iii) poskytnutí kladného povrchového náboje virovému vektoru, takže bude navazovat větší rozsah buněk než dokáže svým přirozeným infekčním mechanismem; iv) "ukrytí" viru před imunitním systémem.

Virový nosič je přednostně spojen nebo konjugován s nosičovou molekulou, nebo je na ni připojen, s výhodou pak s nosičem zahrnujícím polykationty (například s polylysinem nebo SuperFect®) či kationtové lipidy.

Příkladem takových nosičů, které lze v tomto ohledu použít, jsou polykationty (M. Lanuti se spoluautory, *Gene Ther.* 6, 1600-1610, 1999; S. M. Arcasoy se spoluautory, *Gene Ther.* 4, 32-38, 1997; E. Dodds se spoluautory, *J. Neurochem.* 72, 2105-2122, 1999;) a kationtové lipidy (P. R. Clark se spoluautory, *Cancer Gene Ther.* 6, 437-446, 1999). Příkladem povrchových modifikací, které lze v tomto ohledu použít, jsou: polyethylenglykol (M. A. Croyle se spoluautory, *Hum. Gene Ther.* 11, 1713-1722, 2000) a polymery na bázi poly-[N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidu] (L. Seymour se spoluautory, *J. Gene Med. Suppl.* 2(5), 52, 2000).

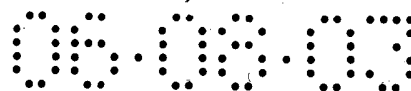
K dosažení specifického nebo selektivního zacílení virových nosičových molekul (a tedy přenášené molekuly) a/nebo fotosenzitizeru

vůči konkrétnímu typu buněk nebo tkání mohou být tyto entity spojeny nebo asociovány se specificky zacílujícími molekulami, které napomohou specifickému buněčnému pohlcení přenášené molekuly do požadovaných buněk nebo tkání. Takové zacílující molekuly mohou také nasměrovat přenášenou molekulu a/nebo fotosenzitizer do intracelulárních oddílů, které jsou zvláště přínosné k dosažení fotochemické internalizace.

Použito může být mnoho různých směrovacích molekul, například jak popisují D. T. Curiel v Ann. New York Acad. Sci. 886, 158-171, 1999; G. Bilbao se spoluautory v Gene Therapy of Cancer (vydavatelé Walden a spol., Plenum Press, New York, 1998); K. W. Peng a S. J. Russell v Curr. Opin. Biotechnol. 10, 454-457, 1999; a T. J. Wickham v Gene Ther. 7, 110-114, 2000.

Kromě toho je důležité připomenout, že spíše než to, že musejí být navázána na specifické nosiče, je v oboru známo, že některá fotosenzitizující činidla, vhodná pro použití ve způsobech podle předkládaného vynálezu, vykazují přednostní vnitřní soustředování do určitých tkáňových míst. Například určité fotosenzitizující sloučeniny, jako jsou hematoporfyrinové deriváty, jsou známé schopností koncentrovat se přednostně nebo výběrově (selektivně) v nádorových tkáních nebo v jiných lezích. Několik dalších příkladů je popsáno Boylem a Dolphinem (Photochem. Photobiol. 64, 469-485, 1996). Takové přednostní soustředování může být ve způsobech podle předkládaného vynálezu škodlivé.

Zacílující molekula může být asociována, navázána nebo konjugována s virovým nosičem, s fotosenzitizujícím činidlem nebo s oběma látkami a použít lze stejný nebo odlišný nosič, nebo stejné či odlišné zacílující molekuly.



Takové zacílující molekuly nebo nosiče, jak byly popsány výše, mohou být také použity k nasměrování virového nosiče nebo fotosenzitizujícího činidla do konkrétních intracelulárních oddílů, zvláště výhodných pro použití PCI, například do lysosomů nebo endosomů.

Předpokládá se, že přenášená molekula v cytosolu buňky poté, co nastal krok ozáření, uvolňující přenášené částice z intrabuněčných oddílů, zůstává nejprve spojená s virovým nosičem. Jakmile byly přenášené částice internalizovány do cytosolu buněk, budou možné děje záviset na zvoleném virovém nosičovém systému. Například při použití adenoviru obvykle adenovirové částice (spojené s přenášenou molekulou) putují do jádra, načež virová DNA (a tedy i přenášená molekula nukleové kyseliny) vstupuje do jádra buňky. V každém případě, pokud je přenášená molekula nukleové kyseliny začleněna do virové částice nebo nosiče, po fotochemické internalizaci a po případných následných dějích, závislých na virovém nosiči, by molekula nukleové kyseliny měla být přítomna na správném intracelulárním místě tak, aby mohlo nastat její příslušné intracelulární zpracování, umožňující zavedené přenášené molekule vykonávat její požadovanou funkci.

Například pokud přenášená molekula kóduje požadovaný protein, jsou vyžadovány kroky zpracování, vedoucí k expresi tohoto proteinu. Pokud je přenášenou molekulou molekula DNA, kódující negativní (antisense) DNA molekulu, jsou vyžadovány kroky zpracování, vedoucí ke transkripci RNA z DNA a podobně.

Krok ozáření světlem k aktivaci fotosenzitizujícího činidla může být prováděn postupy, dobře známými v oboru. Například vlnová délka a intenzita světla mohou být zvoleny podle použitého fotosenzitizujícího činidla, s výhodou v dávkové úrovni 40 až 200 J/cm², například 100 J/cm² a při vlnové délce 300 až 800 nm, například 500 až 700 nm. Vhodné světelné zdroje jsou v oboru dobře známé. Doba, po kterou jsou

buňky vystaveny světlu a použité světelné dávky se v metodách podle předkládaného vynálezu mohou lišit. Obecně mohou být vhodné dávky a doby ozařování zvoleny odborníkem v oboru k umožnění protržení intracelulárních oddílů, obsahujících fotosenzitizer a následnému příjmu a/nebo uvolnění přenášených částic do cytosolu. Účinnost internalizace přenášené molekuly do cytosolu se zdá narůstat s rostoucím vystavením světlu. Upřednostňovaná doba v kroku ozáření závisí na fotosenzitizeru, na množství fotosenzitizeru shromážděném v cílových buňkách nebo v tkáni a na překryvu mezi absorpčním spektrem fotosenzitizeru a emisním spektrem světelného zdroje.

Obecně bude trvání kroku ozáření v řádu od minut do několika hodin, například s výhodou do 60 minut, například od 0,5 nebo 1 minuty do 30 minut, například do 10 nebo 15 minut, například od 0,5 minuty do 3 minut nebo od 3 do 10 minut a s výhodou přibližně 7 minut, například 6 až 8 minut.

Vhodné dávky světla mohou být zvoleny odborníkem v oboru a opět budou záviset na typu fotosenzitizeru a na množství fotosenzitizeru, nashromážděného v cílových buňkách nebo tkáních. Například dávky světla, typicky používané k fotodynamické léčbě rakoviny za přítomnosti fotosenzitizeru Photofrinu a protoporfyrinového prekursoru kyseliny 5-aminolevulinové, jsou v rozmezí od 50 do 150 J/cm² a v rozmezí světelného toku menším než 200 mW/cm² k zabránění hypertermie. Dávky světla jsou obvykle nižší, pokud jsou použity fotosenzitizery s vyššími extinkčními koeficienty v červené oblasti viditelného spektra. Ovšem k léčbě nerakovinných tkání, v nichž se shromažďuje menší množství fotosenzitizeru, musí být celkové množství světla podstatně vyšší než u léčby rakoviny.

Způsoby podle tohoto vynálezu budou nevyhnutelně vyvolávat určitou úmrtnost buněk vzhledem k fotochemické léčbě, tj. působení fotosenzitizujícího činidla. Tato smrt buněk nebude na závalu a dokonce může být výhodná u mnoha aplikací, například u léčby rakoviny a může v některých případech zvyšovat léčebný účinek stimulací místní imunitní odpovědi. Ovšem způsoby podle tohoto vynálezu mohou být upraveny tak, že podíl přežívajících buněk je řízen volbou světelné dávky vzhledem ke koncentraci fotosenzitizačního činidla. Takové techniky jsou v oboru známy. Bez ohledu na množství buněk, usmrčených čistým fotochemickým působením, je důležité aby světelná dávka byla řízena tak, že některé z jednotlivých buněk, u nichž se projeví PCI účinek, nejsou usmrceny pouhým fotochemickým ovlivněním (ačkoliv mohou být následně usmrceny působením PCI účinku).

U některých aplikací může být výhodné zachovat po působení PCI větší množství živých buněk. Například u některých způsobů genové léčby je důležité zachovat živé buňky, které umožní expresi proteinu kódovaného přenášenou molekulou nukleové kyseliny. U takových aplikací je výhodné, aby u celé populace nebo prosté většiny buněk, v podstatě u veškerých buněk nebo u jejich významné většiny (například alespoň u 50 %, lépe alespoň u 60, 70, 80 nebo 90 % buněk) nedošlo k usmrcení. To ovšem není vždycky žádoucí, zvláště pokud se PCI používá k zavedení cytotoxických přenášených molekul a následné buněčné usmrcení pak není nevýhodné. Cytotoxické účinky mohou ovšem být dosaženy také za použití například genové léčby, při níž je léčebný gen internalizován do nádorových buněk způsobem podle tohoto vynálezu, například tak, že tyto buňky budou produkovat imunologicky aktivní sloučeniny, které budou indukovat místní imunologické zahubení zbývajících rakovinných buněk, nebo budou indukovat systémovou imunitní odpověď vůči nádorovým buňkám. V takových případech je po PCI léčbě vyžadován pouze podíl živoucích buněk.

Výhodami postupů PCI k internalizaci přenášených molekul ve spojení s virovými nosiči je to, že

- 1) neexistuje žádné omezení velikosti přenášené molekuly, která má být zavedena do buňky, pokud může být tato molekula začleněna do virového nosiče a její virový nosič může být pohlcen cílovou buňkou;
- 2) uváděné způsoby jsou místně specifické v tom, že ovlivněny budou pouze plochy vystavené světlu;
- 3) internalizace virových nosičů je účinnější než standardní virová infekce, pokud se týká podílu buněk, do nichž je zavedena přenášená molekula a/nebo úrovně exprese přenášené molekuly;
- 4) vzhledem ke zvýšené účinnosti internalizace jsou vyžadovány menší dávky a titry virů;
- 5) metoda není onkogenní.

Ztělesnění, u nichž se přenášená molekula (a její virový nosič) přidává k buňkám po kroku ozáření má další výhody v tom, že:

- a) se sníží fotochemické poškození přenášené molekuly a jejího virového nosiče;
- b) se zjednoduší PCI působení na vnitřní leze v kombinaci s chirurgickým zákrokem, neboť po takovém zákroku může být uplatněno fotochemické působení a následně například nitronádorová injekce nebo jiné místní podání virového nosiče (a jeho připojené přenášené molekuly);
- c) způsoby jsou více nezávislé na přesném načasování léčby, tj. na načasování přídatku molekuly, která má být pohlcena buňkami, vzhledem k okamžiku ozáření. To znamená, že zde existuje větší "časové okno" pro léčbu. Je to důležité z toho důvodu, že pohlcení léčebné molekuly se za různých klinických situací může široce lišit a nadto je odhad pohlcení u jednotlivých lezí v

klinické situaci obtížný; z toho důvodu je větší časové okno extrémně výhodné;

- d) dochází k rychlému přemístění přenášené molekuly do cytosolu, čímž se podstatně snižuje možnost lysosomální degradace přenášené molekuly.

Způsoby podle předkládaného vynálezu mohou být použity k zavedení molekul do buněk alternativně k postupům podle dosavadního stavu techniky, jako jsou fúze liposomů, fosforečnanem vápenatým zprostředkovaná transfekce a podobně, jak byly diskutovány výše.

V upřednostňovaném ztělesnění tohoto vynálezu jsou molekuly zaváděny do buněk pro účely genové léčby.

Genová léčba se může provádět za použití mnoha přístupů, z nichž nejvýhodnější může být zvolen odborníkem v oboru v závislosti na konkrétní patogenezi onemocnění.

Jeden přístup zahrnuje cílené usmrcení specifických buněk. Tento přístup je oblíbený při léčbách rakoviny a zahrnuje geny zaměřené vůči cílovým buňkám a následně exprimované k vyvolání buněčného usmrcení. Takové buněčné usmrcení se může provádět přímým mechanismem, například pokud zaváděné geny kódují letální toxin nebo pomocné léčivo (prodrug), udělující buňkám citlivost vůči usmrcení následně podávaným lékem. Alternativně může být buněčné usmrcení nepřímé, například za použití imunostimulačních genů, jako zaváděných genů k provokaci nebo zvýšení imunitní odpovědi vůči cílovým buňkám, nebo za použití genů, kódujících protein, který vyvolává buněčnou smrt interakcí (vzájemnou reakcí) s exogenně přidávanou molekulou (například genu, kódujícího enzym, který aktivuje pomocné léčivo jako HSV-tk, který aktivuje GCV). Vhodné sebevražedné geny, prekursory

kódující geny a imunostimulační geny jsou v oboru dobře známé a doložené.

Další přístup zahrnuje cílovou inhibici genové exprese. Odborníkovi v oboru je známé množství různých postupů pro specifické blokování exprese genu na úrovni DNA, RNA nebo proteinu a kterýkoli z těchto postupů může být použit ve spojení se způsoby podle tohoto vynálezu, které lze použít k zavedení příslušných molekulárních nástrojů k zablokování genové exprese v buňkách. Tedy v upřednostňovaných aspektech tohoto vynálezu je molekulou, jež má být zavedena, sekvence DNA, obsahující nebo schopná transkribovat či exprimovat funkční produkt, který bude na určité úrovni inhibovat genovou expresi v cílových buňkách, například tedy obsahující nebo schopná transkribovat či exprimovat negativní (antisense) molekuly, ribozymy nebo intracelulární protilátky.

Jiný přístup zahrnuje léčbu zmnožením genu, kdy je chorobný stav vyvolán ztrátou funkce genu a chorobu lze léčit zavedením dalších kopií normálního genu do příslušných buněk pacienta. Tedy v dalším upřednostňovaném rysu tohoto vynálezu je molekulou, jež má být zavedena, gen nebo jeho část, se schopností exprimovat funkční produkt k vyrovnaní, kompenzaci jeho nedostatku u pacienta.

Ještě dalším přístupem je cílená oprava mutace, kdy zavedení nukleové kyseliny do příslušných buněk pacienta vede k přímé opravě mutace, jež vyvolává onemocnění, v pacientově DNA. Tyto způsoby jsou v oboru dobře známé a popsány.

Následně po přenosu nukleové kyseliny/genu do buněk způsoby podle předkládaného vynálezu se mohou vložené geny/nukleové kyseliny zapojit do chromosomů hostitelské buňky, nebo zůstat jako extrachromosomální genetické složky (tj. zůstat epizomální).

K indukování některé z popisovaných možností mohou být zvoleny a upraveny vhodné vektory.

Výhodou zavedeného genu, zapojeného do chromosomu je to, že gen může být chromosomální replikací zachováván i po buněčném dělení. Vzhledem k tomu, že dceřiné buňky rovněž obsahují zavedený gen, je možné dosáhnout dlouhodobé, stálé exprese zavedeného genu. V důsledku toho může genová léčba, využívající tento přístup, poskytnout možnost léčby některých poruch. Například v tkáních složených z aktivně se dělících buněk může být cílem zaměřit se na kmenové buňky (menšinovou populaci nerozlišených prekursorových buněk, ze kterých se vyvíjejí zralé, diferencované, tj. rozlišené tkáňové buňky). Zapojení do chromosomu má také své nevýhody, které jsou dobře popsány a zahrnují například nebezpečí vývoje rakoviny, vyvolaného například náhodným zapojením, vedoucím k aktivaci onkogenu.

Genová léčba *ex vivo*, při níž jsou cílové buňky získány od pacienta, ovlivňovány *in vitro* a opět vráceny pacientovi, nabízí příležitost zvolit buňky, u nichž bylo zapojení úspěšné. Například zmnožení buněk *in vitro* a ověření fenotypů pro zřejmé prokázání neoplastické transformace před převedením buněk nazpět pacientovi. Pokud je žádoucí chromosomální zapojení, měla by tedy být upřednostňována léčba *ex vivo*.

Alternativně může být konstruován vektorový systém, začleňující gen/nukleovou kyselinu pro zavedení genů do buněk, v nichž zůstávají jako extrachromosomální složky a mohou být exprimovány ve velkém množství. Pokud se takové buňky aktivně dělí, nemusí se zavedený gen oddělit do dceřiných buněk stejnoměrně a dlouhodobá exprese tak může být problematická. V důsledku toho může být k léčbě genetické poruchy nezbytné opakované ovlivňování, zahrnující přenos genu. Možnost

provádění opakované léčby se v tomto ohledu ovšem velmi zvyšuje s předkládanými způsoby přenosu na bázi PCI, umožňujícími vyšší účinnost cíleného přenosu genů (viz níže). Kromě toho v některých případech nemusí být stálá a dlouhodobá exprese potřebná. Například genová léčba rakoviny často zahrnují přenos a expresi genů do rakovinných buněk s úmyslem je usmrtit. Při takových metodách, jakmile byla eliminována malignita, zhoubnost, není pravděpodobně léčebný gen dále potřebný.

Jak bylo uvedeno dříve, vhodnými virovými systémy pro použití v předkládaném vynálezu jsou adenoviry, adeno-asociované viry, retroviry, lentiviry, viry Herpes, vir Sendai, bakteriofágy, virus neštovic a Baculovirus.

Retriviry mají tu výhodnou vlastnost, že jsou schopné zapojení do chromosomální DNA, ale infikují pouze aktivně se dělící buňky. Sjednocená DNA může být trvale propagována, což nabízí možnost stálé léčby onemocnění. Jejich vlastnost, již je infikování pouze aktivně se dělících buněk, která je nevýhodná pro léčbu mnoha onemocnění, je naopak přínosná pro genovou léčbu rakoviny tkání, které normálně tvoří nedělící se buňky a aktivně se dělící buňky tedy mohou být selektivně infikovány a usmrceny bez většího rizika pro nedělící se buňky normální tkáně.

Adeno-asociované viry vyžadují k vyvolání produktivní infekce, tj. infekce, jejímž výsledkem je vytváření potomstva virionů, současnou infekci pomocným virem (helper virus), jako je adenovirus nebo HSV (virus Herpes simplex). Ovšem chromosomální zapojení, sjednocení DNA může nastat i v nepřítomnosti pomocného viru. Vhodný typ adeno-asociovaného virového vektoru může tedy být zvolen v závislosti na potřebném využití.

Na druhé straně adenoviry infikují i nedělící se buňky. Vstup do buněk nastává receptorově zprostředkovanou endocytózou, ale i když vložená nukleová kyselina putuje do jádra, nezdá se, že se v něm zapojuje a tak exprese vložených genů může být trvalá jen po krátké časové období. Adenovirové vektory mohou být vyráběny ve velmi vysokých titrech a typicky přijímají vložené velikosti až do 7-8 kb, ale nedávný vývoj v technice adenovirových vektorů umožňuje ve speciálně konstruovaných vektorech použití vložených velikostí až do přibližně 30 kb (Kochanek, Hum. Gene Ther. 10, 2451-2459, 1999).

Vzhledem k jejich schopnosti infekce mnoha rozdílných typů buněk, adenoviry našly nejširší použití a jsou oblíbenými vektory pro použití v *in vivo* strategiích genové léčby. Adenoviry jsou skutečně upřednostňovanými virovými nosiči pro použití ve způsobech podle předkládaného vynálezu.

Ačkoliv adenoviry patří mezi nejúčinnější vektory pro dodání genu *in vivo*, jejich použití je ovšem komplikováno několika vážnými problémy, například imunologickými reakcemi vůči viru, přechodnou genovou expresí a špatnou tkáňovou distribucí, vedoucí k nízké účinnosti transdukce v cílových tkáních. Také schopnost omezit expresi adenovirem dodaných léčebných genů na cílové buňky je obtížná, ovšem může být velmi důležitá k zabránění záporných vedlejších účinků, vyvolaných například expresí toxického genového produktu (např. určeného k usmrcení rakovinných buněk) v normálních tělních buňkách, například ve vitálních orgánech, jako jsou játra. Jiné virové nosiče pro použití v genové léčbě mají podobné nevýhody.

Použití fotochemické internalizace ve spojení se způsoby podle předkládaného vynálezu může zlepšit některé z těchto sporných otázek. Jednak může použití PCI podstatně zvýšit úroveň a rozsah transgenní exprese v cílových tkáních (tj. může vést k většímu počtu buněk,

exprimujících vyšší hladiny transgenu): Kromě toho bylo prokázáno, že PCI zvyšuje účinnost virové infekce, takže k vytvoření stejného množství genové transdukce je vyžadována významně nižší dávka viru, než je tomu v nepřítomnosti PCI. Tato účinnost pomocí PCI zvýšené virové infekce a nižší násobnost virových hodnot (MOI) by měly umožnit virovou transdukci v tkáňových oblastech, vykazujících nízkou prostupnost viru, čímž by byla umožněna transdukce v oblastech, přijímajících příliš málo virových částic pro účinnosť transdukci běžnou infekcí. Vzhledem k tomu, že při místní aplikaci se předpokládá rychlý pokles koncentrace viru v tkáních v závislosti na rostoucí vzdálenosti od místa aplikace, jedná se o velmi důležité zlepšení techniky infekce virem.

Další výhodou pomocí PCI indukovaného zvýšení účinnosti virové infekce je to, že za udržení účinnosti transdukce mohou být použity nižší dávky viru, což snižuje imunologické problémy, spojené s genovou léčbou, zprostředkovanou adenoviry a jinými viry. Konečně fotochemické ovlivnění může být použito ke zvýšení specifčnosti infekce vzhledem k cílovým buňkám. To je dáno zaprvé tím, že PCI jsou podrobeny pouze ozářené oblasti a za druhé tím, že některé fotosenzitizéry se přirozeně hromadí především v oblastech onemocnění. Schopnost zaměřit aktivitu léčebného genu do místa onemocnění jednoduše osvětlením oblasti onemocnění je velmi příznivým aspektem předkládaného vynálezu, který by měl do vysoké míry umožnit vyvarování se nežádoucích vedlejších účinků, způsobených expresí léčebného genu na "špatných" místech těla.

Schopnost PCI umožnit použití nižších dávek genového léčebného činidla bude také přispívat ke snížení vedlejších účinků. Předpokládá se, že specifčnost, jíž lze dosáhnout, učiní proveditelným systémové podávání adenoviru a dalších virových nosičů. Nadto, jak bylo diskutováno výše, ovlivnění pomocí PCI by bylo možné také kombinovat

s cílenými vektory, které případně dále zlepší specifičnost dodání genu do buněk.

Jak bylo diskutováno při předchozím používání PCI, předpokládá se, že účinek PCI na komplexy plasmid/polylysin, který zvyšuje transfekci a účinek, který zvyšuje dodání dalších molekul, jako např. proteinů, je vyvolán světelně indukovaným protržením endocytických měchýřků. Aniž by bylo žádoucí vázat se teorií, zdá se pravděpodobné, že by stejný mechanismus mohl být zapojen ve stimulaci adenovirem zprostředkované transdukce genu. Ovšem na rozdíl od komplexů plasmid/polylysin a dalších molekul, jako např. proteinů, je unikání adenovirů z endosomů považováno za účinný způsob, při němž bylo popsáno, že více než 40 % buněčně vázaných virových částic dosáhne buněčného jádra (U. F. Greber se spoluautory, *Cell* 75, 477-486, 1993; P.L. Leopold se spoluautory, *Hum. Gene Ther.* 9, 367-378, 1998).

Z údajů, které byly popsány v literatuře, by bylo možné předpokládat, že pokud by PCI byla schopná indukovat jaderný přenos všech buněčně vázaných virových částic, mohla by PCI zvýšit účinnost adenovirové transdukce genu nanejvýš 2,5 násobně. Bylo proto zcela překvapivé, že lze pozorovat více než dvacetinásobné zvýšení transdukce genů, indukované prostřednictvím PCI a autoři tohoto vynálezu dosud nemají žádné dobré vysvětlení tohoto neočekávaně širokého účinku. Jednou z možností je, že virové částice podrobené PCI mohou mít vyšší "vnitřní transdukční účinnost" (inherent transduction efficiency) než viry normální infekce, například díky odlišnému mechanismu uvolňování z endosomů. Je také možné, že endosomální uvolnění adenovirů při normální infekci je méně účinné při nízké násobnosti infekce (MOI, multiplicity of infection), kde PCI vykazuje nejlepší účinek. Je také možné, že fotochemické působení může ovlivnit další procesy, jako pohlcení viru, jaderný přenos nebo transkripci transgenu.

V dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje farmaceutické prostředky, zahrnující přenášenou molekulu spojenou s virovým nosičem a fotosenzitizujícím činidlem, s výhodou pro použití k léčbě. Fotosenzitizující činidlo může být v prostředcích volitelně spojeno s molekulami virového nosiče nebo s jinými nevirovými nosičovými molekulami, jako jsou ta, popsána výše. Virový nosič je s výhodou sám spojen či konjugován s jednou nebo s více z nosičových molekul (s výhodou jsou to polykationty nebo kationtové lipidy), ze zacílujících molekul nebo ze zacílujících vektorů, anebo je k nim připojen. Volitelně mohou být virový nosič či fotosenzitizující činidlo, nebo obě tyto složky, spojeny se stejnými nebo s odlišnými zacílujícími molekulami, jak bylo popsáno výše. Prostředky jsou s výhodou určeny pro použití v genové léčbě.

Pro genovou léčbu je upřednostňovanou molekulou virového nosiče adenovirus, nebo od něho odvozený virový nosič. Stavy, onemocnění a infekce, které jsou zvláště vhodné pro genovou léčbu, zahrnují rakovinné nádory, například karcinomy bazálních buněk, dysplazie a jiné nárůsty, revmatoidní artritidu, aterosklerózu, virové a jiné infekce, lupénku, sluneční keratózu, léčbu poranění, léčbu zlomenin, bradavice a vrozené genetické poruchy jako cystickou fibrózu, Gorlinův syndrom, ataxii telangiectasia a metabolické poruchy.

Upřednostňovanými geny pro použití jako přenášené molekuly při genové léčbě jsou geny, kódující enzymy, které aktivují pomocná činidla, léčiva (prodrug), jako jsou thymidinkináza nebo cytosindeamináza viru Herpes simplex; proteinové toxiny jako jsou záškrťový toxin nebo gelonin, apoptózu indukující proteiny jako jsou p53 nebo apopoptin; imunitní stimulační faktory jako jsou interleukiny (s výhodou IL-2, IL-12, IL-18), faktor nekrózy tumorů α , chemokiny; tumorově specifické antigeny jako jsou mutované proteiny ras nebo Mart-1; imunitní/záněťové

inhibitory jako jsou interleukin-10, IL-1 receptorový antagonist a nebo rozpustný TNF-receptor (receptor pro faktor nekrózy tumoru); inhibitory angiogeneze jako je endostatin; proteiny indukující tvorbu cév jako je vaskulární endoteliální růstový faktor; proteiny zahajující koagulaci (srážlivost) je jako tkáňový faktor; intracelulární protilátky; rekombinantní imunotoxiny; ribozymy nebo negativní (antisense) molekuly RNA a podobně.

V dalším aspektu tedy předkládaný vynález poskytuje použití přenášené molekuly spojené s virovým nosičem a fotosenzitizujícím činidlem, jak zde byly popsány, k přípravě léčiva pro použití k léčbě a s výhodou ke genové léčbě. Pro uvedená použití se fotosenzitizující činidlo a s virem spojená přenášená molekula uvedou do styku s buňkami nebo s tkáněmi pacienta a to buď společně, nebo odděleně, za zvolení vhodných časů (dob) podávání a zmíněné buňky jsou ozářeny tak, jak bylo popsáno výše, světlem o vlnové délce účinné k aktivaci fotosenzitizujícího činidla.

Způsoby ovlivnění a zvláště způsoby genové léčby, zahrnující způsoby podle tohoto vynálezu, vytvářejí alternativní aspekty vynálezu. Vynález tedy poskytuje způsob léčby nebo prevence onemocnění, poruchy nebo infekce pacienta genovou léčbou, zahrnující zavedení přenášené molekuly do jedné nebo více z buněk způsoby *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo* podle způsobu, který zde byl dříve popsán a pokud je to potřebné (tj. pokud se transfekce provádí *in vitro* nebo *ex vivo*), podání uvedených buněk zmíněnému pacientovi.

Tak, jak je zde definován, týká se výraz "léčba" či "ovlivnění" týká snížení, zmírnění nebo odstranění jednoho nebo více z příznaků onemocnění, poruchy nebo infekce, které mají být léčeny a to vzhledem k příznakům, pozorovaným před léčbou. "Prevence" se týká opoždění

nebo zabránění nástupu příznaků takového onemocnění, poruchy nebo infekce.

Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou také zahrnovat buňku nebo populace buněk, obsahující přenášenou molekulu, která byla do uvedené buňky či buněk zavedena způsoby podle tohoto vynálezu, s výhodou pro použití v léčbě a zvláště pak genové léčbě.

V ještě dalším aspektu tedy tento vynález poskytuje buňku nebo populaci buněk, obsahující přenášenou molekulu, která byla do uvedené buňky či buněk zavedena, přičemž tato buňka či buňky jsou získatelné způsobem podle předkládaného vynálezu.

Ještě další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje použití takové buňky nebo buněčné populace k přípravě prostředku nebo léčiva pro použití v léčbě a s výhodou genové léčbě.

Tento vynález dále poskytuje způsob léčby pacienta, zahrnující podávání buněk nebo prostředků podle předkládaného vynálezu zmíněnému pacientovi. Uvedené způsoby jsou s výhodou použity ke genové léčbě, to znamená způsob, zahrnující kroky zavedení molekuly do buňky, jak zde byly popsány výše a podávání takto připravených buněk zmíněnému pacientovi.

In vivo může být použit jakýkoliv způsob podávání virových nosičů, fotosenzitizujících činidel, buněk obsahujících přenášené molekuly, prostředků a podobně, který je v oboru běžný nebo standardní, například intramuskulární, subkutánní, intraperitoneální, intratumorální nebo intravenózní injekce, infuze, inhalace nebo místní nanesení a to jak na vnitřní, tak i na vnější tělní povrchy a podobně. Při použití *in vivo* může být vynález použit ve vztahu k jakékoliv tkáni obsahující buňky, do nichž se mohou soustředit fotosenzitizující činidlo a virový nosič, což zahrnuje soustředění do tělních tekutin i do pevných tkání. Veškeré

tkáně mohou být léčeny či ovlivňovány tak dlouho, dokud je fotosenzitizer vychytáván cílovými buňkami a světlo může být řádně dodáváno. Pokud se týká dodávání světla, zjevně nejsou žádné problémy, pokud se týká vnějších povrchů lidského nebo zvířecího těla. Pro vnitřní povrchy je k účinnému ozáření mnoha vnitřních povrchů možné použít takové techniky, jakými jsou například využití zařízení s optickými vlákny. Kromě toho se může léčba provádět v kombinaci s chirurgickým zákrokem zpřístupňujícím povrchy, které mají být léčeny.

Prostředky podle tohoto vynálezu tedy mohou být formulovány jakýmkoliv vhodným způsobem, technikami a postupy známými ve farmaceutickém oboru, například za použití jednoho nebo více z farmaceuticky přijatelných nosičů nebo pomocných látek (tj. takových, které jsou slučitelné s dalšími přísadami v prostředku a fyziologicky přijatelné pro příjemce). Povaha prostředků a nosičových nebo pomocných materiálů, dávkování a podobně mohou být zvoleny rutinním způsobem podle přání a požadovaného způsobu podávání, účelu léčby a podobně. Prostředky podle tohoto vynálezu mohou také obsahovat jiná vhodná činidla. Například při některých léčebných aplikacích a při některých způsobech podávání může být výhodné použít například činidla, která jsou schopná zvýšit pronikání virového nosiče do tkání, například proteáz (N. Kuriyama se spoluautory, Hum. Gene Ther. 11, 2219-2230, 2000).

Prostředky mohou být podávány místně (například intestinálním, bukálním, sublingválním, gingiválním, palatálním, nasálním, pulmonárním, vaginálním, rektálním nebo okulárním podáním), orálně nebo parenterálně. Přednost se dává místně nanášeným prostředkům a ty zahrnují gely, krémy, mastě, spreje, pleťové vody, balzámy, tyčinky, mýdla, prášky, tablety, filmy, pesary, aerosoly, kapky, roztoky a kterékoliv z dalších farmaceutických forem, běžných v tomto oboru.

Mastě, gely a krémy mohou být například formulovány s vodným nebo olejovým základem za přídavku zahušťovacích a/nebo želírujících činidel. Lotiony, neboli pleťové vody mohou být formulovány s vodným nebo olejovým základem a budou obecně rovněž obsahovat jedno nebo více z emulgačních, dispergujících, suspendujících, zahušťovacích nebo zabarvujících činidel. Prášky mohou být formovány za pomoci jakéhokoliv vhodného práškového základu. Kapky a roztoky mohou být formovány s vodným nebo nevodným základem a rovněž mohou obsahovat jedno nebo více z dispergujících, solubilizačních nebo suspenzních činidel. Aerosolové spreje jsou výhodně uvolňovány z tlakových nádob, za použití vhodné hnací látky.

Alternativně mohou být prostředky poskytovány ve formě, upravené pro orální nebo parentální podávání. Alternativní farmaceutické formy tedy zahrnují jednoduché nebo potahované tablety, tobolky, suspenze a roztoky, obsahující aktivní složku volitelně spolu s jedním nebo více z inertních běžných nosičů a/nebo ředidel, například s kukuřičným škrobem, laktózou, sacharózou, mikrokrytalickou celulózą, stearátem hořečnatým, polyvinylpyrrolidonem, kyselinou citronovou, kyselinou vinnou, vodou, vodou/ethanolem, vodou/glycerolem, vodou/sorbitolem, vodou/polyethylenglykolem, propylenglykolem, stearylalkoholem, karboxymethylcelulózą nebo s tukovými látkami, jako s tvrdým tukem nebo s jeho vhodnými směsmi.

Prostředky mohou nádavkem zahrnovat lubrikační (kluzná) činidla, zvlhčující činidla, emulgační činidla, suspenzní činidla, konzervační činidla, sladidla, příchutě, činidla zvyšující adsorpci, například činidla zvyšující pronikání povrchem jak bylo popsáno výše a podobně. Prostředky podle tohoto vynálezu mohou být formulovány tak, aby poskytovaly rychlé, prodloužené nebo opožděné uvolňování aktivní

příspěvy po podání pacientovi za použití postupů, které jsou v oboru dobře známé.

Použita mohou být také solibilizační a/nebo stabilizační činidla, například cyklodextriny (CD) α , β , γ a HP- β cyklodextrin.

Dávkování může být obdobně stanoveno rutinním způsobem a může záviset na povaze molekul, cíli léčby, věku pacienta, způsobu podávání a podobně. Ve spojení s fotosenzitizujícím činidlem by měla být rovněž uvažována možnost/schopnost rozrušit membrány při ozáření. Obecně ovšem je pro použití *in vitro* vhodné koncentrační rozmezí fotosenzitizeru například od 0,05 do 500 $\mu\text{g/ml}$. Pro humánní léčbu *in vivo* může být fotosenzitizující činidlo použito v rozmezí od 0,05 do 20 mg/kg tělesné hmotnosti při systematickém podávání, nebo v rozmezí od 0,1 do 20 % v rozpouštědle pro místní nanášení. U menších zvířat může být koncentrační rozmezí odlišné a může být odpovídajícím způsobem upraveno.

Molekula, která má být zavedena ve spojení s virovým nosičem, může být přítomna v koncentraci 1×10^{-9} až 50 %, jako 3×10^{-6} až 50 %, například 0,003 až 30 %, například 0,2 až 10 % (hmotnost/hmotnost) virových částic v konečném prostředku pro použití *in vivo*, přičemž údaj hmotnost/hmotnost se týká hmotnosti virového nosiče přidávaného k molekule, jež má být zaváděna, vzhledem k hmotnosti celkového prostředku. Pokud se používá injekce o objemu 1 ml, bude odpovídat dávce přibližně 10^5 až 10^{15} fyzických virových částic. Pro aplikace *in vitro* může být použito 1 až 1×10^5 fyzických virových částic, například 1×10^3 až 1×10^5 částic na buňku.

Vynález bude nyní popsán podrobněji v následujících Příkladech na něž se neomezuje a ve vztahu k doprovázejícím obrázkům.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje X-gal barvení buněk WiDr po fotochemické transdukci. Buňky byly ovlivněny prostřednictvím AlPcS_{2a} (S), infikovány AdHCMV-lacZ (Ad) při MOI 5 a podrobeny světelnému ovlivnění, jak je uvedeno na obrázku. Po 2 dnech inkubace k umožnění exprese transdukovaného β -galaktosidázového genu byly buňky barveny prostřednictvím X-gal a analyzovány mikroskopicky tak, jak bylo popsáno. Buňky byly ovlivňovány následovně: A: bez ovlivnění; B: pouze adenovirus; C: AlPcS_{2a} + 8 minut osvit; D: AlPcS_{2a} + adenovirus + 8 minut osvit.

Obr. 2 znázorňuje analýzu fotochemicky zvýšené transdukce u buněk HCT 116 (část A) a WiDr (část B) průtokovou cytometrií. Buňky byly ovlivněny AlPcS_{2a} (S), infikovány AdHCMV-lacZ (Ad) při MOI 5 a podrobeny světelnému ovlivnění, jak je uvedeno na obrázku. Po 2 dnech byly buňky doplněny di- β -D-galaktopyranosidem fluoresceinu a analyzovány průtokovou cytometrií. Obr. 2A znázorňuje bodový diagram analýzy průtokovou cytometrií buněk HCT 116. Buňky na pravé straně svislé linie byly považovány za pozitivní ve vztahu k adenovirové transdukci, neboť v této oblasti nebyly prakticky žádné buňky ani v případě neovlivňovaných buněk (horní políčko), ani v případě buněk ovlivněných pouze AlPcS_{2a} a světlem (spodní políčko). V každém z políček na Obr. 2A je uvedeno odlišné ovlivnění buněk. Obr. 2B ukazuje účinnost transdukce jako funkci světelné dávky u buněk WiDr. Na obr. 2B je procento buněk, pozitivních vzhledem k β -galaktosidáze, definováno tak, jak je popsáno u obr.2A: prázdné čtverečky = S-, Ad+; plné trojúhelníčky = S+, Ad-; plná kolečka = S+, Ad+; a hodnocena byla také průměrná intenzita fluorescence (prázdná kolečka = S+, Ad+). Svislé úsečky představují standardní chybu průměru (SEM)² až 5 různých pokusů.

Obr. 3 znázorňuje transdukci buněk WiDr, zvýšenou prostřednictvím PCI při různých dávkách viru. Buňky byly infikovány AdHCMV-lacZ při různé MOI a byly podrobeny fotochemickému ovlivnění, jak je uvedeno na obrázku. Obr. 3A znázorňuje průměrnou fluorescenci celkové buněčné populace. Ovlivnění bylo následovné: prázdné sloupce = pouze AlPcS_{2a} ; úhlopříčně šrafované sloupce = MOI 1; šedé sloupce = MOI 5; vodorovně šrafované sloupce = MOI 20; plně sloupce = MOI 50. Úsečky udávající chybu jsou SEM ze tří pokusů. Obr. 3B znázorňuje násobnost zvýšení aktivity β -galaktosidázy u celkové buněčné populace. Použité symboly jsou stejné jako u Obr. 3A. Úsečky udávající chybu jsou SEM ze tří nebo čtyř pokusů.

Obr. 4 znázorňuje účinek fotochemického ovlivnění na adenovirovou transdukci buněk THX (buněčná linie lidského melanomu).

Obr. 5 znázorňuje účinek fotochemického ovlivnění na expresi β -galaktosidázy v buňkách THX, infikovaných prostřednictvím AdHCMV-lacZ. Při strategii "osvit předem" byly buňky předem ovlivněné AlPcS_{2a} inkubovány po další 4 hodiny v médiu bez přítomnosti AlPcS_{2a} a poté vystaveny světlu na dobu 3 minut. Po ozáření byly buňky během 30 minut při 37 °C infikovány AdHCMV-lacZ (při MOI 1). Následně byly přidány 2 ml média a buňky byly dva dny inkubovány před analyzováním exprese β -galaktosidázy. Při strategii "osvit následně" byly buňky předem ovlivněné AlPcS_{2a} inkubovány po další 3 hodiny v médiu bez přítomnosti AlPcS_{2a} a během 30 minut byly infikovány AdHCMV-lac. Následně byly přidány 2 ml média a buňky byly inkubovány dalších 30 minut a následně ozařovány po dobu 3 minut. O dva dny později byla analyzována exprese β -galaktosidázy.

Obr. 6 znázorňuje zvýšení produkce β -galaktosidázy v důsledku pomocí PCI zprostředkované transdukce adenovirem, kódujícím

β -galaktosidázu, při rostoucích dobách ozáření. Ovlivnění (+, - označuje "s" nebo "bez") a světelné dávky (délky ozáření) jsou uvedeny v obrázku. Adv = adenovirus AdHCMV-LacZ; S = fotosenzitizer ALPcS_{2a}.

Obr. 7 znázorňuje účinek PCI na transdukci buněk WiDr při různé násobnosti infekce. Prázdné čtverečky = bez ozáření; plné čtverečky = 90 sekund ozáření.

Obr. 8 znázorňuje účinek PCI na adenovirovou transdukci buněk A549. Ovlivnění (+, - označuje "s" nebo "bez") a světelné dávky (v minutách) pro různé vzorky jsou uvedené v obrázku. Adv = adenovirus AdHCMV-LacZ; S = fotosenzitizer ALPcS_{2a}.

Obr. 9 znázorňuje účinek PCI na transdukci buněčných linií HeLa a FmexIII. Prázdné sloupce = bez ozáření; plné sloupce = 90 sekund ozáření.

Obr. 10 znázorňuje účinek PCI na transdukci buněk WiDr adenovirem, spojeným s poly-L-lysinovým nosičem. Adv = adenovirus AdHCMV-LacZ; PLL = poly-L-lysin; 5PLL/Ad = komplex, průměrně obsahující 5 PLL molekul na virovou částici. Prázdná kolečka = Ad, MOI 5; plné čtverečky = 5 PLL/Ad; plná kolečka = 500 PLL/Ad; prázdné čtverečky = 250 PLL/Ad; plné trojúhelníčky = 50 PLL/Ad.

Obr. 11 znázorňuje účinek PCI na adenovirovou transdukci buněčné linie lidských kožních fibroblastů za použití poly-L-lysinu jako virového nosiče při různých dobách ozáření. Prázdné čtverečky = MOI 5: nekomplexovaný adenovirus AdHCMV-LacZ. Plné čtverečky % MOI 5/PLL: AdHCMV-LacZ komplexovaný 250 molekulami PLL na virovou částici.

Obr. 12 znázorňuje účinek PCI na adenovirovou transdukci za použití kationtového dendrimeru SuperFect® jako virového nosiče při různých koncentracích. Prázdné sloupce = bez ozáření; plné sloupce = 90 sekund ozáření.

Obr. 13 znázorňuje účinek různých časových uspořádání ozáření a podání adenoviru. Časové body na levé straně osy Y představují virus přidávaný před ozářením, časové body na pravé straně osy Y představují virus přidávaný po ozáření. Plné čtverečky - 1 minutové ozáření; prázdné čtverečky - bez ozáření.

Obr. 14 znázorňuje zvýšení genového léčebného účinku adenovirového vektoru, kódujícího thymidinkinázu viru Herpes simplex, prostřednictvím PCI, při různých dobách ozáření. Usmrcení buněk bylo provedeno ganciclovirem po genové transdukci adenovirovým vektorem kódujícím HSV-tk, přičemž tato transdukce byla indukována pomocí PC, AI = AlPcS_{2a} ; AdV-TK = adenovirus, kódující HSV-tk; GCV = ganciclovir; plné kosočtverečky = pouze AI; prázdné čtverečky = AI + AdV-TK; prázdné trojúhelníčky = AI + GCV při dávce 10 $\mu\text{g/ml}$ (A), 25 $\mu\text{g/ml}$ (B) nebo 100 $\mu\text{g/ml}$ (C); plné čtverečky = AI + AdV-TK + GCV při dávce 10 $\mu\text{g/ml}$ (A), 25 $\mu\text{g/ml}$ (B) nebo 100 $\mu\text{g/ml}$ (C).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

V počátečních pokusech byly lidské buňky adenokarcinomu WiDr ovlivněny fotosenzitizerem AlPcS_{2a} (hlinitý ftalocyanin se dvěma sulfonátovými skupinami na přilehlých kruzích), infikovány adenovirem AdHCMV-LacZ, obsahujícím reportérový gen β -galaktosidázy a podrobeny ozáření tak, jak je popsáno v protokolu pokusů. Buňky byly

barveny vzhledem k aktivitě β -galaktosidázy a mikroskopii bylo prokázáno, že podstatný podíl světlem ovlivněných buněk exprimoval transgen (Obr. 1D), zatímco mezi neozářenými, adenovirem infikovanými buňkami bylo nalezeno pouze několik pozitivních buněk (Obr. 1B). Žádné pozitivní (kladně reagující) buňky nebyly nalezeny v neovlivňovaných vzorcích (Obr. 1A) nebo ve vzorcích, ovlivněných pouze AlPcS_{2a} a světlem, ne však adenovirem (Obr. 1C). Pozorované světlem indukované zvýšení exprese β -galaktosidázy tedy pocházelo od adenovirem dodaného transgenu a ne od endogenního, vnitřního genu β -galaktosidázy.

Příklad 2

Pro kvantitativní analýzu byla použita průtoková cytometrie za použití di- β -D-galaktosidu fluoresceinu, který činí buňky exprimující β -galaktosidázu fluorescentními. Jak je zřejmé z Obr. 2A, fotochemické ovlivnění podstatně zvyšuje β -galaktosidázovou aktivitu adenovirem infikovaných buněk HCT 116. Procentní množství buněk pozitivních vůči β -galaktosidáze se tedy zvýšilo z $6,3 \pm 0,1$ % (směrodatná odchylka, $n=3$) u normálně infikovaných buněk (Ad^+ , S^- , 0 minut osvitu) na 88 ± 17 % ($n=3$) u buněk, které byly podrobeny optimálnímu ovlivnění (Ad^+ , S^+ , 8 minut osvitu).

Podobně vzrostla u vzorků průměrná intenzita fluorescence z 52 ± 11 % ($n=3$) na 632 ± 163 % ($n=3$) poměrných fluorescenčních jednotek (RFU, relative fluorescence units). Fotochemické ovlivnění rovněž slabě zvyšuje průměrnou fluorescenci neinfikovaných buněk (Obr. 2A, horní a dolní čtvereček) ze 6 na 12 RFU. Ovšem vzhledem k velmi nízkým úrovním fluorescence u pozitivních buněk (0,4 % u vzorku Ad^- , S^+ , 8 minut osvitu) to nevyvolává obtíže v interpretaci výsledků u virem infikovaných buněk.

U buněk WiDr karcinomu tlustého střeva byla pozorována dokonce ještě silnější na světle závislé zvýšení genové transdukce (Obr. 2B). Při srovnání ozářených, virem infikovaných buněk a neozářených buněk bylo zjištěno maximálně 22-násobné zvýšení procentního množství buněk pozitivních vzhledem k β -galaktosidáze a 44-násobné zvýšení průměrné intenzity fluorescence. Samotné fotochemické ovlivnění (Obr. 2B, Ad-, S+, plné trojúhelníčky) procentní množství pozitivních buněk významně nezměnilo, stejně jako samotné ozáření (Obr. 2B, Ad+, S-, prázdné čtverečky).

Výsledky průtokové cytometrie byly potvrzeny za použití sady pro stanovení chemiluminiscentního β -Gal reportérového genu (Roche, katalogové číslo 1 758 241) v extraktech z buněk WiDr, které prokázalo 30-násobné zvýšení β -galaktosidázové aktivity v důsledku fotochemického ovlivnění (není zobrazeno).

Příklad 3

Autoři vynálezu dále studovali účinek dávky viru na fotochemicky zvýšenou účinnost transdukce. Z Obr. 3 je zřejmé, že fotochemické ovlivnění zvýšilo transdukci v případě všech testovaných dávek viru. Účinek však byl zřetelnější při nižších dávkách viru (MOI 1 a 5), u nichž byl pozorován 15-násobný až 35-násobný nárůst průměrné fluorescence, zatímco při MOI 20 a 50 byl pozorován 10-násobný a 5-násobný nárůst (Obr. 3B). Rovněž je zřejmé (Obr. 3A), že průměrná fluorescence, získaná při optimální světelné dávce (7 minut osvitu) při MOI 5 představuje přibližně dvojnásobnou úroveň, pozorovanou bez světelného ovlivnění u MOI 50. Podobně je úroveň dosažená se světelným ovlivněním při MOI 1 přibližně stejná jako pro MOI 20 bez světelného ovlivnění. Při optimálním fotochemickém ovlivnění je tedy k

dosažení stejné hladiny genové transdukce ve srovnání s infekcí bez fotochemického ovlivnění dostačující 20-násobně nižší dávkou viru.

Procentní množství buněk pozitivních vzhledem k β -galaktosidáze, získané v tomto pokusu při MOI 50, bylo 90 ± 3 % ($n=3$) ve srovnání s 13 ± 4 % ($n=3$) pro neozářené buňky. Spolu s výsledky, získanými u buněk HCT 116, které byly uvedeny výše, to prokazuje, že za použití adenovirové PCI může dojít k transdukci celé buněčné populace.

Protokoly pokusů

Buňky a adenovirus

Buňky HCT 116 a WiDr lidského karcinomu tlustého střeva byly získány z americké sbírky kultur (American Type Culture Collection, ATCC č. CCL-247 a CCL-218). Buňky byly pěstovány v kultivačním médiu RPMI 1640, doplněném 10% fetálním telecím sérem, penicilinem v koncentraci 100 U/ml, streptomycinem v koncentraci 100 U/ml a 2 mmol.l⁻¹ glutaminem (všechny reagenty Gibco-BRL, Paisley, Velká Británie) při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂.

Rekombinantní adenovirus AdHCMV-lacZ, kódující gen *E. coli* lacZ, řízený promotorem lidského cytomegaloviru, byl získán homologní rekombinací za použití systému pJM17 v 293 buňkách (Addison se spoluautory, J. Gen. Virol. 78, 1653-1661, 1997). Rekombinantní vektory byly plakově čištěny, pěstovány do vysokého titru v 293 buňkách a čištěny rozvrstvením prostřednictvím CsCl (Hitt se spoluautory, Methods Mol. Genet. 7, 13-30, 1995). Roztok viru byl naředěn v PBS (fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku), obsahujícím 0,68 mmol.l⁻¹ CaCl₂ a 0,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂ na MOI, použitou v různých pokusech.

Fotochemické ovlivnění

50 000 buněk na jamku bylo zaočkováno na šestijamkové destičky (Costar) a inkubováno přes noc při 37 °C. Přidán byl 1 ml média, obsahujícího 20 mg/ml ALPcS_{2a} (Phorphyrin Products, Logan, UT), buňky byly inkubovány 18 hodin při 37 °C, promyty trojnásobně médiem a inkubovány další 3 hodiny při 37 °C. Médium pak bylo odstraněno a přidáno bylo 200 µl AdHCMV-lacZ. Po 30 minutách inkubace při 37 °C byly přidány 2 ml média a buňky byly inkubovány 30 minut před vystavením červenému světlu (Phillips TL 20 W/09, filtrovanému přes filtr Cinemoid 35, o světelné intenzitě dopadající na buňky 13,5 W/m²). Před analýzou β-galaktosidázové aktivity byly buňky inkubovány dva dny při 37 °C.

X-gal barvení buněk

Pro X-gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosidové) barvení bylo médium odstraněno, přidán byl 1 ml fixačního roztoku (0,05% glutaraldehyd v PBS) a buňky byly inkubovány 15 minut při teplotě místnosti. Fixační roztok byl odstraněn a buňky byly trojnásobně promyty PBS při teplotě místnosti (první a třetí promytí bylo prováděno rychle, druhé promytí trvalo 10 minut). Přidán byl 1 ml roztoku X-gal (5 mmol.l⁻¹ K₃Fe(CN)₆, 5 mmol.l⁻¹ K₄Fe(CN)₆, 1 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 1 mg/ml X-gal) a buňky byly inkubovány 4 hodiny až přes noc při 37 °C a sledovány mikroskopicky (při 100-násobném zvětšení) za použití mikroskopu Axiovert S100 (Zeiss) s kamerou MC100 Spot (Zeiss).

Analýza průtokovou cytometrií

Buňky byly trypsinizovány, odstředěny, resuspendovány v 25 ml média a inkubovány 5 minut při 37 °C. Přidáno bylo 25 ml

di- β -D-galaktopyranosidu fluoresceinu (Molecular probes, Eugene, OR) a buňky byly inkubovány 1 minutu při 37 °C před naředěním přídatkem 450 ml ledově chladného růstového média. Vzorky byly uchovávány v ledu po dobu 30 až 60 minut a zfiltrány přes nylonový filtr o velikosti otvorů 50 μ m. Poté byly buňky analyzovány za použití průtokového cytometru FACS-Calibur (Becton Dickinson). Pro každý vzorek bylo shromážděno 10 000 výsledků. Fluoresceinová fluorescence byla měřena přes 510-530 nm filtr po excitaci argonovým laserem (15 mW, 488 nm). Mrtvé buňky byly od jednotlivých živých buněk odlišeny na základě průstupnosti (gating) čelního rozptylu vůči bočnímu rozptylu. Hodnoty byly analyzovány za použití programu CELLQuest Software (Becton Dickinson).

Příklad 4

Účinek PCI na adenovirovou transdukci buněk THX

Materiál

Di- β -D-galaktopyranosid fluoresceinu (FDG) byl získán od firmy Molecular Probes (F1179). Zásobní roztok o koncentraci 20 mmol.l⁻¹ byl připraven rozpuštěním prášku ve směsi 1:1 DMSO/ethanol. Směs byla postupně přidávána do patřičného objemu ledově studené vody k vytvoření roztoku voda/DMSO/ethanol v poměrech 8:1:1.

Rekombinantní virus AdCA17lacZ byl vytvořen a propagován v lidské buněčné linii 293, tj. buněčné linii Ad E1-transformovaných embryonálních ledvinových buněk, uchovávaných v minimálním esenciálním médiu MEM F-11, doplněném 10% fetálním telecím sérem, penicilinem v koncentraci 100 U/ml (Gibco-BRL), streptomycinem v

koncentraci 0,1 mg/ml (Gibco-BRL) a 2 mmol.l⁻¹ glutaminem (Gibco-BRL).

Vytvoření (konstrukce) rekombinantního viru

Rekombinantní adenovirus AdHCMV-lacZ, kódující gen *E. coli lacZ*, řízený promotorem lidského cytomegaloviru, byl získán homologní rekombinací za použití systému pJM17 v 293 buňkách (Addison se spoluautory, J. Gen. Virol. 78, 1653-1661, 1997). Rekombinantní vektory byly plakově čištěny, pěstovány do vysokého titru v 293 buňkách a čištěny rozvrstvením prostřednictvím CsCl (Hitt se spoluautory, Methods Mol. Genet. 7, 15-30, 1995).

Senzitizace buněk

Buňky THX (4 x 10⁵ buněk) byly zaočkovány na misky o průměru 6 cm a ponechány růst přes noc. Při přibližně 60% konfluenci (souběžném růstu) bylo růstové médium nahrazeno 2 ml růstového média, doplněného AlPcS_{2a} v koncentraci 20 µg/ml a misky byly umístěny na 16 až 18 hodin zpátky do inkubátoru. Médium obsahující senzitizední činidlo pak bylo odsáto a buňky byly inkubovány alespoň 4 hodiny v běžném růstovém médiu před ovlivněním světlem a infekcí virem.

Infikace buněk

K uvolnění buněk ze tří misek byla použita soustava trypsin-EDTA a průměrný počet buněk v miskách byl vypočítán za použití Bürcherovy komůrky. Naředění adenoviru bylo připraveno v PBS s CaCl₂ (0,68 mmol.l⁻¹) a MgCl₂ (0,5 mmol.l⁻¹) podle počtu buněk, které měly být infikovány. Buňky byly obvykle infikovány při MOI (multiplicity of infection, násobnosti infekce) 1 a 10. Stanovení β-galaktosidázy

Buňky byly uvolněny působením trypsinu/EDTA a resuspendovány v 5 ml růstového média. Po odstředění (5 minut, 1000 otáček za minutu) bylo médium odsáto, buněčný pelet byl resuspendován v 50 μ l růstového média a zkumavky byly na 5 minut umístěny do vodní lázně o teplotě 37 °C.

Následně bylo do zkumavek přidáno 50 μ l 2 mmol.l⁻¹ roztoku FDG, předem zahřátého na teplotu 37 °C a zkumavky byly vráceny na 1 minutu do vodní lázně. Nakonec bylo přidáno 900 μ l růstového média a zkumavky byly inkubovány 30 až 60 minut v ledu před analýzou vzorků průtokovou cytometrií, jak bylo popsáno výše.

Buňky THX byly ovlivněny AlPcS_{2a} (označován na Obr. 4 jako PS) a adenovirem (označován na Obr. 4 jako "virus") a na 3 až 4 minuty byly vystaveny světlu tak, jak bylo popsáno v odstavci Materiál a metody. Aktivita β -galaktosidázy (β -gal) byla měřena průtokovou cytometrií. Celková aktivita β -gal byla kvantifikována sloučením (integrací) buněk, které jsou vzhledem k β -gal pozitivní a jejich β -galaktosidázové aktivity. Jak počet buněk, které jsou vzhledem k β -gal pozitivní, tak i průměrná β -galaktosidázová aktivita byly účinkem PCI zvýšeny.

Výsledky ukazují, že k minimální infekci buněk THX dochází při inkubaci buněk se samotným virem nebo s virem a s fotosenzitizujícím činidlem, a že fotochemické ovlivnění, tj. přidavek světla k fotosenzitizujícímu činidlu, významně zesiluje transdukcí buněk (jak je prokázáno zvýšením β -galaktosidázové aktivity).

Příklad 5

Fotochemická stimulace adenovirem zprostředkované genové transdukce

Buňky THX byly v množství 5×10^4 na jamku zaočkovány na destičky o 6 jamkách. Další den byl přidán AlPcS_{2a} ($20 \mu\text{g/ml}$) a buňky byly 18 hodin inkubovány při 37°C . Veškeré postupy po přidání AlPcS_{2a} byly prováděny při utlumeném světle. Při strategii "osvit předem" byly buňky promyty k odstranění AlPcS_{2a} a inkubovány v médiu bez obsahu AlPcS_{2a} po dobu 4 hodin. Poté byly buňky po dobu 3 minut vystaveny světlu a následně byly ovlivňovány adenovirovým vektorem AdHCMV-lacZ (označovaným také v Příkladu 4 jako AdCA17lacZ) při násobnosti infekce (MOI) 1 po dobu 30 minut. Tento vektor obsahuje reportérový gen β -galaktosidázy, jehož expresi lze analyzovat průtokovou cytometrií (viz níže).

U strategie "osvit následně" byly buňky ovlivněné AlPcS_{2a} a promyté nejprve ovlivňovány adenovirem ve stejné koncentraci a po stejnou dobu, jak bylo posáno výše, následně byly promyty a po přidavku čerstvého kultivačního média byly vystaveny světlu. Neozařované buňky byly ovlivňovány stejným způsobem, s výjimkou ozáření.

Ovlivňované buňky byly jednou promyty kultivačním médiem a po přidavku čerstvého média byly inkubovány při 37°C až do další analýzy. Exprese β -galaktosidázy byla analyzována průtokovou cytometrií dva dny po vystavení světlu. Podrobné postupy pro konstrukci viru (který je označován jako AdHCMV-lacZ , nebo jako AdCA17lacZ), pro ovlivnění buněk, ozáření a analýzu exprese β -galaktosidázy jsou popsány v Příkladu 4.

Výsledky (Obr. 5) ukazují, že fotochemické ovlivnění, využívající postup "osvit předem" (znázorněné sloupce na pravé straně Obr. 5), zvyšuje procento buněk exprimujících β -galaktosidázu přibližně šestinásobně; od 2,5 % do 15 % za těchto pokusných podmínek. Rovněž

je zřejmé, že účinek postupu "osvit předem" byl téměř shodný s účinkem, získanému za použití postupu "osvit následně" (viz sloupce na levé straně Obr. 5).

Příklad 6

Zvýšení produkce β -galaktosidázy v důsledku PCI - zprostředkované transdukce adenovirem, kódujícím β -galaktosidázu

Buňky byly pěstovány, inkubovány s AIPcS_{2a}, infikovány virem AdHCMV-LacZ a ozářeny tak, jak je popsáno v "Protokolech pokusů", v Příkladu 3. Ke změření produkce β -galaktosidázového proteinu byla použita sada pro stanovení chemiluminiscentního β -Gal reportérového genu (Roche, katalogové číslo 1 758 241) podle údajů výrobce. Ve stručnosti, buňky byly trojnásobně promyty předem vychlazeným PBS a do každé jamky byl přidán 1 ml reakčního činidla pro lyzi buněk. Po 30 minutách inkubace při teplotě místnosti byl buněčný extrakt převeden do zkumavky typu eppendorf, odstředován 2 minuty při maximální rychlosti a 50 μ l buněčného extraktu, tedy supernatantu, bylo převedeno do jamky mikrotitrační destičky. Přidáno bylo 100 μ l substrátového reakčního činidla, mikrotitrační destička byla přikryta fólií a inkubována 15 minut až 1 hodinu při teplotě místnosti za mírného kolébání destičky. Po inkubaci byla mikrotitrační destička umístěna do luminometru (Victor2 Wallac 1420 Multilabel Counter) a automaticky bylo injikováno 50 μ l počátečního roztoku. Po 1 prodlevě sekundy byla v 5 sekundách integrována, začleněna produkce světla. Množství β -galaktosidázy bylo vypočteno ze standardní křivky, získané ze vzorků, obsahujících známá množství β -galaktosidázy.

Výsledky

Obrázek 6 znázorňuje zvýšení produkce β -galaktosidázového proteinu, které může být získáno následně po pomoci PCI indukované adenovirové transdukci buněk lidského karcinomu tlustého střeva WiDr.

Z Obr. 6 je tedy patrné, že u transdukovaných buněk lze pozorovat přibližně 25-násobné zvýšení produkce (tvorby) β -galaktosidázového proteinu po maximální světelné dávce, což dobře odpovídá údajům, získaným analýzou pomocí průtokové cytometrie (viz třeba Příklady 2 a 3).

Příklad 7

Účinek PCI na transdukci buněk WiDr při různé násobnosti infekce

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI, doplněném 10 % fetálním telecím sérem, penicilinem/streptomycinem a L-glutaminem. Při ztlumeném světle bylo médium odstraněno a nahrazeno médiem obsahujícím TPPS_{2a} v koncentraci 1 μ g/ml. Buňky (chráněné před světlem) byly inkubovány 18 hodin při 37 °C. Poté byly trojnásobně promyty médiem a inkubovány další 3 hodiny. Médium bylo z šestijamkových destiček odstraněno, do každé jamky bylo přidáno 200 μ l roztoku adenoviru AdHCMV-lacZ a buňky byly 30 minut inkubovány při 37 °C (chráněné před světlem). Roztok viru byl pak odstraněn a buňky byly jednou promyty médiem. Následně byly přidány 2 ml média a buňky byly 30 minut inkubovány při 37 °C (chráněné před světlem). Některé z buněk byly na 90 sekund vystaveny modrému světlu o světelné intenzitě dopadající na buňky 11 mW/cm². Buňky byly, stále chráněné před světlem, inkubovány dva dny a následně byly průtokovou cytometrií analyzovány vzhledem k β -galaktosidázové aktivitě, jak je popsáno v "Protokolech pokusů" v Příkladu 3.

Výsledky

Obr.7 ukazuje, že za použití PCI je možné dosáhnout 100 % transdukovaných buněk i těch případech, kdy to za použití běžné infekce za použití zvládnutelných dávek virů není možné. Obr.7 tedy ukazuje, že za použití buněk WiDr a dávky viru 100 MOI je po PCI dosaženo 100% transdukce, zatímco při běžné infekci je dosaženo méně než 30% transdukce. Podobně při MOI 50 bylo po PCI dosaženo více než 90% transdukce, zatímco bez PCI může být získána menší než 20% transdukce.

Příklad 8

Účinek PCI na transdukci buněk A549 adenovirem

Buňky A549 byly kultivovány v médiu RPMI, doplněném 10 % fetálním telecím sérem, penicilinem/streptomycinem a L-glutaminem. Při ztlumeném světle bylo médium odstraněno a nahrazeno médiem obsahujícím AlPcS_{2a} v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$. Buňky (chráněné před světlem) byly inkubovány 18 hodin při 37 °C. Poté byly trojnásobně promyty médiem a inkubovány další 3 hodiny. Médium bylo odstraněno, do každé jamky bylo přidáno 200 μl roztoku adenoviru AdHCMV-lacZ (poskytujícího MOI 5) a buňky byly 30 minut inkubovány při 37 °C (chráněné před světlem). Roztok viru byl pak odstraněn a buňky byly jednou promyty médiem. Následně byly přidány 2 ml média a buňky byly 30 minut inkubovány při 37 °C (chráněné před světlem). Některé z buněk byly vystaveny červenému světlu, jak je popsáno v "Protokolech pokusů". Buňky byly, stále chráněné před světlem, inkubovány dva dny a následně byly průtokovou cytometrií analyzovány vzhledem k β -galaktosidázové aktivitě, jak je popsáno v "Protokolech pokusů" v Příkladu 3.

Výsledky

Obr. 8 ukazuje, že PCI může podstatně zvyšovat adenovirem zprostředkovanou transdukcí genu u buněk A549 lidské plicní rakoviny. Ve srovnání s "normální infekcí" (A+, S- vzorek s 0 minutami osvitů) tedy PCI za použití 6 minut ozáření zvýšila počet transdukovaných buněk přibližně jedenáctkrát, přibližně ze 3 % na 33 % pozitivních buněk.

Příklad 9

Účinek PCI na transdukcí buněčných linií HeLa a FmexIII

Buňky HeLa byly získány z Americké sbírky kultur a buňky FmexII lidského melanomu byly ustanoveny v Norské radiové nemocnici (Norwegian Radium Hospital). Buňky byly pěstovány, inkubovány s fotosenzitizerem TPPS_{2a} (1 µg/ml), infikovány adenovirem AdHCMV-lacZ (MOI 5), ozářeny a analyzovány tak, jak bylo popsáno v Příkladu 7.

Výsledky

Obr. 9 ukazuje, že PCI zvyšuje transdukcí také u buněčných linií HeLa a FmexIII.

Příklad 10

Účinek PCI na transdukcí adenovirem, připojeným na poly-L-lysinový nosič

Buňky WiDr byly pěstovány a inkubovány s fotosenzitizerem TPPS_{2a} (1 µg/ml) tak, jak bylo popsáno v Příkladu 7. Poly-L-lysin (PLL, mol. hmotnost 20 700) byl získán od firmy Sigma. Koncentrace virových

částic ve virovém přípravku byla určena měřením absorbance A_{260} podle Mitteredera a spoluautorů (J. Virol. 11, 7498-7509, 1996).

Vytvořeny byly následující komplexy adenovirus/PLL:

5PLL/Ad: 5 molekul PLL na virovou částici.

500PLL/Ad: 500 molekul PLL na virovou částici.

250PLL/Ad: 250 molekul PLL na virovou částici.

50PLL/Ad: 50 molekul PLL na virovou částici.

Naředěný PLL byl přidán k naředěným virovým částicím. Vzorky byly opatrně promíchány převrácením zkumavky nebo jemným nabráním do pipetovací špičky a poté inkubovány 30 minut při teplotě místnosti.

Médium bylo z šestijamkových destiček odstraněno a do každé jamky bylo přidáno 200 μ l roztoku adenoviru nebo roztoku PLL/Ad při MOI 5. Buňky pak byly 30 minut inkubovány při 37 °C (chráněné před světlem). Na destičky neinfikované adenovirem bylo přidáno pouze 200 μ l PBS. Následně bylo 200 μ l roztoku odstraněno a buňky byly jednou promyty médiem. Po přidání 2 ml média byly buňky 30 minut inkubovány při 37 °C (chráněné před světlem), načež byly vystaveny modrému světlu tak, jak je popsáno v Příkladu 7. Poté byly buňky, stále chráněné před světlem, inkubovány dva dny a následně byly průtokovou cytometrií analyzovány vzhledem k β -galaktosidázové aktivitě, jak je popsáno v "Protokolech pokusů" v Příkladu 3.

Výsledky

Obr. 10 ukazuje, že PCI funguje rovněž v tom případě, kdy byl adenovirus připojen na poly-L-lysinový nosič (PLL). Jak je z Obr. 10 zřejmé, infekce bez PCI (tj. při 0 minutách světelné dávky) poskytla velmi nízkou transdukci (< 5 %) jak s PLL jako nosičem, tak i bez něho.

Je také zřejmé, že ozáření buněk indukuje na dávce světla závislé zvýšení transdukce jak s PLL jako nosičem, tak i bez něho, vyvolané účinkem PCI. Zatímco nejvyšší účinnost transdukce získaná bez PLL (prázdňá kolečka na Obr. 10) byla 37 %, v kombinaci PCI a PLL (plňá kolečka) může být dosaženo 87 % pozitivňích buněk, což představuje více než 20-násobné zvýšení procentňího množství transdukovaných buněk ve srovnání s výsledkem dosaženým za stejných podmínek bez přítomnosti PCI a 100-násobné zvýšení ve srovnání s normální infekcí (0 minut osvitů bez PLL).

PCI může tedy podstatně zvýšit účinnost transdukce adenovirem povlečeným PLL a za použití této kombinace lze dosáhnout mnohem vyšší účinnosti transdukce než při použití kombinace PCI a nepovlečného adenoviru.

Příklad 11

Účinek PCI na transdukci adenovirem u buněčné linie lidských kožňích fibroblastů za použití poly-L-lysinu jako nosiče viru

Buňky HF-16 lidských kožňích fibroblastů byly pěstovány a ovlivňovány fotosenzitizérem TPPS_{2a} tak, jak je popsáno v Příkladu 7. Komplex PLL a viru (250 molekul PLL na 1 virovou částici) byl připraven tak, jak je popsáno v Příkladu 10 a buňky byly infikovány při MOI 5, ozářeny a analyzovány tak, jak je popsáno v Příkladu 10.

Výsledky

Obr. 11 znázorňuje účinek použití PCI v kombinaci s PLL nosičem na transdukci buněčné linie lidských kožňích fibroblastů (HF-16). Buňky fibroblastů jsou známé svou velkou odolností vůči transdukci

adenovirem a jak je zřejmé z Obr. 11, "normální" transdukce" (prázdné čtverečky, 0 osvit, bez PLL) těchto buněk je velmi nízká a prostřednictvím PCI je zvýšena pouze o malý stupeň. Pokud se jako nosič použije PLL, účinnost transdukce bez světelného ovlivnění se zvýší jen slabě, ale je zřejmé, že PCI v takovém případě transdukci zvyšuje podstatně, se světlem indukovaným zvýšením ze 7,5 % na 44,5 % transdukovaných buněk, pozorovaných za optických podmínek. Kombinace použití nosiče s technikou PCI tedy může poskytnout účinnou transdukci buněk, které jsou vůči ní jinak velice odolné.

Příklad 12

Účinek PCI na transdukci adenovirem za použití polykationového dendrimeru SuperFect® jako nosiče viru

Buňky WiDr byly pěstovány a inkubovány s fotosenzitizerem TPPS_{2a} (1 µg/ml) tak, jak bylo popsáno v Příkladu 7. SuperFect® byl získán od firmy QIAGEN (3 mg/ml). Použitým adenovirem byl AdHCMV-lacZ.

Komplexy adenovirus/SuperFect® o různých koncentracích SuperFect® byly připraveny přidáním různých množství SuperFect® k roztoku adenoviru a byly inkubovány 30 minut při teplotě místnosti.

Médium bylo z šestijamkových destiček odstraněno a přidáno bylo 200 µl komplexu adenovirus/SuperFect® o dávce adenoviru s MOI 5. Buňky byly inkubovány 30 minut při 37 °C, přičemž byly chráněny před světlem. Pak bylo 200 µl roztoku odebráno a buňky byly jednou promyty médiem. Poté byly přidány 2 ml média a buňky byly inkubovány 30 minut při 37 °C, přičemž byly chráněny před světlem. Následně byly vystaveny modrému světlu, jak je popsáno v Příkladu 7. Buňky byly, stále chráněné

před světlem, inkubovány dva dny a následně byly průtokovou cytometrií analyzovány vzhledem k β -galaktosidázové aktivitě, jak je popsáno v "Protokolech pokusů".

Výsledky

V Příkladu 12 autoři vynálezu prokázali, že PCI je účinná také s jinými virovými nosiči než s PLL. Jak je tedy znázorněno na Obr. 12, pokud je jako nosič použit dendrimerní polykationt SuperFect®, PCI může podstatně zvýšit adenovirem zprostředkovanou transdukcí genu, přičemž nosič se používá v koncentracích nižších než 50 $\mu\text{g/ml}$. Za použití SuperFect® byla PCI schopna maximálně přibližně 50-násobného zvýšení procentního množství transdukovaných buněk vzhledem k hodnotě získané s "normální" infekcí (tj. bez SuperFect® a bez PCI), zatímco PCI bez SuperFect® poskytla 12-násobné maximální zvýšení a samotný SuperFect® 10-násobné zvýšení.

Příklad 13

Rozdílná časová uspořádání pro ozáření a podání adenoviru

Buňky HCT 116 byly pěstovány a ovlivněny fotosenzitizerem TPPS_{2a} tak, jak bylo popsáno v Příkladu 7. Tyto buňky byly 30 minut infikovány adenovirem AdHCMV-lacZ (MOI 5) v různých časových okamžicích před ozářením, nebo po něm (které se vždy provádělo 4 hodiny po odstranění fotosenzitizeru). Buňky byly, stále chráněné před světlem, inkubovány dva dny a následně byly průtokovou cytometrií analyzovány vzhledem k β -galaktosidázové aktivitě, jak je popsáno v "Protokolech pokusů".

Výsledky

Obr. 13 znázorňuje účinek načasování světelného ovlivnění, které se vztahuje k dodání viru, na účinek PCI při adenovirem zprostředkované genové transdukci. Z Obr. 13 je zřejmé, že ozáření při PCI je účinné po dlouhý časový interval jak při podání viru před osvitom (ozářením), tak i při podání viru po osvitu (ozáření). Existuje zde tedy časové okno v trvání alespoň 17 hodin (od podání viru 4 hodiny před ozářením do podání viru 13 hodin po ozáření), kdy může být podán virus a může být provedeno ozáření a v němž bude stále uchován kladný účinek PCI na transdukci. Tato skutečnost je velmi důležitá z klinického hlediska, neboť to klinickému lékaři poskytuje větší pružnost při plánování léčby a při koordinaci s další léčbou, kterou může pacient podstupovat, jako například s chirurgickými zákroky.

Příklad 14

Zvýšení léčebného genového účinku adenovirového vektoru, kódujícího thymidinkinázu viru Herpes simplex, prostřednictvím PCI

Buňky adenokarcinomu HCT 116 byly infikovány vektorem adenovirové genové léčby, kódujícím gen HSV-tk (tj. AdV-TK) a byly podrobeny ovlivnění prostřednictvím PCI. Podmínky infekce byly uvedeny v "Protokolech pokusů" (MOI 5). 2 dny po infekci byly přidány různé koncentrace gancicloviru (GCV) a buňky byly před anylázou buněčného přežití metodou MTT inkubovány další 3 dny. Tato metoda je založena na redukci vodou rozpustné tetrazoliové sole (MTT) na purpurový, nerozpustný formazanový produkt mitochondriálními dehydrogenázami, které jsou přítomné v živých, metabolicky aktivních buňkách.

K buňkám se přidá 1 ml média s obsahem 0,25 μg MTT a následuje inkubace (5% CO_2 obj./obj., 37 °C) po dobu 4 hodin. Výsledné formazanové krystaly jsou rozpuštěny přidavkem 200 μl isopropanolu (Sigma. MO, USA) na jamku. Roztok se převede do mikrotitračních destiček o 96 jamkách, které jsou odečítány na odečítači mikrodestiček Multiskan EX (Labsystems, Finsko) s filtrem pro průchozí pás o vlnové délce 570 nm.

Výsledky

Jak je zřejmé z Obr. 14, na osvitu závislé zvýšení toxického účinku GCV může být pozorováno pro tři různé dávky GCV u buněk, které byly kontaktovány s fotosenzitizerem AIPS_{2a}, s AdV-TK a s GCV. Oproti tomu žádný takový účinek nebyl pozorován u kontrolních buněk, které byly ovlivněny pouze fotosenzitizerem, u buněk ovlivněných fotosenzitizerem a GCV, nebo buněk ovlivněných fotosenzitizerem a AdV-TK, ne však GCV. To prokazuje, že ke světlem (osvitem) indukovanému zvýšení usmrcení buněk, zprostředkovanému GCV, dochází na základě zvýšeného dodání tymidinkinázového genu, indukovaného ovlivněním PCI, které vyvolává zvýšenou aktivaci GCV. Kombinace gen HSV-tk/GCV se široce používá v klinických postupech genové léčby rakoviny a proto tento příklad ukazuje, že PCI lze použít ke zvýšení žádoucích, buňky usmrcujících účinků genu, použitého v genové léčbě rakoviny. Proto tento příklad také ukazuje, že účinek PCI, zvyšující dodání genu, není omezen na reportérové geny, ale že ho lze využít také pro geny které kódují proteiny, schopné poskytovat v rakovinných buňkách léčebný účinek.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob zavedení molekuly do buňky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kroky, při nichž se zmíněná buňka uvede do styku s fotosenzitizujícím činidlem, zmíněná buňka se uvede do styku i s molekulou jež má být zavedena, tedy s přenášenou molekulou, jež je připojena k virovému nosiči a zmíněná buňka se ozáří světlem o vlnové délce, účinné pro aktivaci fotosenzitizujícího činidla.

2. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako zmíněná buňka se použije savčí buňka.

3. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako zmíněná přenášená molekula se použije molekula nukleové kyseliny, zahrnující gen v plné délce nebo cyklická deoxyribonukleová kyselina či jiná deoxyribonukleová kyselina, která kóduje stejnou oblast, nebo funkční fragment takové nukleové kyseliny.

4. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná molekula nukleové kyseliny kóduje enzym aktivující pomocné léčivo, proteinový toxin, apoptózu indukující protein, imunitní stimulační faktor, tumorově specifický protein, imunitní inhibitor/inhibitor zánětu, inhibitor angiogenese, protein který indukuje tvorbu cév, protein iniciující srážení, intracelulární protilátku nebo rekombinantní imunotoxin.

5. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako zmíněná přenášená molekula se použije molekula nukleové kyseliny, kódující negativní molekulu

ribonukleové kyseliny, ribozym, aptamer, oligonukleotid nebo triplex vytvářející oligonukleotid.

6. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 3 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že molekula zmíněné nukleové kyseliny má délku 20 až 10 000 bazí.

7. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako přenášená molekula se používá polynukleotid, který se vloží do virového konstrukt, obsahujícího z viru získané prvky, nezbytné pro umožnění toho, aby se konstrukt zabalil dovnitř virového nosiče.

8. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako zmíněný virový nosič se použije adenovirus, adeno-asociovaný virus, retrovirus, lentivirus, virus Herpes, bakteriofág, virus chřipky, virus Sendai, virus neštovic nebo Baculovirus.

9. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako zmíněný virový nosič se použije adenovir.

10. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné fotosenzitizující činidlo se soustřeďuje do intracelulárních oddílů, zejména do endosomů nebo lysosomů.

11. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že fotosenzitizující činidlo je oddělené od virového nosiče a zmíněné fotosenzitizující

čínidlo a virový nosič se do styku se zmíněnou buňkou uvedou následně.

12. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že fotosenzitizující čínidlo se zvolí ze skupiny, sestávající z disulfonátu tetrafenylporfinu TPPS_{2a} , disulfonovaného hlinitého ftalocyaninu AlPcS_{2a} a dalších amfifilních fotosenzitizerů.

13. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako zmíněná fotosenzitizující čínidla se používají sloučeniny, kterými jsou kyselina 5-aminolevulinová nebo estery kyseliny 5-aminolevulinové či farmaceuticky přijatelné sole takových sloučenin.

14. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněný virový nosič se uvede do styku se zmíněnou buňkou na 15 minut až 6 hodin.

15. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněné fotosenzitizující čínidlo se uvede do styku se zmíněnou buňkou na 4 až 24 hodin před ozáření.

16. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m , že krok ozáření se provádí 1 až 10 minut.

17. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněný virový nosič se přidá před ozářením nebo po něm.

18. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 17, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jedna látka nebo obě látky, sestávající z fotosenzitizačního činidla a virového nosiče, se připojí na jednu nebo více z nosičových molekul, zacílujících molekul nebo vektorů, nebo se spojí či konjugují s jednou nebo více z nosičových molekul, zacílujících molekul nebo vektorů.

19. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněný virový nosič se připojí na nosičovou molekulu, nebo se s ní spojí či konjuguje.

20. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 18 nebo 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněná nosičová molekula zahrnuje polykationt, nebo kationtový lipid.

21. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako zmíněný polykationt se použije poly-L-lysin, poly-D-lysin nebo kationtový dendrimer SuperFect®.

22. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako zmíněný kationtový lipid se použije 1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylaminò)propan.

23. Způsob zavedení molekuly do buňky podle nároku 19 nebo 20, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako zmíněná nosičová molekula se použije liposom nebo konstrukt na bázi lipidu, s výhodou obsahující alespoň jeden kationtový lipid.

24. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 23, v y z n a č u j í c í s e t í m , že alespoň 50 % zmíněných buněk, do nichž se uvedená molekula zavádí, není usmrceno.

25. Způsob zavedení molekuly do buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 24, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněný způsob se provádí na buňkách za podmínek *in vitro* nebo *in vivo*.

26. Způsob léčby nebo prevence choroby, poruchy nebo infekce u pacienta genovou léčbou, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se přenášená molekula zavede do jedné nebo do více buněk *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo* způsobem definovaným ve kterémkoliv z nároků 1 až 25 a v případě potřeby se uvedené buňky podají zmíněnému pacientovi.

27. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněné genové léčby se dosáhne cíleným usmrcením zacílených buněk, cílenou inhibicí genové exprese, zmnožující léčbou, nebo opravou mutace, a to zavedením genu nebo jeho části se schopností exprese funkčního produktu k vyrovnání deficitu u pacienta.

28. Způsob podle nároku 26 nebo 27, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněnou chorobou, poruchou nebo infekcí jsou rakovina, revmatoidní artritida, ateroskleróza, virové a jiné infekce, lupénka, sluneční keratóza, poranění, zlomenina, bradavice či vrozená genetická porucha.

29. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 26 až 28, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se *in vivo* podává 10^3 až 10^5 virových částic.

30. Buňka obsahující přenášenou molekulu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zmíněná molekula byla do této buňky zavedena způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 25.

31. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje přenášenou molekulu, spojenou s virovým nosičem a

fotosenzitizujícím činidlem, nebo buňku, jak byla definována v nároku 30.

32. Prostředek podle nároku 31 pro použití k léčbě.

33. Prostředek podle nároku 32 pro použití ke genové léčbě.

34. Použití přenášené molekuly spojené s virovým nosičem a fotosenzitizujícím činidlem podle definice ve kterémkoliv z nároků 1 až 25 nebo buňky podle nároku 30 pro výrobu léčiva pro použití v genové léčbě.

Zastupuje:

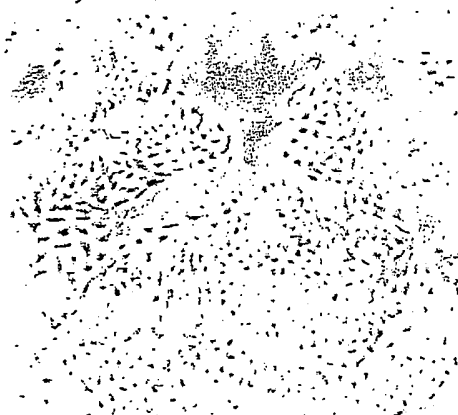
08.08.03

PV2003-1492

Obr. 1

~~0721~~

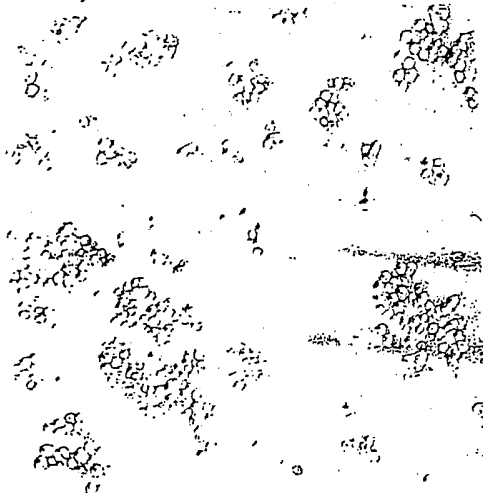
S-, Ad-, bez osvitu



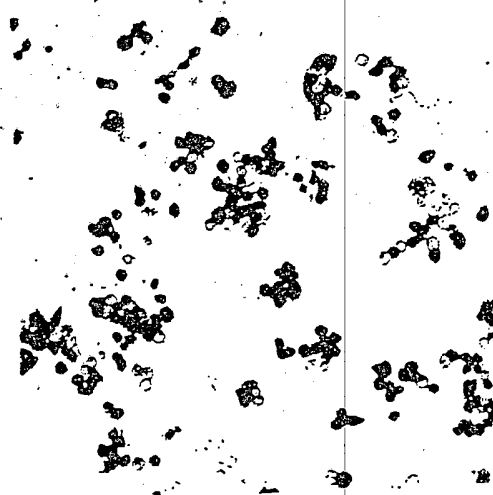
S-, Ad+, bez osvitu



S+, Ad-, 8 min

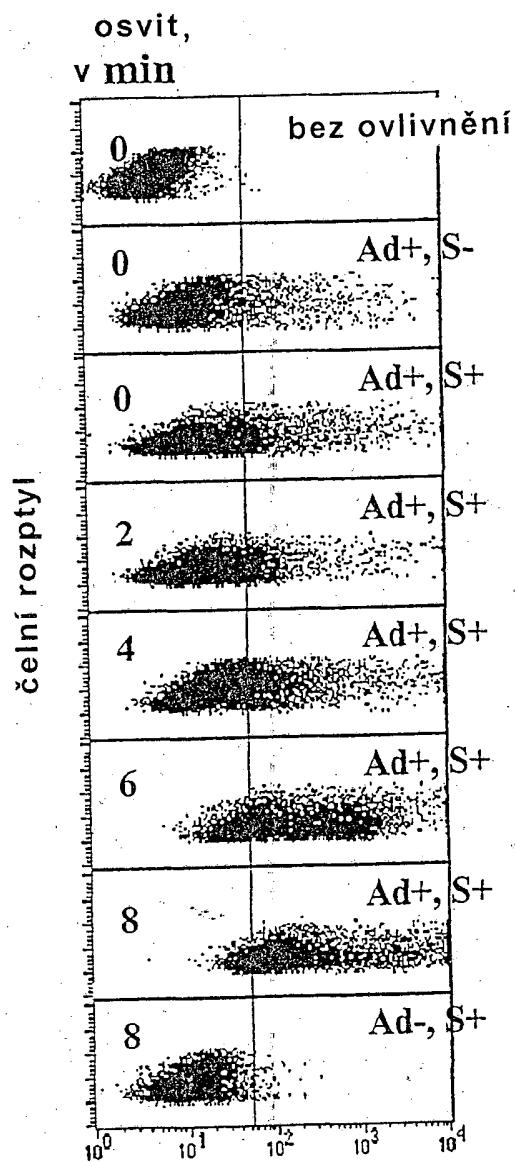


S+, Ad+, 8 min



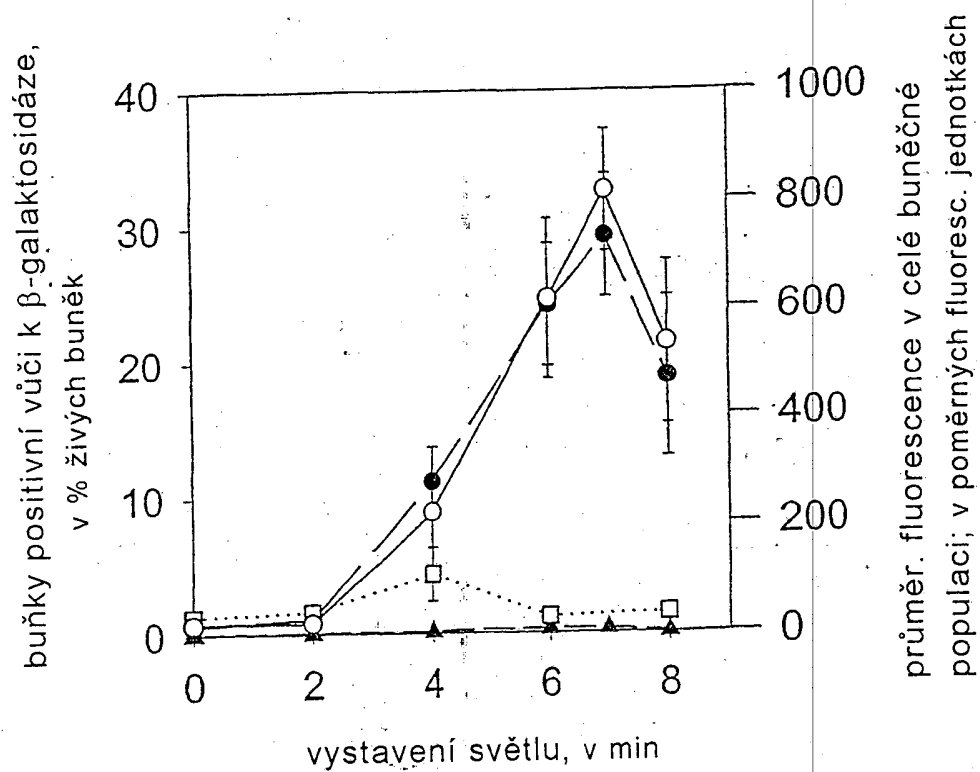
05.09.03

Obr. 2A



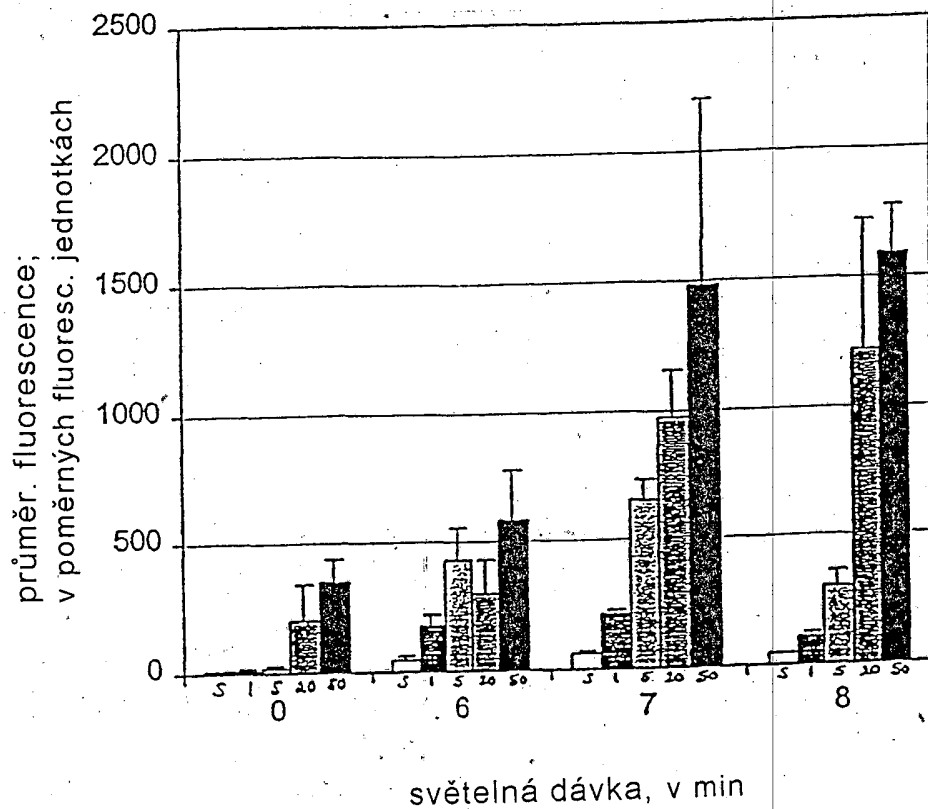
08.08.03

Obr. 2B

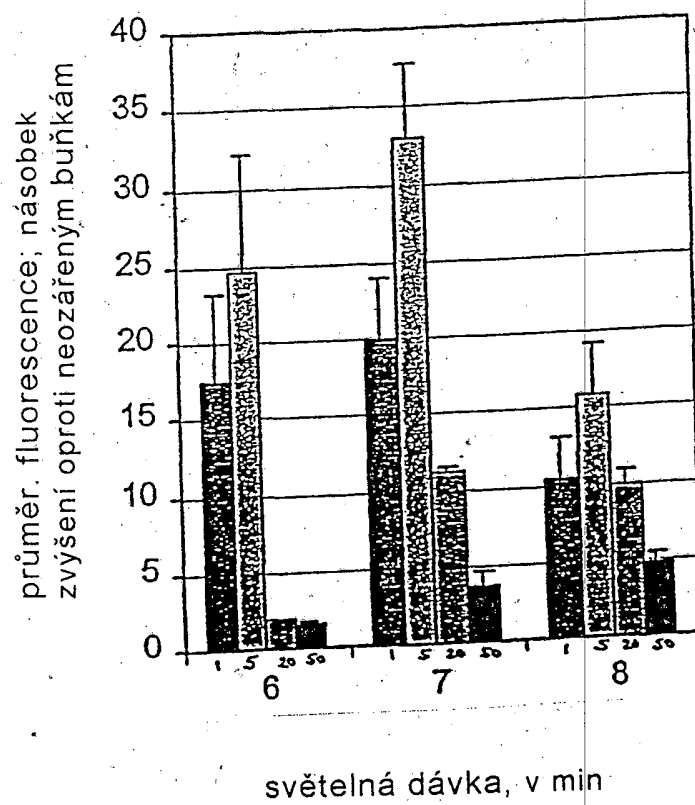


05.08.03

Obr. 3A

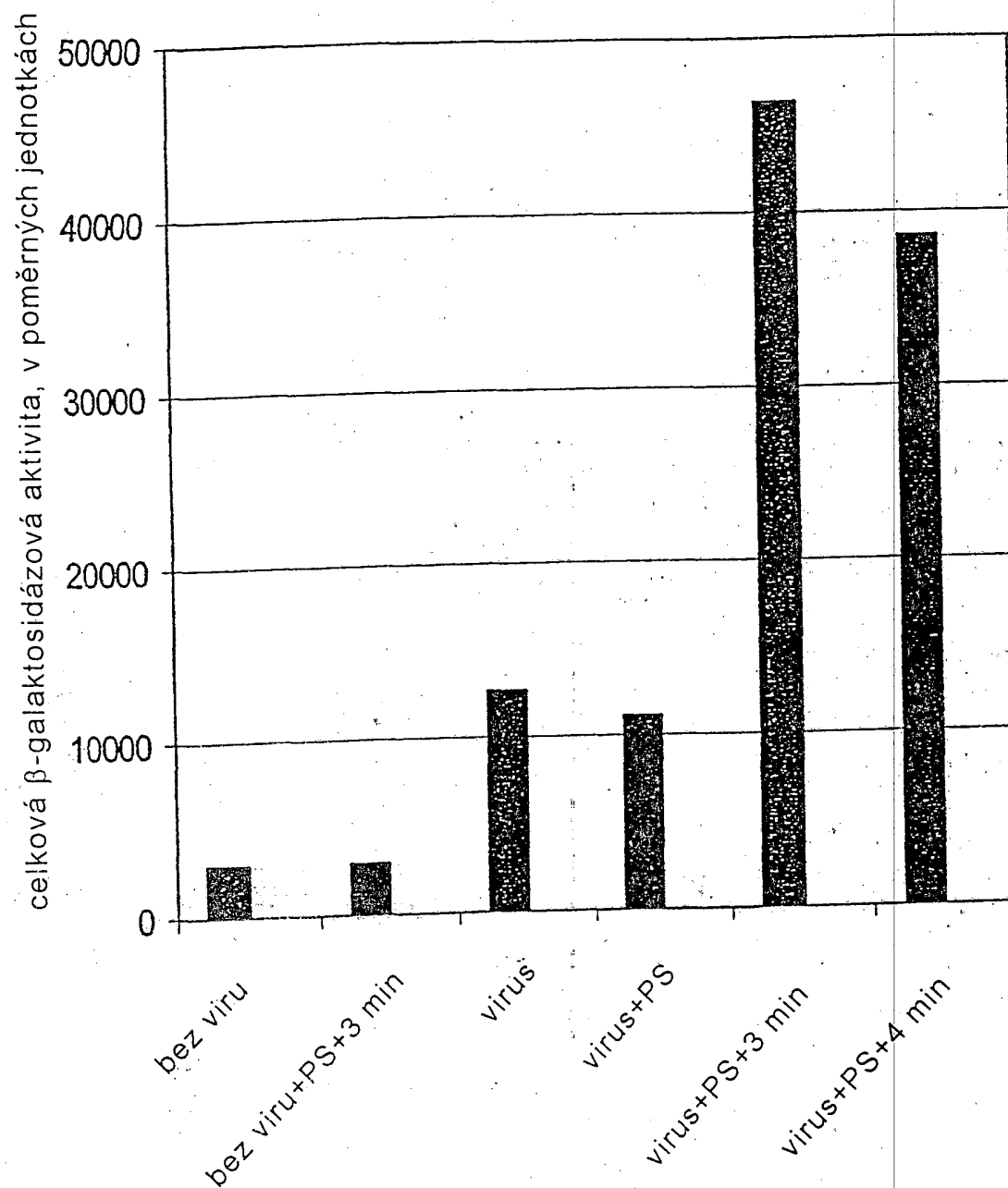


Obr. 3B



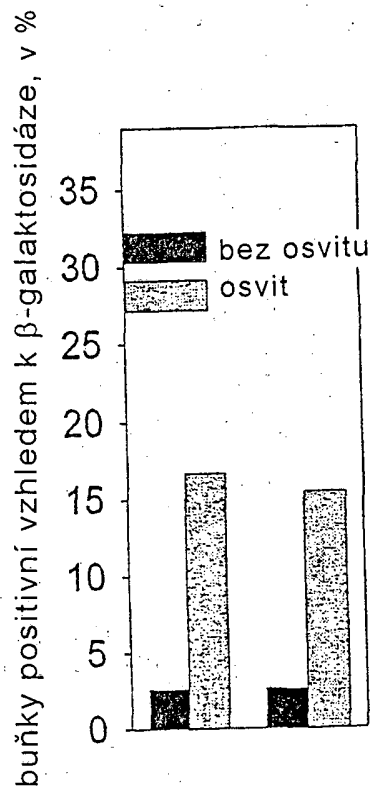
06.08.03

Obr. 4

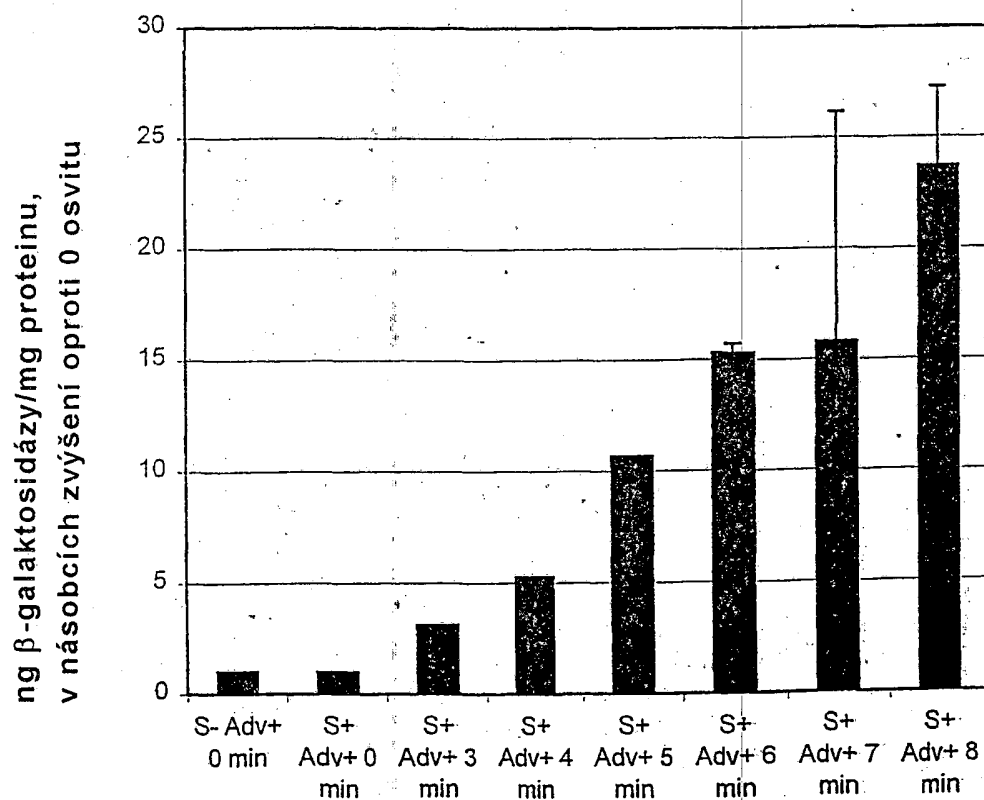


05.08.03

Obr. 5



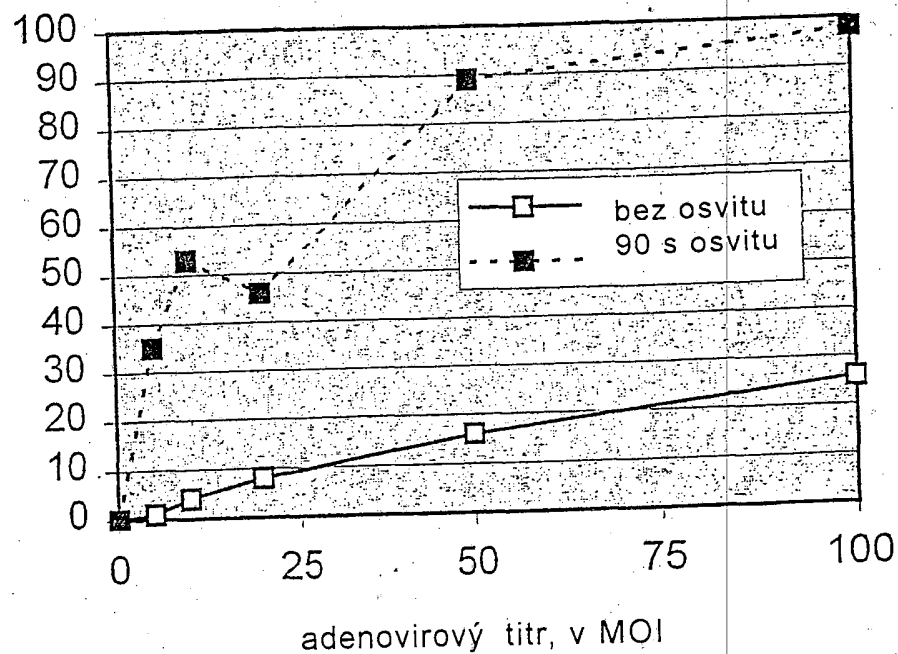
Obr. 6



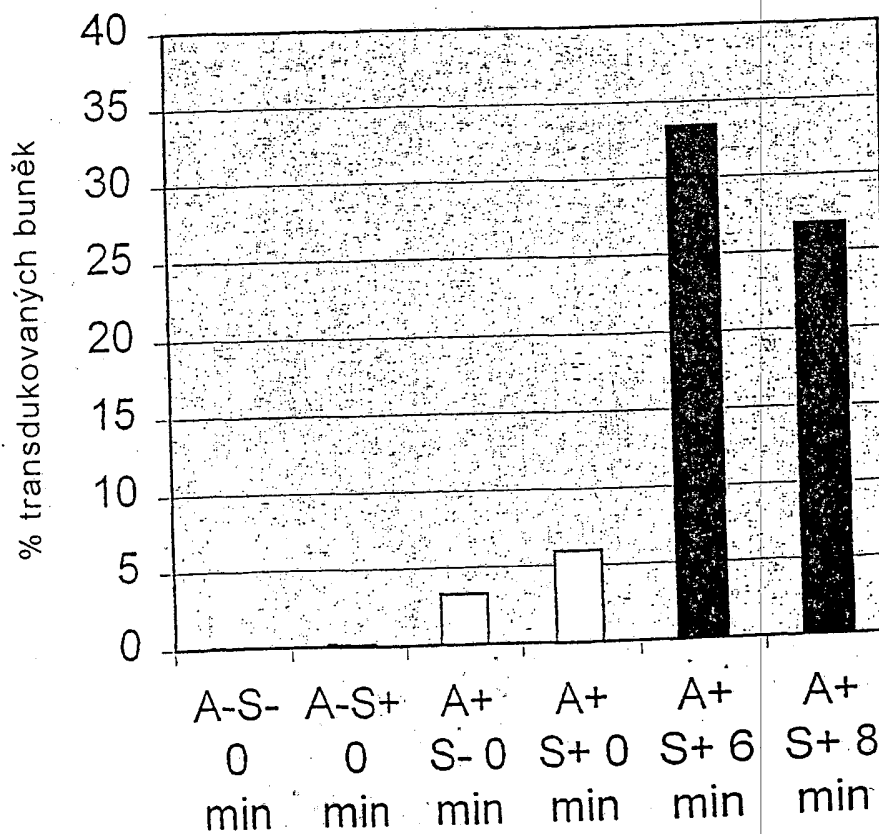
06.08.03

Obr. 7

buňky pozitivní vůči k β -galaktosidáze,
v % živých buněk

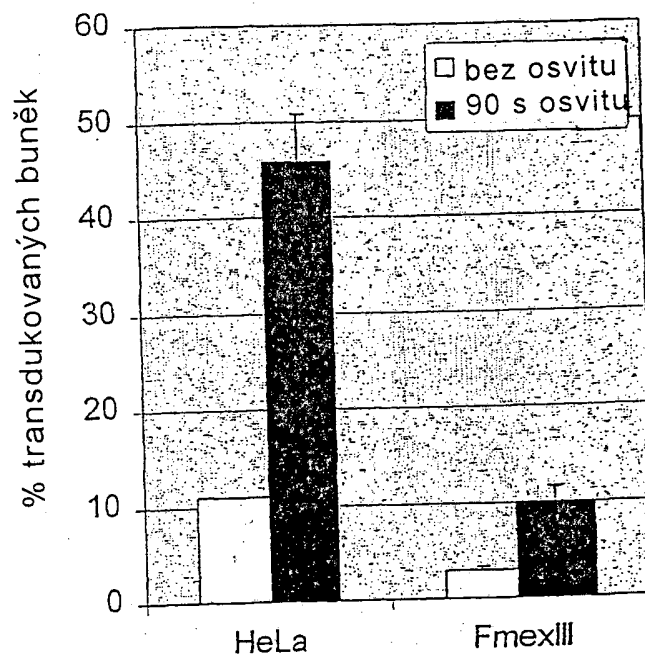


Obr. 8

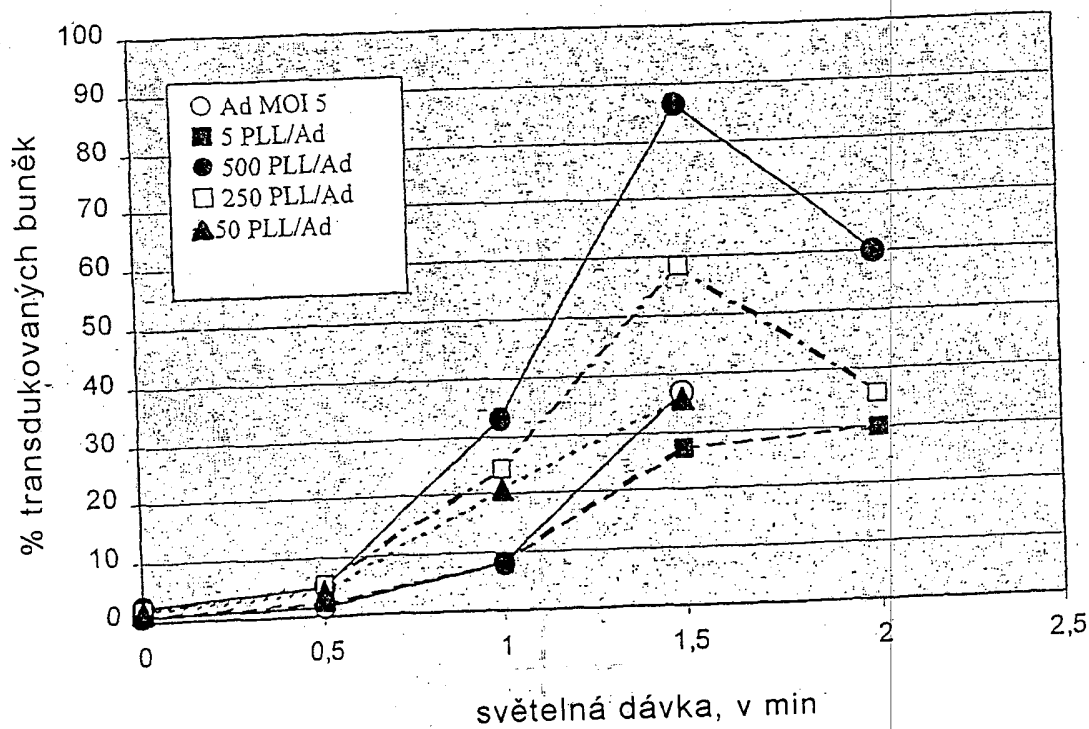


06.08.03

Obr. 9

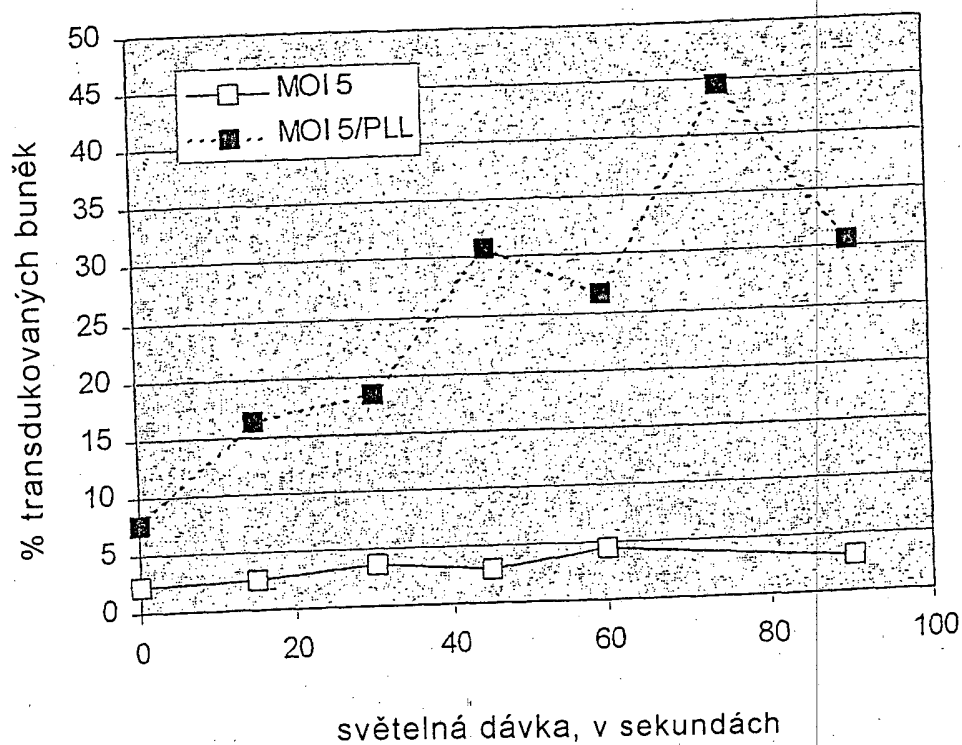


Obr. 10

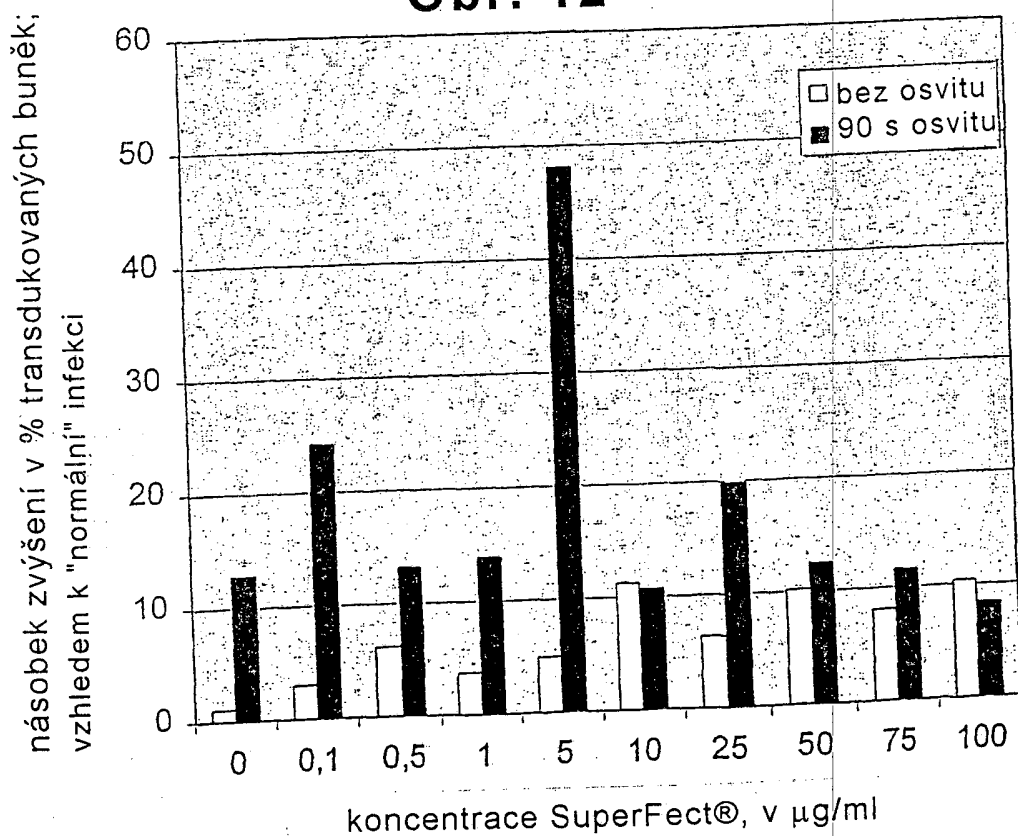


06.08.03

Obr. 11

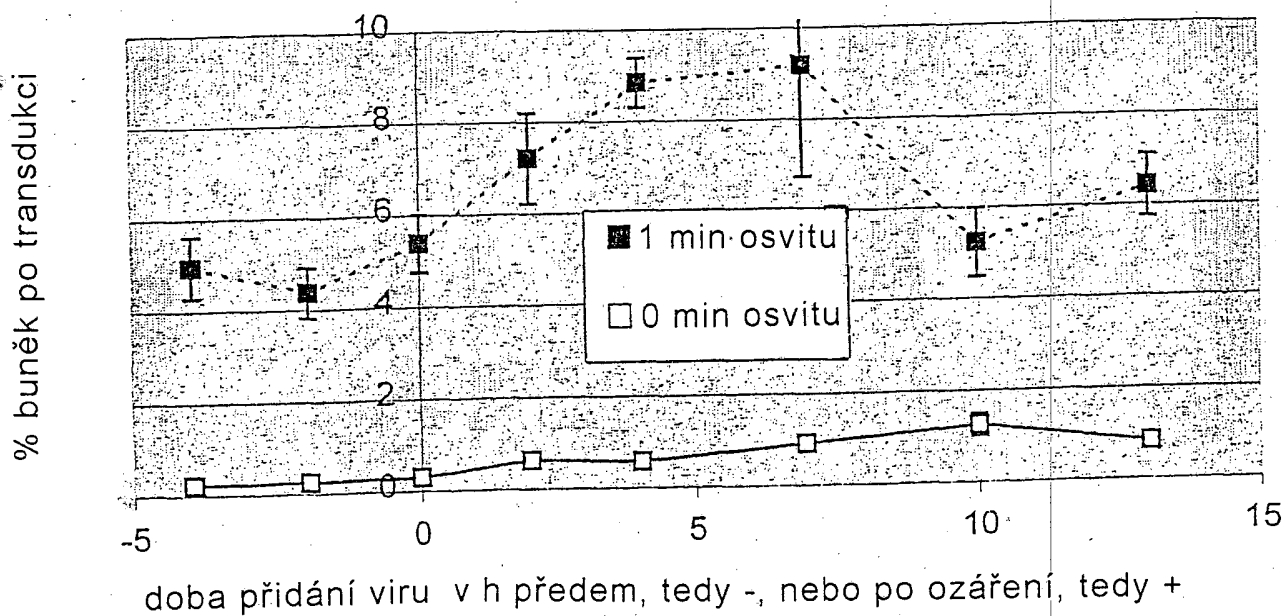


Obr. 12



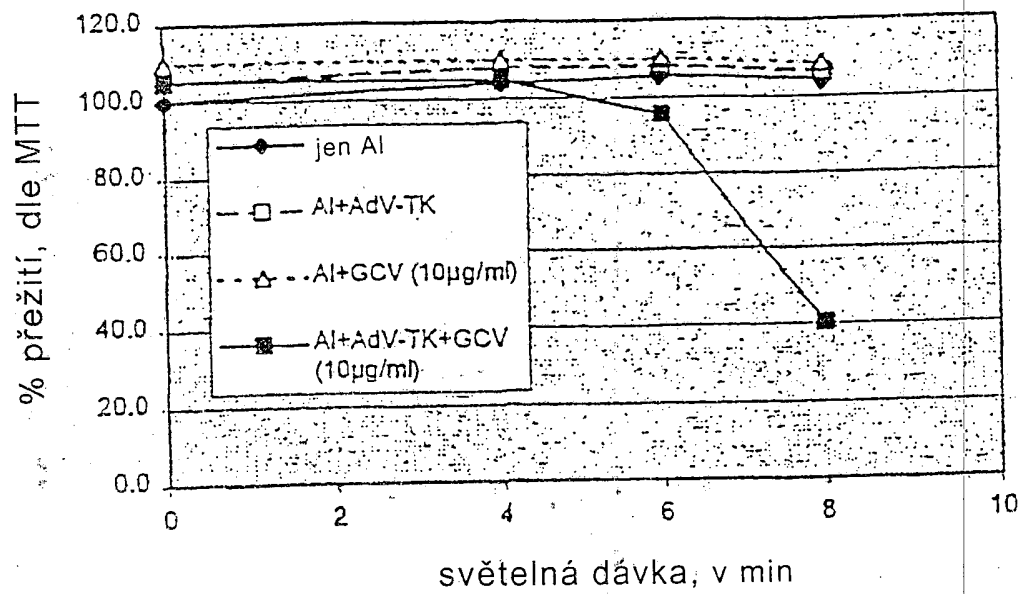
06.08.03

Obr. 13



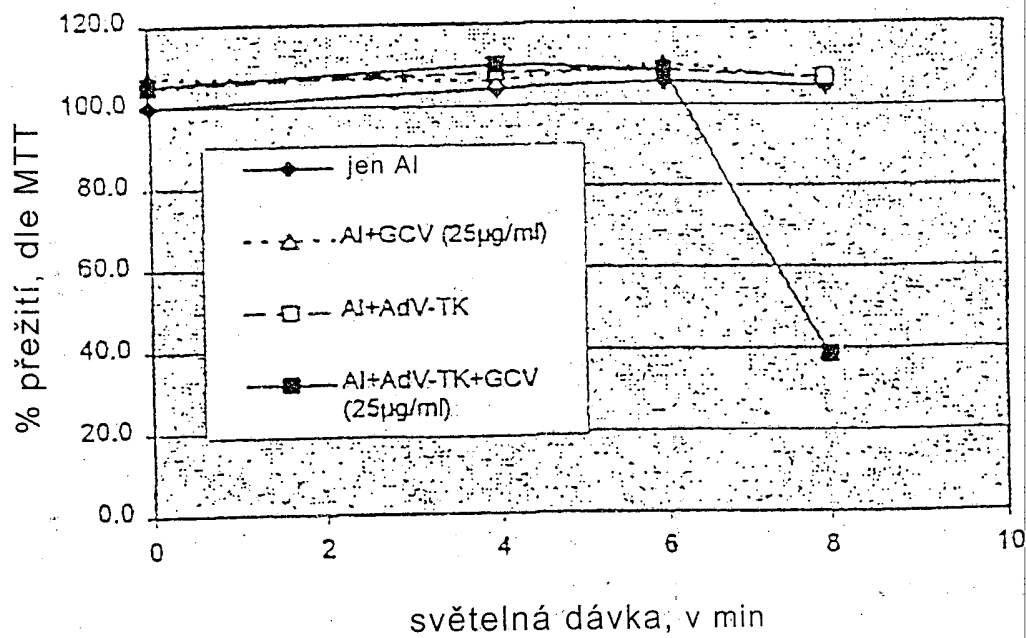
05.08.03

Obr. 14 A



05.05.03

Obr. 14 B



05.08.03

Obr. 14 C

