



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9508825-3 B1



(22) Data do Depósito: 04/09/1995

(45) Data de Concessão: 22/12/2020

(54) Título: PROCESSO DE TRANSFERÊNCIA DE MOLÉCULAS PARA O CITOSOL DE CÉLULAS, COMPOSIÇÃO E KIT

(51) Int.Cl.: A61K 41/00.

(52) CPC: A61K 41/0071.

(30) Prioridade Unionista: 08/09/1994 NO 943327.

(73) Titular(es): PHOTOCURE AS.

(72) Inventor(es): KRISTIAN BERG; KIRSTEN SANDVIG; JOHAN MOAN.

(57) Resumo: PROCESSO DE TRANSFERÊNCIA DE MOLÉCULAS PARA O CITOSOL DE CÉLULAS, COMPOSIÇÃO E KIT. A presente invenção descreve um método para liberar moléculas no citosol de células sem matar a maioria das células, permitindo que as moléculas sejam absorvidas em endossomos, lisossomas ou outros compartimentos celulares e usando a ativação de luz de compostos fotossensibilizadores para romper as membranas dos endossomos, lisossomas ou outros compartimentos celulares.

RELATÓRIO DESCRITIVO

Pedido de Patente de Invenção para **“PROCESSO DE TRANSFERÊNCIA DE MOLÉCULAS PARA O CITOSOL DE CÉLULAS, COMPOSIÇÃO E KIT”**.

[001] A presente invenção refere-se a um método para a introdução de moléculas em células pelo dilaceramento de membranas endossômicas e lisossômicas utilizando tratamento fotodinâmico, sem matar a maioria das células pelo tratamento fotodinâmico.

[002] A maioria das moléculas não penetram facilmente as membranas celulares. Métodos para introduzir moléculas no citosol de células vivas são ferramentas úteis para manipulação e estudo de processos biológicos. Entre os métodos mais comumente usados hoje em dia são microinjeção, fusão interposta de espectro de células sanguíneas vermelhas e fusão de lipossoma, lise osmótica de pinossomas, carregamento de raspagem, eletroporação, fosfato de cálcio e transfecção mediada por vírus. Estas técnicas são úteis para investigações de células em cultura, embora em muitos casos não-práticos e ineficientes, consomem tempo ou induzem morte celular significativa. Elas não são, portanto, ótimas para uso em pesquisas biológicas e médicas ou terapêuticas em que as células permanecem funcionais.

[003] Sabe-se bem que porfirinas e muitos outros compostos fotossensibilizantes induzem efeitos citotóxicos sobre células e tecidos. Estes efeitos baseiam-se no fato de que o composto fotossensibilizador mediante a exposição à luz, desprende O_2 que decompõe as membranas das células e as estruturas celulares e eventualmente mata as células se a destruição for extensiva. Estes efeitos foram utilizados para tratar vários tipos de doenças neoplásicas. O tratamento é denominado terapia fotodinâmica (PDT) e é baseado na injeção de um fotossensibilizador e

corante tumoral seguido por exposição da região de tumor à luz. O efeito citotóxico é mediado principalmente através da formação de oxigênio. Este intermediário reativo tem um tempo de vida muito curto em células ($< 0,05$ s). Assim, o efeito citotóxico primário de PDT é executado durante a exposição à luz e muito próximo aos sítios de formação de O_2 . O_2 que reage com e oxida proteínas (histidina, triptofano, metionina, cisteína, tirosina), DNA (guanina), ácidos graxos insaturados e colesterol. Uma das vantagens da PDT é que tecidos não expostos à luz não serão afetados. Há uma extensa documentação referente ao uso de PDT para destruir a população celular indesejada, por exemplo, células neoplásicas. Diversas patentes se referem a compostos fotodinâmicos sozinhos ou conjugados com imunoglobulinas dirigidas a determinantes de receptor de células neoplásticas tornando o complexo mais específico de células. Certos compostos fotoquímicos, tais como derivados de hematoporfirina, também têm uma capacidade inerente de concentrar em células de malignas. Estes processos e compostos, que são dirigidos para destruir as células indesejadas, são descritos na patente Norueguesa NO 173319, e nos Pedidos de patente Noruegueses Nos. 073 1, 90 263 4, 90 101 8, 94 154 8, 85 189 7, 93 483 7, 92 415 1 e 89 149 1.

[004] No PCT US93/00683 é descrito um sistema de administração de fármaco que é compreendido de um fármaco anticancerígeno e um fármaco fotoativável anexado a veículos copolímericos. Quando da administração este complexo entra no interior da célula por pinocitose ou fagocitose e estará localizado dentro dos endossomas e lisossomas. Nos lisossomas, a ligação entre o composto antineoplásico e o polímero é hidrolisada e o formador pode difundir passivamente através da membrana lisossômica para o citosol. Desse modo, este método limita o método a pequenos compostos moleculares que são capazes de se difundir através das membranas dos lisossomos. Depois de se permitir um atraso de tempo para a difusão, uma fonte de luz de ondas pequenas apropriadas e energia é

aplicada para ativar o composto fotoativável. O efeito combinado da droga anticâncer e fármaco fotoativável destroem a célula. Assim, o uso de compostos fotoativáveis conhecidos é dirigido para destruir extensivamente estruturas celulares que conduzem à morte celular. Não é conhecido um método de libertação de moléculas não permeáveis da membrana no citosol após a ruptura localizada das membranas endossômicas/lisossomal.

[005] O objetivo da presente invenção é fornecer um método para transportar moléculas no citosol de células vivas, em cultura ou em tecidos, através da exposição das células a um composto fotoativável, a(s) molécula(s) que é (são) a ser(em) transportada(s) para dentro do citosol, ambas as quais podem ser facilitadas por vários veículos, expondo a célula à luz de comprimento de onda adequado e energia para romper as membranas endossômicas e lisossômicas e liberar as moléculas no citosol sem destruir a funcionalidade da maioria das células. O fotossensibilizador e a molécula (s) que é (são) a serem transportados para dentro do citosol podem ser conjugados ou aplicados separadamente junto com veículos adequados, facilitando opcionalmente a captação das moléculas de interesse.

[006] Este objetivo é obtido pela presente invenção caracterizado pelas reivindicações anexas.

[007] A presente invenção refere-se a um método para transporte de quaisquer moléculas no citosol de células vivas, após o que as moléculas devem estar disponíveis no citosol e a célula deve manter sua funcionalização. Isto é realizado pela exposição da célula (s) a um composto fotoativável que é absorvido pela célula e estará localizado em endossomas, lisossomas ou outros compartimentos celulares, conjugados a ou separadamente junto com moléculas portadoras, objetivando as imunoglobulinas e as moléculas a serem transportadas para dentro do citosol e expor as células à luz de comprimento de onda adequado para ativar o composto de fotogeração, de modo que somente as membranas

endossômicas, lisossomal ou outras membranas celulares são rompidas e as moléculas liberadas no citosol sem a célula perder sua funcionabilidade pela ação do composto fotoativado e possível ação do conteúdo enossômico/lisossomal.

[008] A presente invenção é descrita em detalhes e ilustrada pelas figuras, das quais:

[009] A figura 1 representa uma ilustração de como as moléculas podem ser introduzidas citosol celular por meio da presente invenção. O fotossensibilizador (S) e as moléculas de escolha (M) são endocitosadas pelas Células (I, ilustra a invaginação da membrana plasmática iniciadora processo endocítico) e ambas as substâncias terminam nas mesmas vesículas (II). Quando estas vesículas são expostas à luz, as membranas das vesículas se rompem e os conteúdos são liberados (III).

[010] A Figura 2. ilustra a síntese de proteínas em células NHIK 3025 após tratamento com gelonina na ausência ou presença de TPPS2a e 50 seg de luz exposição. Símbolos: Q, TPPS2a + luz; • - TPPS2a - luz; v, + TPPS2a - luz; ▼, - TPPS2a + luz. As células foram tratadas com 3,2 µg / ml TPPS2a e a concentração indicada de gelonina durante a noite e em todos casos que receberam a mesma dose de luz. A síntese de proteínas foi medida por medição da incorporação de 3 [H] leucina em proteínas, 24 h após a luz exposição.

[011] A Fig.3. mostra curvas de dose-resposta para células tratadas com TPPS2a e luz apenas (O) ou em combinação com 0,2 µg / ml (v) ou 2,0 µg / ml de gelonina, conforme descrito na Fig.2.

[012] A Fig.4. mostra a síntese de proteínas em células NHIK 3025 após tratamento com 3,2 µg ml TPPS2a e luz na ausência ou presença de 0,2 µg / ml gelonina. Símbolos: Φ, TPPS ^ - gelonina; O, TPPS2a + gelonina. As células foram tratadas com TPPS2a na ausência ou presença de gelonina

durante a noite e expostas às doses de luz indicadas. A síntese de proteínas foi medida medindo a incorporação de 3 [H]leucina nas proteínas.

[013] A Fig. 5 ilustra a síntese de proteínas em células V79 após tratamento com 25 µg / ml de AlPcS2 e luz na ausência e presença de 1 µg / ml de gelonina. Símbolos: • Fotossensibilizador + toxina; ○ fotossensibilizador.

[014] A Fig. 6 ilustra a síntese de proteínas em células HI 46 após tratamento com 0,3 µg / ml TPPS2a e luz na ausência e presença de 1 µg / ml gelonina. Símbolos: como na Fig. 5.

[015] A Fig. 7 ilustra a síntese de proteínas em células V79 após o tratamento com 1 µg / ml de TPPS2a e luz na ausência e presença de 1 µg / ml de gelonina. Símbolos: como na Fig. 5.

[016] A Fig. 8 ilustra a síntese de proteínas em células NHIK3025 após o tratamento com 3,2 µg / ml TPPS2a e luz na ausência e presença de 1 µg / ml agrostin. Símbolos: como na Fig. 5.

[017] A Fig. 9 ilustra a síntese de proteínas em células NHIK3025 após o tratamento com 3,2 µg / ml TPPS2a e luz na ausência e presença de 1 µg / ml saporina. Símbolos: como na Fig. 5.

[018] A Fig. 10 ilustra a síntese de proteínas em células NHIK3025 após o tratamento com 0,25 µg / ml de 3-THPP e luz na ausência e presença de 1 µg / ml de gelonina. Símbolos: como na Fig. 5.

[019] A Fig. 11 ilustra a síntese de proteínas em células COS-7 após o tratamento com 3 µg / ml TPPS2a e luz na ausência e presença de 1 µg / ml gelonina. Símbolos: como na Fig. 5.

[020] A Fig. 12 ilustra a síntese de proteínas em células NHIK 3025 após o tratamento com gelonina na ausência ou presença de TPPS4 e luz de 50 segundos exposição. Símbolos: ■ TPPS4 + luz; ▼ - TPPS4 - luz; ○ +

RPPS4 - luz. As células foram tratadas com 75 µg / ml de TPPS4 e o indicado concentração de gelonina durante a noite e em todos os casos dado a mesma dose de luz. A síntese de proteínas foi medida medindo a incorporação de ³H]leucina nas proteínas, 24 h após a exposição à luz.

[021] A Fig. 13 ilustra a síntese de proteínas em células OHS após o tratamento com 3 µg / ml de TPPS2a por 18 horas seguido por 4 horas na ausência de TPPS2a e na ausência ou presença de 3 µg / ml de gelonina antes da exposição à luz. As células foram incubadas pelas mesmas 4 horas em 50 µM de cloroquina ou NH₄Cl 10 mM para inibir a degradação da proteína lisossomal.

[022] Está bem documentado que uma série de drogas, incluindo ftalocianina de alumínio di- e tetrassulfonado, tetrafenilporfinas sulfonadas (TPPSn), azul do nilo, derivados de cloro e6, urucporfirina I, filioeritrina e possivelmente a hematoporfirina e o azul de metileno estão localizados nos endossomos e lisossomas das células em cultura. Na maioria dos casos, isso se deve à atividade endocítica. Os inventores demonstraram que a exposição à luz de células contendo fotossensibilizadores em seus lisossomas leva a uma permeabilização dos lisossomas e liberação do fotossensibilizador. Em alguns casos, por ex. TPPS2a e TPPS, quantidades substanciais de atividades enzimáticas lisossomais foram encontradas no citosol após a PDT, indicando que os conteúdos lisossomais podem ser liberados no citosol sem perder sua atividade. Este efeito de corantes fotossensibilizantes pode ser usado para liberar moléculas endocitadas de endossomos e lisossomas em geral de acordo com a presente investigação.

[023] A introdução de moléculas no citoplasma celular é conseguida por fjrsl expondo as células ou tecido a um corante fotossensibilizador, a (s) molécula (s) que se deseja entregar no citosol das células junto com, ou não moléculas transportadoras e imunoglobinas, todas que deve se localizar preferencialmente em endossomos e / ou lisossomas. Em segundo lugar, as

células ou tecido são expostos à luz de comprimentos de onda adequados e energias induzindo uma reação fotodinâmica. Essa reação fotodinâmica levará à ruptura das membranas lisossomais e / ou endossomais e o conteúdo dessas vesículas será liberado no citosol.

[024] Os princípios da presente invenção são ilustrados na Fig.1. É necessário que o fotossensibilizador e a molécula a ser introduzida nas células estejam localizados nos mesmos compartimentos. Deve também ser enfatizado que as moléculas adicionadas externamente podem se acumular em compartimentos intracelulares diferentes de lisossomas e endossomos, e. Aparelho de Golgi e retículo endoplasmático. Em tais casos, os compostos fotossensibilizantes localizados nos mesmos compartimentos podem ser usados em combinação com a luz para os mesmos fins, desde que a combinação de dose de luz e composto fotossensibilizante não destrua a funcionalidade das células.

[025] A presente invenção é baseada em nossa demonstração in vitro, que um fotossensibilizador, por exemplo TPPS2a, (tetrafenilporfina com 2 grupos sulfonato em grupos fenil adjacentes) em combinação com a luz pode induzir a liberação de conteúdos lisossomais funcionalmente intactos sem matar uma grande fração das células. O mesmo efeito pode ser obtido usando outros compostos fotossensibilizantes sozinhos ou associados / ligados a outras moléculas ou partículas usadas como vetores para direcionar os fotossensibilizadores para endossomos / lisossomas ou outros compartimentos intracelulares. Tais vetores podem ser anticorpos específicos de tecido ou célula ou outros ligantes que se ligam à superfície celular, aumentando assim a absorção do fotossensibilizador por meio de endocitose mediada por receptor. Outro vetor poderia ser o uso de partículas de LDL reconstituídas. Essas partículas também são captadas por endocitose mediada por receptor. O número de moléculas fotossensibilizadoras por A

partícula de LDL e a ligação às partículas de LDL podem, desta forma, ser aumentadas em comparação com a pré-ligação ao LDL nativo.

[026] A presente invenção não está restrita ao uso in vitro, mas também pode ser usada in vivo, por tratamento in situ ou por tratamento ex vivo seguido de injeção das células tratadas. A absorção pelos endossomas e lisossomas pode ser aumentada da mesma maneira que a descrita acima para o tratamento in vitro. Todos os tecidos podem ser tratados, desde que o fotossensibilizador seja absorvido pelas células-alvo e a luz possa ser fornecida de maneira adequada.

[027] A presente invenção é baseada em um fotossensibilizador e luz. A luz deve ser absorvida pelo fotossensibilizador ou indiretamente induzir um estado de excitação do fotossensibilizador. A região do comprimento de onda de uso dependerá, portanto, do fotossensibilizador. A luz de exposição não precisa ser monocromática ou colimada. Cada fonte de luz que emite os comprimentos de onda apropriados pode ser usada.

[028] Surpreendentemente, a ação fotodinâmica de acordo com a presente investigação parece neutralizar o efeito potencialmente citotóxico de liberação do conteúdo lisossomal. Os presentes autores estabeleceram assim que a catepsina lisossomal é substancialmente inibida pela ação fotodinâmica do TPPS2a em uma cultura de células NHIK 3025. Este foi um efeito surpreendente da presente invenção e auxilia na manutenção da viabilidade e funcionalidade das células após o transporte de moléculas para o citosol por ruptura das membranas endossomais / lisossomais.

Exemplos de utilização experimental e clínica1 tratamento com Câncer.

1) Tratamento do câncer.

[029] Vários fotossensibilizadores se acumulam preferencialmente em tecidos neoplásicos, sendo a seletividade de um tumor sobre o tecido

circundante geralmente um fator de 2-3, mas esse fator pode em alguns casos, como para os tecidos cerebrais, ser maior, ou seja, até 30. Moléculas que pode ser de interesse clínico para o tratamento do câncer, mas é restrito por uma baixa ou nenhuma absorção no citosol pode ser introduzido no citosol por meio da presente invenção. A gelonina, conforme exemplificado abaixo, é um exemplo de tal molécula. Várias outras moléculas, sozinhas ou ligadas a outras moléculas (por exemplo, anticorpos, transferrina, fotossensibilizadores, apoB em partículas de LDL reconstituídas). A vantagem de um tal tratamento de combinação seria 1) efeito citotóxico intensificado em camadas mais profundas dos tecidos tumorais, uma vez que doses baixas e subtóxicas de luz são suficientes para a ruptura de lisossomas e endossomas; 2) especificidade aumentada da toxina, uma vez que a PDT é dada apenas à área de localização do tumor.

2) Terapia genética

[030] A terapia gênica, ou seja, a transferência terapêutica de genes para as células dos pacientes, é promissora como um método para o tratamento de muitas doenças genéticas, como câncer, fibrose cística, doenças cardiovasculares e muitas outras doenças. O principal problema hoje é a transfecção que deve ocorrer in vivo ou, em alguns casos, pode ser realizada ex vivo. Hoje, o vetor mais frequentemente usado, ou seja, a estrutura que ajuda a entregar as moléculas de DNA nas células, são diferentes tipos de vírus, especialmente retro e adenovírus. As desvantagens de tais métodos são a baixa estabilidade do vetor, especificidade limitada, baixo rendimento e introdução de vírus-DNA em células humanas.

[031] O DNA, seja como DNA antisense ou genes inteiros, pode ser introduzido nas células com o auxílio da ruptura fotoquimicamente induzida de endossomos e / ou lisossomas. O tratamento pode ser realizado in vivo.

3) Utilização experimental

[032] A presente invenção pode ser usada para introduzir uma grande variedade de moléculas em células em cultura, por exemplo, genes, anticorpos, proteínas manipuladas e compostos geralmente não permeáveis à membrana plasmática.

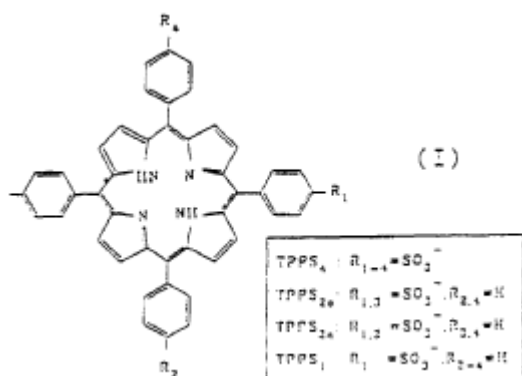
[033] A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos não limitantes.

[034] Exemplo 1: Este exemplo demonstra que o tratamento fotodinâmico libera um composto inibidor da síntese de proteínas no citosol.

[035] Uma série de toxinas vegetais mata as células ao entrar no citosol e inativar enzimaticamente a função ribossômica. As proteínas vegetais mais citotóxicas consistem em 2 cadeias polipeptídicas, A e B, ligadas entre si por pontes dissulfeto. A função da cadeia B é ligar a proteína à superfície das células, enquanto a cadeia A contém a atividade enzimática. A gelonina é uma toxina vegetal que inibe com eficiência a síntese de proteínas em sistemas sem células, mas tem pouco ou nenhum efeito nas células intactas. O baixo efeito citotóxico em células intactas é provavelmente devido à falta de uma cadeia B na gelonina.

[036] As células NHIK 3025 foram incubadas com TPPS[^] (Fórmula I) e gelonina, separadamente ou em conjunto por 18 h, seguido por 1 h em TPPS_{2a} e meio sem gelonina antes de as células serem expostas à luz. A síntese de proteínas foi medida 24 horas após a exposição à luz. O tratamento fotodinâmico, que mata apenas 10-20% das células, reduziu a síntese de proteínas em 30-40% (Fig.2). Como visto na Fig.2, a gelonina sozinha na presença ou ausência de luz inibe a síntese de proteínas em alguma extensão. No entanto, a síntese de proteínas pode ser completamente inibida pela combinação de PDT e gelonina com um IC₅₀ = 0,2 µg / ml de gelonina. Assim, na ausência do tratamento fotodinâmico, a gelonina essencialmente

não entrou no citosol. Este exemplo indica que TPPS [^] e luz podem ser usados para introduzir macromoléculas funcionalmente intactas no citosol celular.



[037] Exemplo 2: Este exemplo ilustra como a dose de luz (com o comprimento de onda que é absorvido pelo corante) pode ser usada para decidir o tamanho da fração de células sobreviventes.

[038] As células NHIK 3025 foram incubadas com TPPS2a e gelonização de acordo com o projeto do Exemplo 1.

[039] A sobrevivência clonogênica das células foi medida 24 horas após a exposição à luz. Conforme ilustrado na Fig. 3, virtualmente todas as células foram mortas com TPPS2a e luz quando a exposição à luz foi aumentada. Isto está de acordo com a técnica anterior em relação à morte de células indesejadas com PDT. Quando a gelonina é adicionada, a taxa de sobrevivência cai devido ao efeito inibidor da gelonina na síntese de proteínas, mostrando que a gelonina agora é liberada no citosol. O aumento da concentração de gelonina adicionada leva a mais gelonina no citosol, conforme indicado por um aumento da sensibilidade das células à fotoinativação.

[040] A presente invenção oferece assim a possibilidade de definir um nível de sobrevivência em cada caso e selecionar uma combinação de

composto fotossensibilizador e exposição à luz que manterá viva a fração desejada de células.

[041] Exemplo 3: Este exemplo ilustra como a alteração das doses de luz controla a quantidade de gelonina liberada no citosol, conforme determinado pela síntese relativa de proteínas. As células NHIK 3025 foram incubadas com TPPS2a e gelonina de acordo com o projeto do Exemplo 1. A Figura 4 mostra que as doses de luz acima da dose tóxica de 50 segundos aumentaram a fração de gelonina no citosol conforme determinado pela síntese relativa de proteínas.

[042] Os Exemplos 4-11 demonstra a utilização do método de acordo com a invenção em diferentes linhas celulares e com diferentes fotossensibilizadores e toxinas.

[043] A localização intracelular dos fotossensibilizadores é lisossomal (TPPS4, TPPS2a, AlPcS2a) e extralisossomal (3-THPP). As seguintes abreviações são usadas: AlPcS2a para ftalocianina de alumínio com 2 grupos sulfonato em anéis fenil adjacentes; TPPS4 para meso-tetrafenilporfina com 4 grupos sulfonato; TPPS2a para meso-tetrafenilporfina com 2 grupos sulfonato em anéis fenil adjacentes; 3-. THPP para tetrahidroxilfenil porfina. As linhas de células utilizadas são células de carcinoma in situ do colo do útero humano (NHIK 3025), fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V 79), rim de macaco verde africano transformado por SV40 (células semelhantes a fibroblastos de símio CV1) (Cos-7) células de osteossarcoma humano (OHS) e células cancerosas de pulmão de pequenas células (HI 46). Todos os experimentos foram concebidos como no Exemplo 1.

[044] Exemplo 4: Este exemplo refere-se ao uso do fotossensibilizador AlPcS2a em células V79 com / sem gelonina como toxina (Fig. 5). Ao selecionar uma dose de luz específica (tempo de

irradiação), é demonstrado que, sem a toxina, muito pouco dano celular é produzido, conforme ilustrado pela pequena redução na síntese de proteínas, enquanto com a gelonina a síntese de proteínas é profundamente reduzida. Isto mostra o transporte de moléculas de gelonina para o citoplasma celular via lisossomas sem essencialmente danificar as células, embora a localização intracelular de AlPcS2a seja lisossomal (Moan, J., Berg, K., Anholt, H. e Madslien, K. (1994). Alumínio sulfonado ftalocianinas como sensibilizantes para fotoquimioterapia. Efeitos de pequenas doses de luz na localização, fluorescência do corante e fotossensibilidade em células V79. *Int. J. Cancer* 58: 865-870).

[045] Exemplo 5: Este exemplo demonstra o transporte da toxina gelonina para as células HI 46 sem afetar essencialmente a viabilidade das células. (Fig. 6). TPPS2a é conhecido por ser lisossomal localizado na célula. (Berg, K., Western, A., Bommer, J. e Moan, J. (1990) Intracellular localization of sulfonated meso-tetraphenylporphines in a human carcinoma cell line. *Photochem. Photobiol.* 52: 481-487; Berg, K., Madslien, K., Bommer JC, Oftebro, R., Winkelman, JC e Moan, J. (1991). Localização induzida por luz de meso-tetrafenilporfinas sulfonadas em células NHIK 3025 e efeitos de fracionamento de dose. *Photochem. Photobiol.* 53: 203-210; Berg, K e Moan, J. (1994) Lysosomes as photochemical targets. *Int. J. Cancer.* 59: 814-822).

[046] Exemplo 6: Este exemplo demonstra o método de acordo com a invenção em células V79 usando TPPS2a como fotossensibilizador (Fig. 7).

[047] Exemplo 7: Este exemplo demonstra o transporte para células NHIK 3025 da toxina agrostina usando o fotossensibilizador TPP2a (Fig. 8).

[048] Exemplo 8: Este exemplo demonstra o transporte da toxina saporina para as células NHIK 3025 usando TPP2a (Fig. 9).

[049] Exemplo 9: Este é um exemplo de comparação que demonstra que quando um fotossensibilizador (3-THPP) que não entra nas vesículas endocíticas (i.e. endossomos e lisossomos) (Peng, Q., Danielsen, H.E. e Moan, J. (1994) Potent photosensitizers for photodynamic therapy of cancer: Applications of confocal laser scanning microscopy for fluorescence detecção of fluoróforos fotossensibilizadores em células e tecidos neoplásicos. In: Proceedings of Microscopy, Holography, and Interferometry in Biomedicine. SPIE Vol. 2083: 71 -82), não há diferença significativa entre o efeito da síntese de proteínas de 3THPP com ou sem gelonina (Fig. 10). Assim, a gelonina não é transportada para o citosol das células.

[050] Exemplo 10: Este exemplo demonstra o transporte de gelonina para as células COS-7 usando TPPS2a de acordo com a invenção (Fig. 11).

[051] Exemplo 11: Este exemplo demonstra o transporte de gelonina para células OHS utilizando TPPS2a de acordo com a invenção. (Fig. 13). Nesta linha de células, há uma degradação considerável de proteínas nos lisossomos, que no presente exemplo é inibida pela incubação das células por 4 horas em 50 μ M de cloroquina ou 10 mM de NH_4Cl .

[052] Exemplo 12: Semelhante ao exemplo 1, este exemplo demonstra o transporte de gelonina para as células NHIK 3025 em função da concentração de gelonina quando as células foram incubadas com TPPS4 e diferentes concentrações de gelonina e expostas à luz (Fig. 12). Quando as células foram incubadas com gelonina sozinha e expostas à luz, ou incubadas com TPPS4 e gelonina sem exposição à luz, nenhum transporte de gelonina foi obtido para as células.

[053] Os exemplos demonstram que diferentes moléculas podem ser introduzidas nas células citosol em uma ampla variedade de células, utilizando-se diferentes fotossensibilizantes e doses de luz. Moléculas

exógenas podem ser introduzidas no citosol celular depois de doses de fotossensibilizantes e luz que não matam as células, contanto que as moléculas sejam introduzidas e os fotossensibilizadores sejam transportados para os mesmos compartimentos celulares. O efeito fotoquímico sobre um compartimento biológico depende da quantidade de fotossensibilizantes nesse compartimento, da dose de luz aplicada e das propriedades espectrais da fonte de luz. A melhor maneira de avaliar os efeitos fotoquímicos em células em cultura é, portanto, medir a sobrevivência celular 24 horas ou mais após o tratamento. Há uma boa correlação entre o efeito sobre a morte celular e a inibição da síntese de proteína, 24 horas após os tratamentos como apresentado acima (dados não mostrados).

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo *in vitro* para introdução de moléculas no citosol de células vivas por uso de compostos fotossensíveis e luz absorvida pelo composto fotossensível **caracterizado por:**

a) o composto fotossensível, opcionalmente as moléculas veículo e a(s) molécula(s) a serem transportada(s), que são ligadas juntas ou separadas, serem aplicadas às células vivas e;

b) por serem então endociticamente deslocados para os endossomos, lisossomos ou outros compartimentos restritos a membrana intracelular, através do qual as células são:

c) expostas à luz com comprimentos de onda apropriados, de acordo com o espectro de absorção do composto fotossensível, em doses variadas, dependendo da taxa de sobrevivência desejada, tal que, o endossoma, lisossoma ou outras membranas do compartimento intracelular são interrompidos e as moléculas a serem introduzidas no citosol são liberadas no citosol e em que a ação fotodinâmica mantém a viabilidade celular da maioria das células; em que as moléculas que são liberadas no citosol são selecionadas do grupo que contém DNA, oligodesoxirribonucleotídeos, oligoribonucleotídeos, mRNA, DNA antisense, açúcares, proteínas, peptídeos, drogas impermeáveis à membrana, outras moléculas impermeáveis à membrana covalentemente ou combinações não covalentemente ligadas das moléculas mencionadas acima e em que os referidos compostos fotossensibilizantes são selecionados do grupo que contém porfirinas, ftalocianinas, purpurinas, clorinas, benzoporfirinas, naftalocianinas, corantes de carbono, tetraciclinas e bases fracas lisomotrópicas e seus derivados.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** as moléculas veículo terem anexadas às mesmas o composto a ser liberado no citosol e o composto fotossensível ou onde pelo menos um veículo possui, anexado ao mesmo, o composto a ser liberado no citosol e outro veículo semelhante ou diferente possui, anexado ao mesmo, o composto fotossensível.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado por** as moléculas que são liberadas no citosol serem proteínas ou peptídeos.

4 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** as moléculas que são liberadas no citosol serem selecionadas a partir de um grupo de substâncias que modificam a atividade sintética da proteína.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** o composto que é liberado no citosol ser gelonina, saporina ou agrostina ou qualquer combinação destas.

6 - Processo de acordo com as reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** o composto fotossensível usado ser tetrafenil porfina com 2 grupos sulfonato nos grupos fenila adjacentes (TPPS_{2a}), porfina meso-tetrafenila com 4 grupos sulfonato (TPPS₄) ou ftalocianina alumínio com 2 grupos sulfonato nos anéis fenila adjacentes (AIPcS_{2a}) ou qualquer combinação destes.

7 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** as moléculas veículo usadas serem moléculas de direcionamento de sítio que facilitam a absorção do composto fotossensível ou das moléculas que devem ser liberadas para o citosol.

8 - Composição para modificação de processos neoplásticos ou outros processos celulares em animais de sangue quente ou culturas de célula **caracterizada por** a composição conter uma molécula impermeável à membrana para ser liberada no citosol e um fotossensibilizador que após a ativação da luz rompe as membranas do compartimento intracelular, cujos compostos podem ser opcionalmente ligados às mesmas ou diferentes moléculas transportadoras, para facilitar a translocação em endossomos, lisossomas ou outros compartimentos intracelulares restritos à membrana, em que o composto impermeável à membrana é selecionado a partir do grupo contendo DNA, oligodesoxirribonucleotídeos, oligoribonucleotídeos, mRNA, DNA antisenso, açúcares, proteínas, peptídeos, drogas impermeáveis à membrana, outras moléculas impermeáveis à membrana, combinações covalentemente ou não covalentemente ligadas das moléculas mencionadas acima e em que o composto fotossensibilizador é selecionado do grupo contendo porfirinas, ftalocianinas, purpurinas, clorinas, benzoporfirina, natalocianinas, corantes catiônicos, tetraciclinas e bases fracas lisomotrópicas e seus derivados.

9 - Composição de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada por** veículos moleculares terem anexados aos mesmos o composto impermeável à membrana e o composto fotossensível, onde pelo menos um veículo tem anexado ao mesmo o composto impermeável à membrana e outro veículo, semelhante ou diferente, tem anexado ao mesmo o composto fotossensível.

10 - Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 ou reivindicação 9 **caracterizada por** o composto impermeável à membrana ser um composto antineoplástico.

11 - Composição de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por** o composto antineoplástico ser gelonina.

12 - Composição de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada por** o composto fotossensível ser tetrafenilporfina com dois grupos sulfonato nos grupos fenila adjacentes.

13 - Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **caracterizada por** o transportador ser selecionado a partir de moléculas direcionadoras de sítio, que facilitam a captação do composto fotossensibilizador ou das moléculas a serem liberadas no citosol.

14 - Composição de acordo com a reivindicação 8 ou reivindicação 13, **caracterizada por** o composto a ser liberado no citosol ser selecionado do grupo contendo DNA, oligo(desóxi)nucleotídeos, mRNA ou DNA antisenso e combinações ligadas covalente ou não covalentemente das moléculas acima para uso na terapia de genes.

15 - Kit para realização do processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado por** conter compostos fotossensíveis, as moléculas a serem transportadas e opcionalmente os compostos veículos que podem facilitar o transporte destas moléculas, em que as moléculas a serem transportadas são selecionadas a partir do grupo contendo DNA, oligodesoxirribonucleotídeos, oligoribonucleotídeos, mRNA, DNA antisenso, açúcares, proteínas, peptídeos, drogas impermeáveis à membrana, outras moléculas impermeáveis à membrana, combinações covalentemente ou não covalentemente ligadas dos acima mencionados moléculas e em que o composto fotossensibilizante é selecionado a partir do grupo que contém porfirinas,

ftalocianinas, purpurinas, clorinas, benzoporfirinas, natalocianinas, corantes catiônicos, tetraciclinas e bases fracas lisomotrópicas e seus derivados.

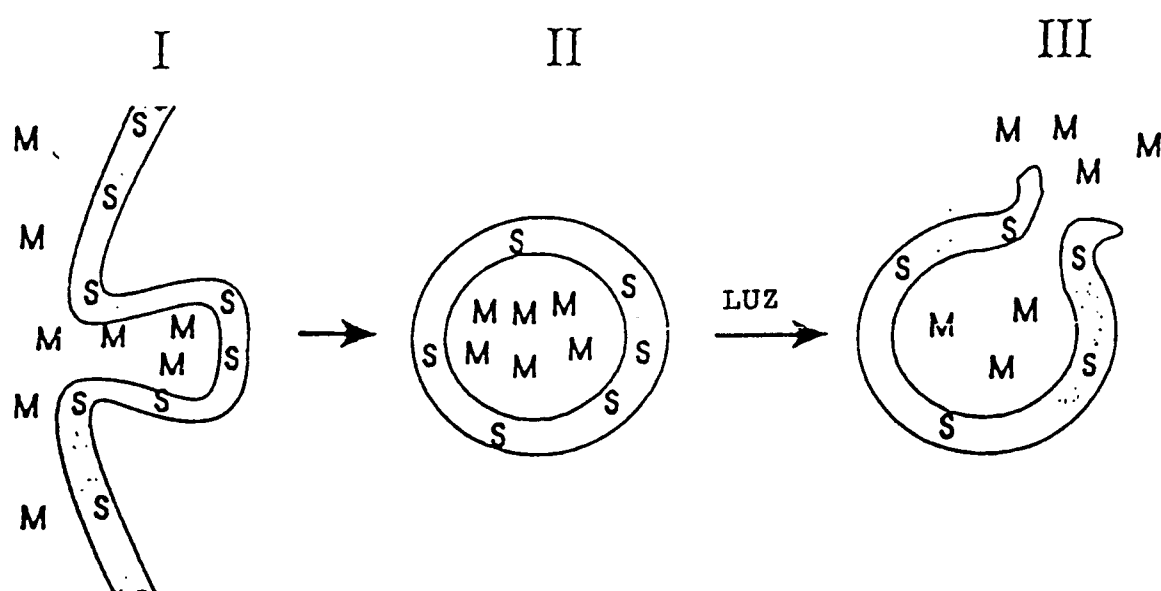


FIG. 1

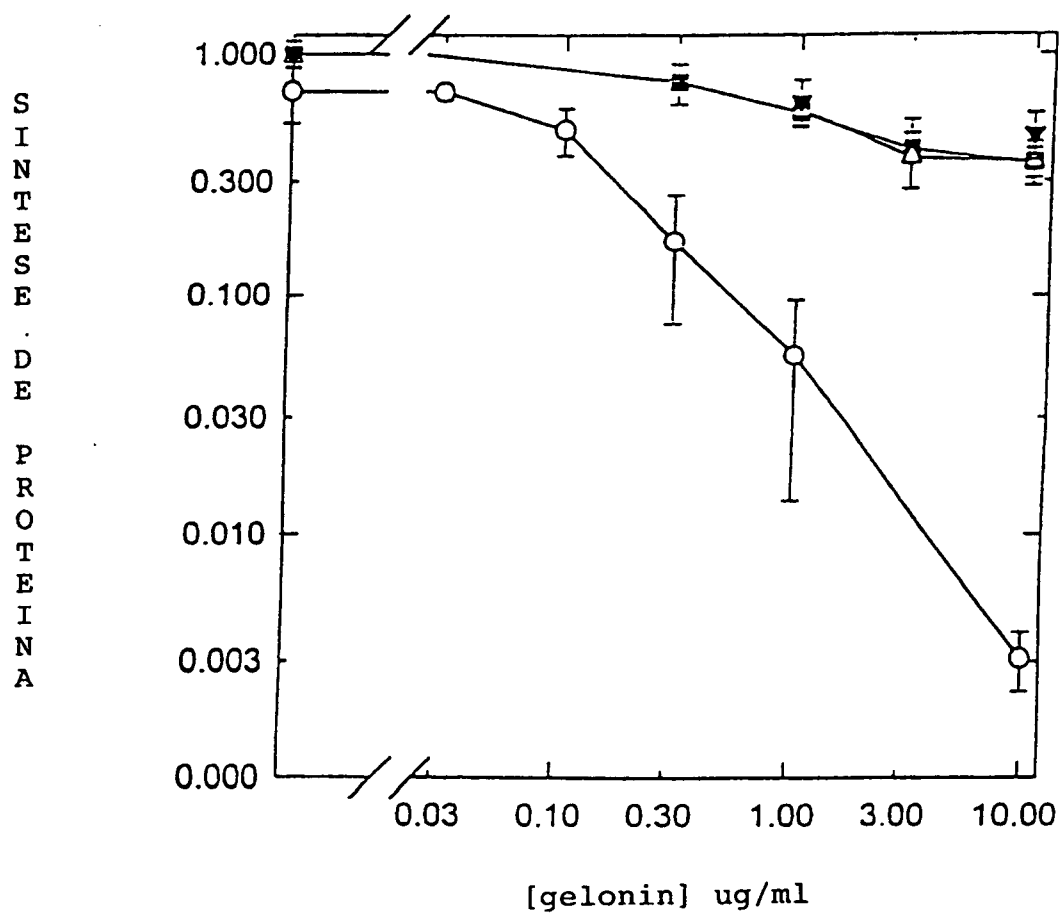


FIG. 02

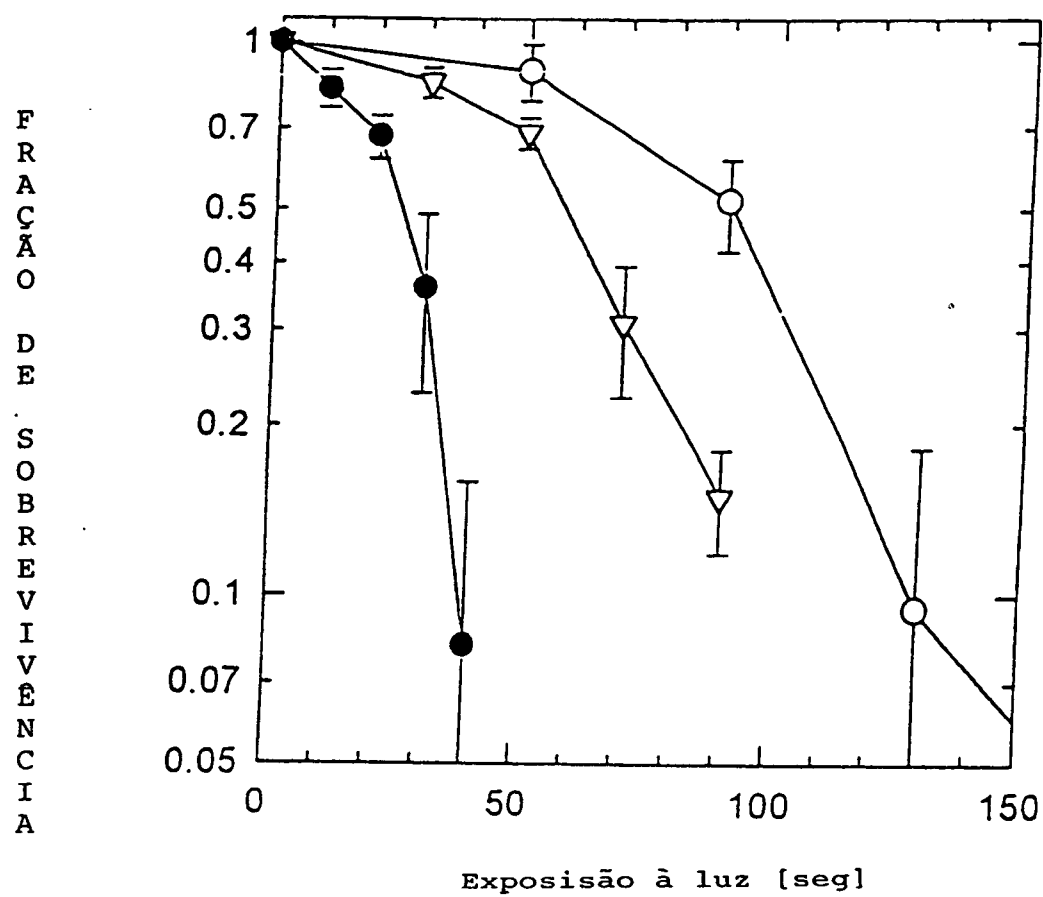


FIG. 03

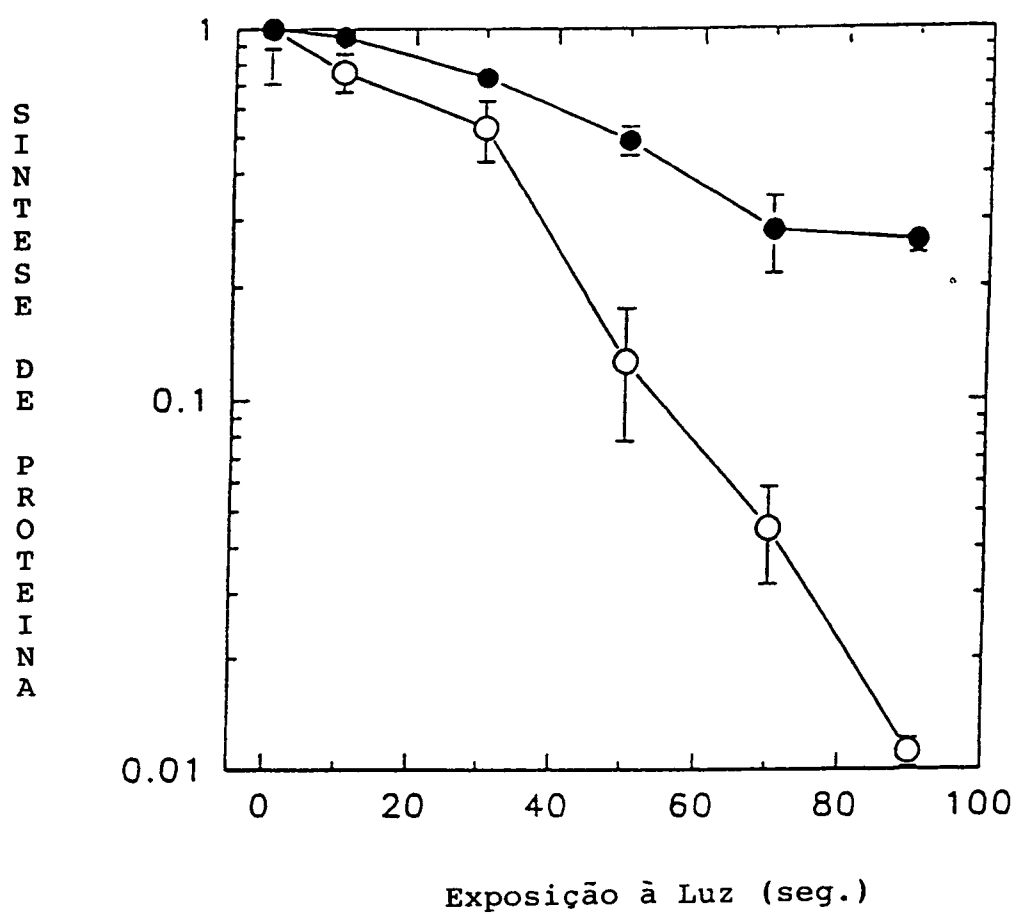


FIG. 4

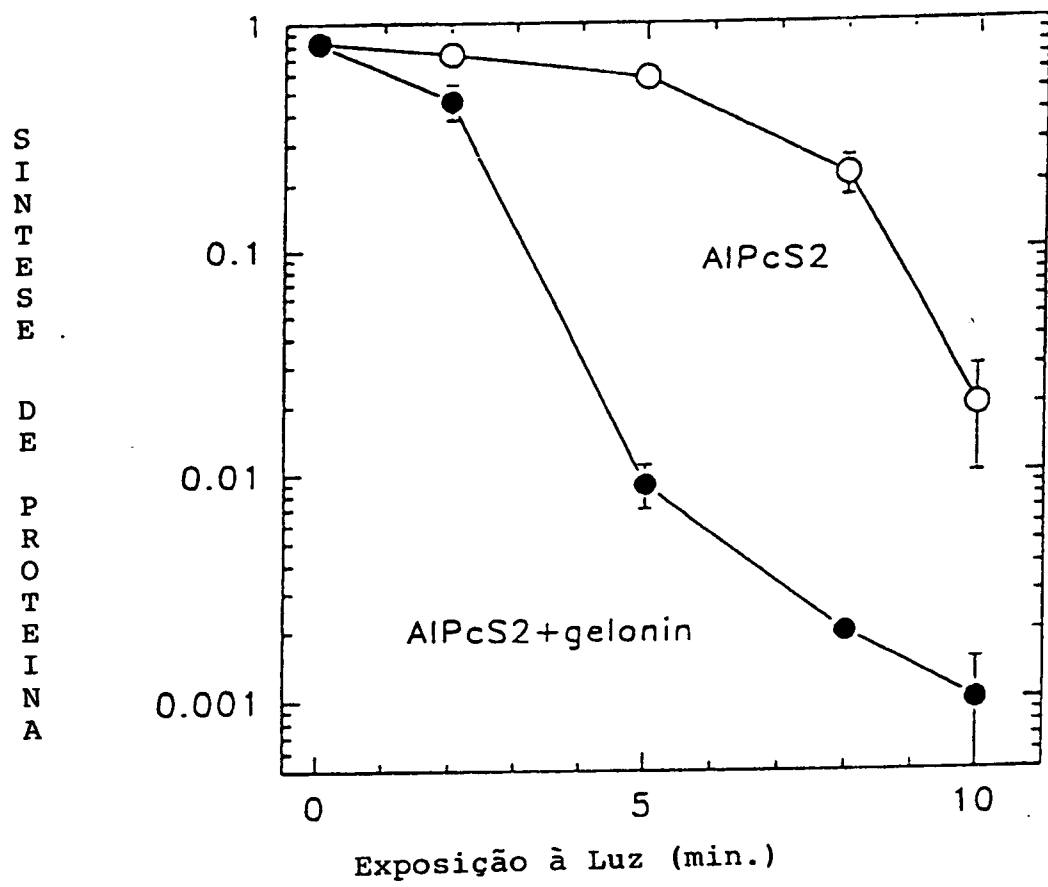


FIG. 5

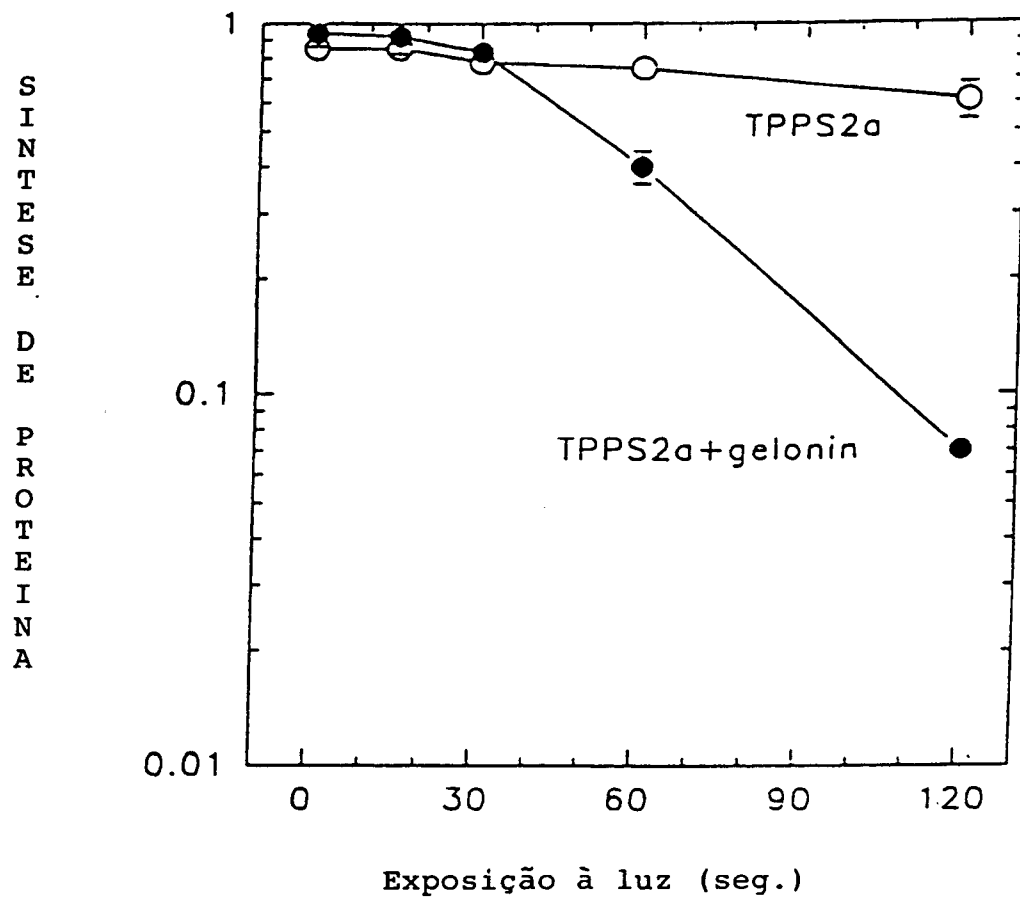


FIG. 6

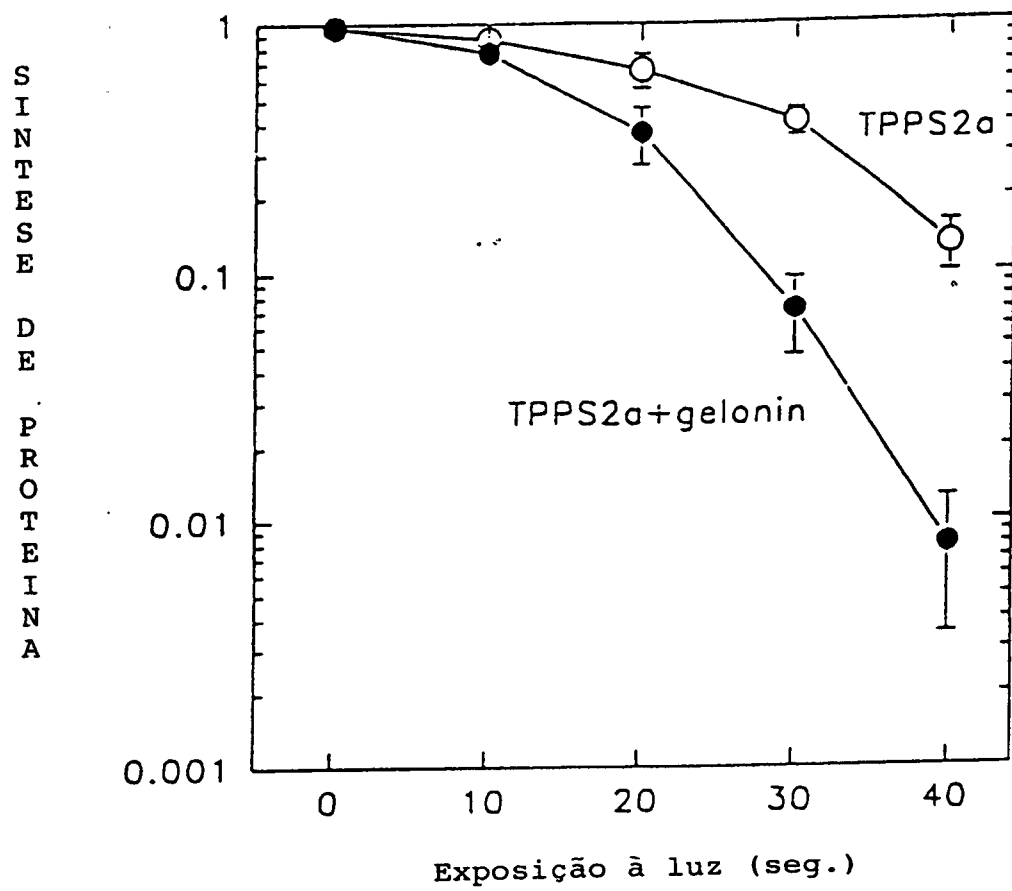


FIG. 7

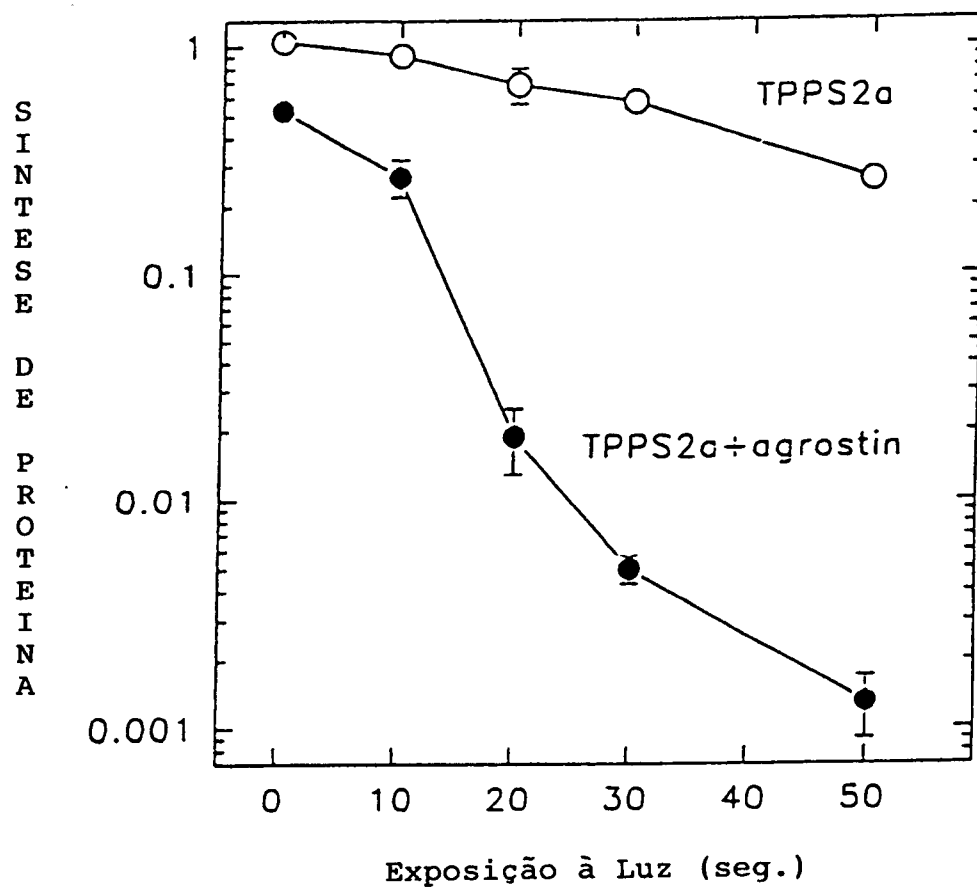


FIG. 8

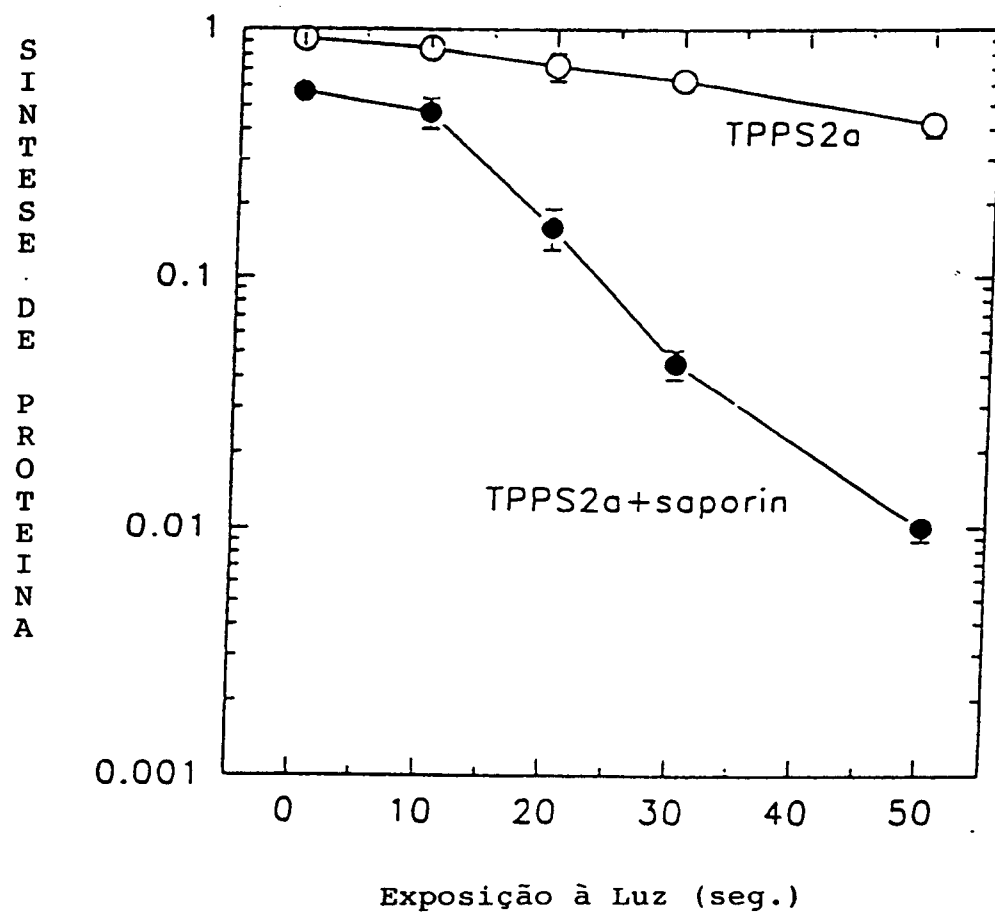


FIG. 9

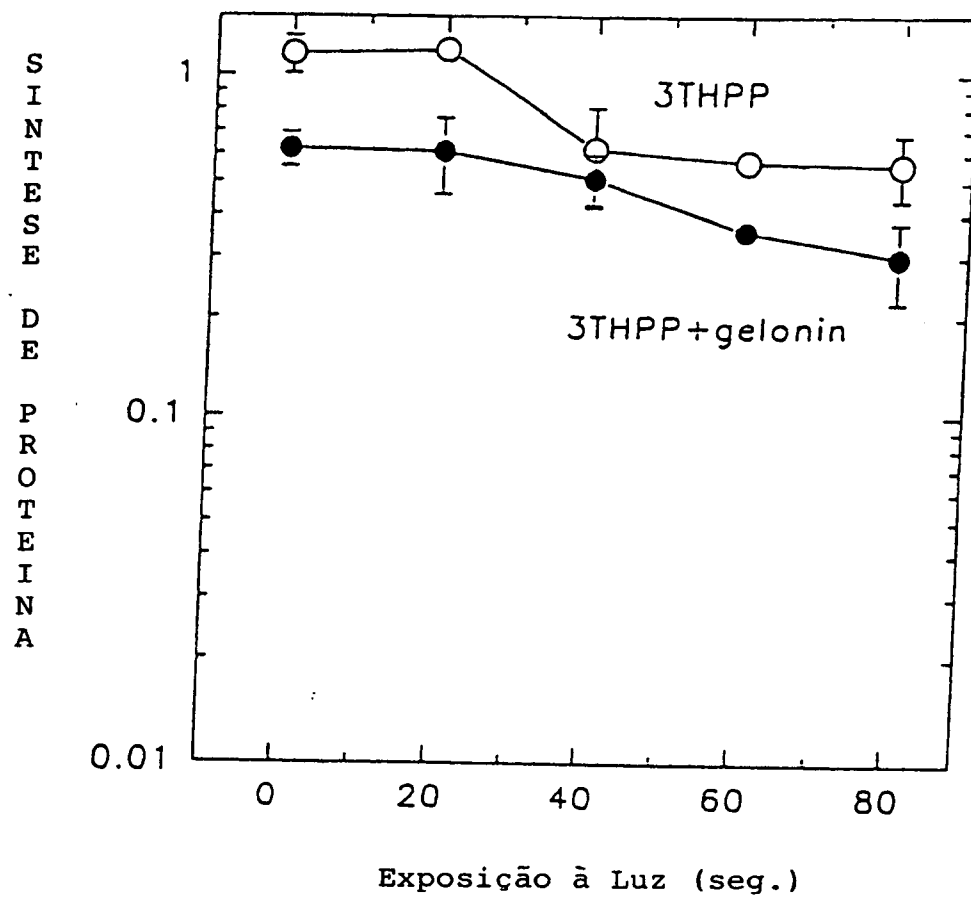


FIG. 10

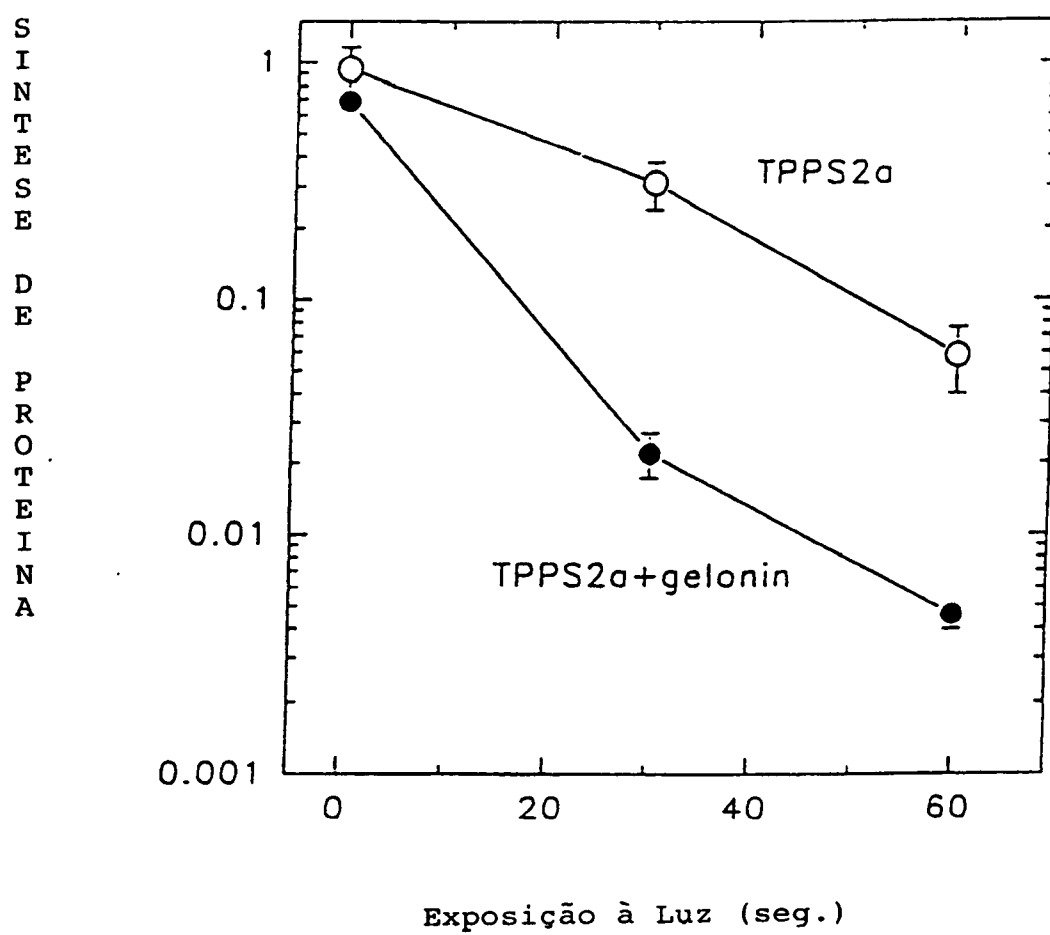


FIG. 11

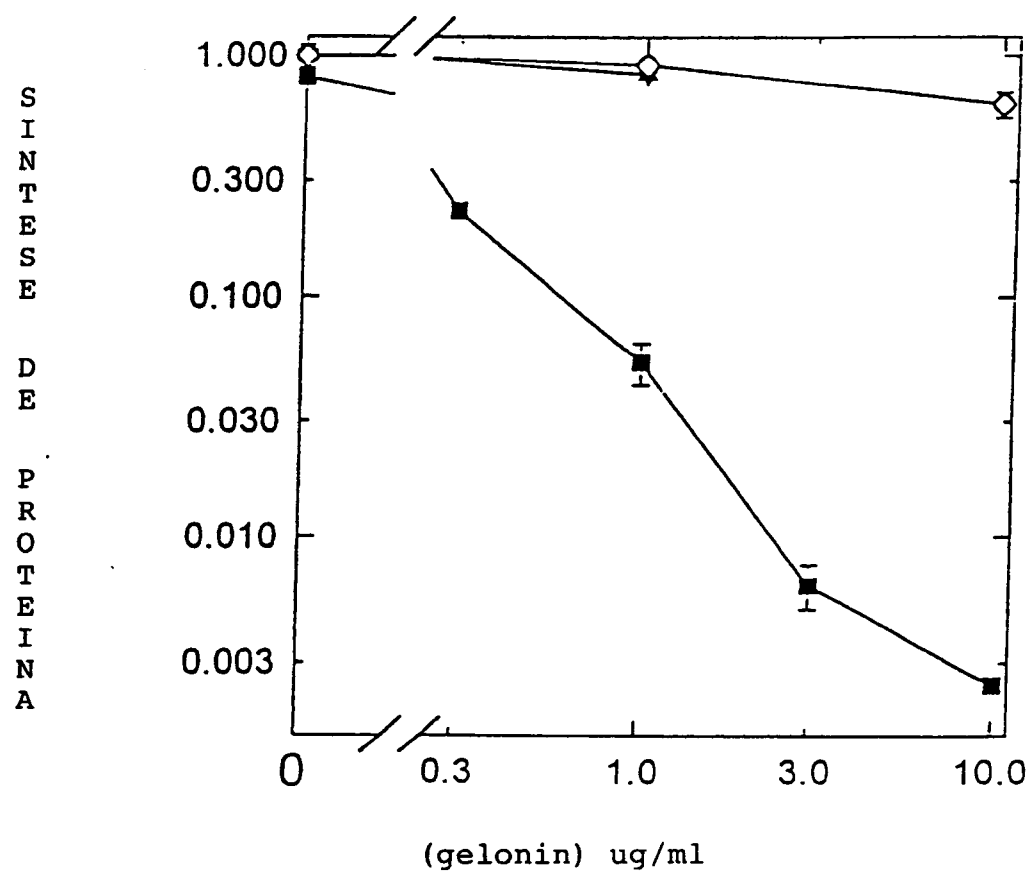


FIG. 12

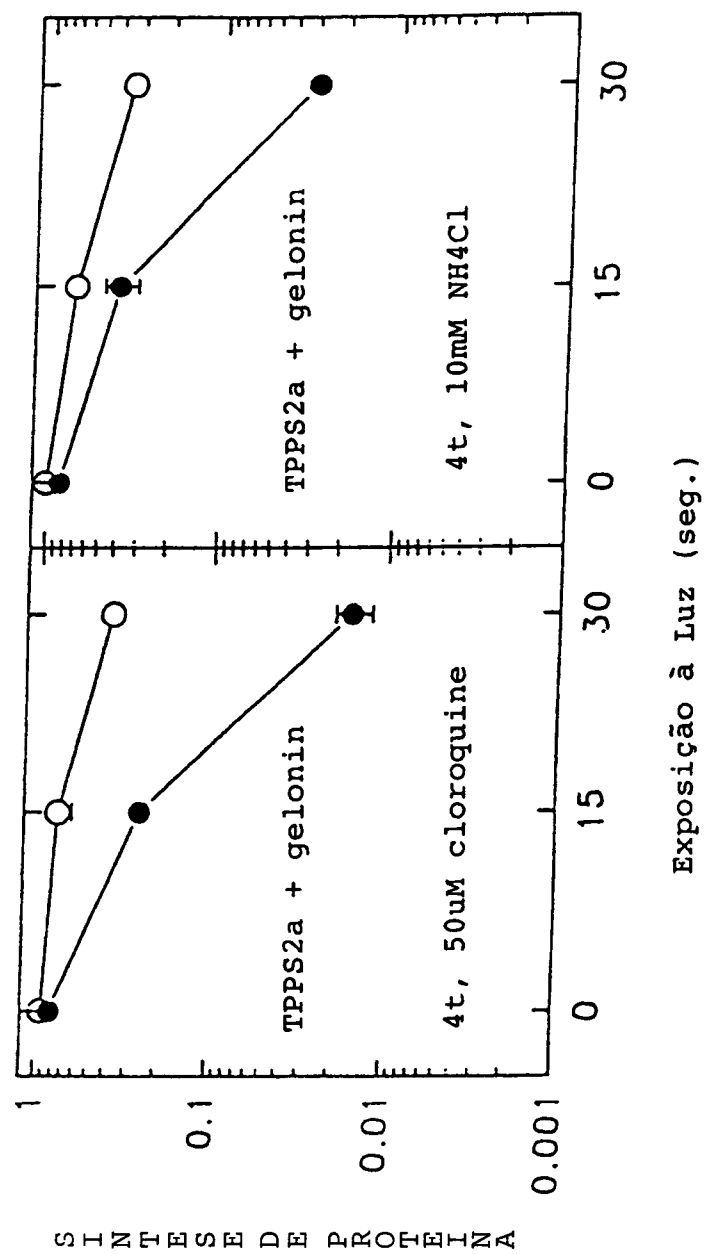


FIG. 13