(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4148328号
(P4148328)

(45)発行日　平成20年9月10日(2008.9.10)　(24)登録日　平成20年7月4日(2008.7.4)

| (51)Int.Cl. | | F I | |
|---|---|---|---|
| A61K 47/48 | (2006.01) | A61K | 47/48 |
| A61K 47/00 | (2006.01) | A61K | 47/00 |
| A61K 38/55 | (2006.01) | A61K | 37/64 |
| A61P 35/00 | (2006.01) | A61P | 35/00 |

請求項の数 18　(全 13 頁)

| | |
|---|---|
| (21)出願番号 | 特願平8-509404 |
| (86)(22)出願日 | 平成7年9月4日(1995.9.4) |
| (65)公表番号 | 特表平10-508295 |
| (43)公表日 | 平成10年8月18日(1998.8.18) |
| (86)国際出願番号 | PCT/NO1995/000149 |
| (87)国際公開番号 | WO1996/007432 |
| (87)国際公開日 | 平成8年3月14日(1996.3.14) |
| 審査請求日 | 平成14年8月30日(2002.8.30) |
| (31)優先権主張番号 | 943327 |
| (32)優先日 | 平成6年9月8日(1994.9.8) |
| (33)優先権主張国 | ノルウェー(NO) |

(73)特許権者
フォトキュアー　アーエス
ノルウェー　エヌ－０３１０　オスロ　ヌーレヴァイエン　７
(74)代理人
弁理士　木村　進一
(74)代理人
弁理士　河野　登夫
(72)発明者　バルグ，クリスティアン
ノルウェー　エヌ－１３８０　ヘッゲダール　ヴォーレンヴァイエン　１５８
(72)発明者　サンドヴィーク，ヒシュテン
ノルウェー　エヌ－０２８３　オスロ　ベストゥムヴァイエン　８２ア

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞サイトゾルへの化合物の移入

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

サイトゾルに移入予定の膜不浸透性化合物と、光による活性化によって細胞内区画膜を破壊する光増感性化合物との両方を含み、かつ、成分たる前記両化合物を、適宜、担体化合物に結合させることにより所定の細胞内区画への移入を容易にして、温血動物または細胞培養における新生物およびその他の細胞プロセスを処理するための組成物。

【請求項２】

担体化合物は、光増感性化合物と、サイトゾルに移入予定の細胞プロセス処理化合物の少なくともいずれかに結合していることを特徴とした請求項１に記載の新生物を処理するための組成物。

【請求項３】

サイトゾルに移入予定の膜不浸透性化合物は抗新生物化合物である請求項１又は２に記載の新生物を処理するための組成物。

【請求項４】

抗新生物化合物がゲロニンである請求項３に記載の新生物を処理するための組成物。

【請求項５】

サイトゾルに移入予定の膜不浸透性化合物は、DNA、オリゴ（デオキシ）ヌクレオチド、mRNA、アンチセンスDNA、糖類、タンパク質類、ペプチド類、および前記化合物の共有結合体または非共有結合体を含む群から選択されることを特徴とした請求項１又は２に記載の新生物を処理するための組成物。

【請求項６】
光増感性化合物のリソソーム系光増感剤は、4個のスルホネート基をもつメソテトラフェニルポルフィン（$TPPS_4$）、隣接するフェニル環上に２個のスルホネート基をもつメソテトラフェニルポルフィン（$TPPS_{2a}$）、又は、隣接するフェニル環上に２個のスルホネート基をもつアルミニウムフタロシアニン（$AIPcS_{2a}$）のいずれかである請求項１乃至５のいずれかに記載の新生物を処理するための組成物。
【請求項７】
光増感性化合物は、隣接するフェニル基上に２個のスルホネート基をもつメソテトラフェニルポルフィンであることを特徴とした請求項６に記載の新生物を処理するための組成物。
【請求項８】
担体が、光増感性化合物またはサイトゾルに移入予定の化合物の取り込みを容易にする部位指向性化合物から選択されることを特徴とした請求項１乃至７のいずれかに記載の新生物を処理するための組成物。
【請求項９】
担体が、抗体、トランスフェリン、または、復元したLDL－粒子上のアポＢのいずれかである請求項８に記載の新生物を処理するための組成物。
【請求項１０】
リソソーム系光増感剤から選択された光増感性化合物と、光増感性化合物に吸収された光とを利用して生細胞のサイトゾルに化合物を移入するための医薬品を製造するための、請求項１乃至９のいずれかに記載の、新生物を処理するのに使用する組成物であって、
ａ）　光増感性化合物と移入される化合物とは、適宜、［同じまたは異なる］担体化合物に結合されており、
ｂ）　光増感性化合物および移入される化合物は、取り込み作用等により［エンドソーム、リソソームまたは］所定の細胞内の膜制限区画に移入され、それにより細胞は、
ｃ）　所望の生存率に応じた量で、光増感性化合物の吸収スペクトラムに応じた適宜の波長をもった光に曝され、その結果、エンドソーム膜、リソソーム膜、または細胞内の膜制限区画膜が破壊されてサイトゾルに移入予定の化合物は同サイトゾルへの移入を果たし、かつ、光により活性化された光増感性化合物自身による細胞破壊は最小にとどめることのできることを特徴とした、新生物を処理するのに使用する組成物。
【請求項１１】
担体化合物が、サイトゾルに移入予定の化合物と光増感性化合物のいずれか一方とのみ結合した請求項１０に記載の、新生物を処理するのに使用する組成物。
【請求項１２】
サイトゾルに移入される化合物は膜不浸透性化合物であって、該膜不浸透性化合物は、DNA、オリゴ（デオキシ）ヌクレオチド、mRNA、アンチセンスDNA、糖類、タンパク質類、ペプチド類、および前記化合物の共有結合体または非共有結合体を含む群から選択されたものであることを特徴とした請求項１０又は１１に記載の、新生物を処理するのに使用する組成物。
【請求項１３】
サイトゾルに移入の化合物は、タンパク質合成活動を適合化する（modifying）物質であることを特徴とした請求項１０乃至１２のいずれかに記載の、新生物を処理するのに使用する組成物。
【請求項１４】
サイトゾルに移入の化合物は、ゲロニン、サポリン、またはアグロスチン、またはこれらの組合せのいずれかであることを特徴とした請求項１２に記載の、新生物を処理するのに使用する組成物。
【請求項１５】
使用される光増感性化合物は、リソソーム系光増感剤である４個のスルホネート基をもつメソテトラフェニルポルフィン（$TPPS_4$）、隣接するフェニル［基］環上に２個のスルホ

ネート基をもつメソテトラフェニルポルフィン（$TPPS_{2a}$）、又は、隣接するフェニル環上に２個のスルホネート基をもつアルミニウムフタロシアニン（$AlPcS_{2a}$）のいずれかであることを特徴とし、かつ、請求項１０乃至１４のいずれかに記載の、新生物を処理するのに使用する組成物。

【請求項１６】

使用される光増感性化合物は、隣接するフェニル［基］環上に２個のスルホネート基をもつメソテトラフェニルポルフィン（$TPPS_{2a}$）、４個のスルホネート基をもつメソテトラフェニルポルフィン（$TPPS_4$）または、隣接するフェニル環上に２個のスルホネート基をもつアルミニウムフタロシアニン（$AlPcS_{2a}$）またはこれらの組合せのいずれかであることを特徴とした、請求項１５に記載の新生物を処理するのに使用する組成物。

【請求項１７】

使用される担体化合物は、光増感性化合物またはサイトゾルに移入予定の化合物の摂取を容易にする部位指向性化合物であることを特徴とした請求項１０乃至１６のいずれかに記載の、新生物を処理するのに使用する組成物。

【請求項１８】

生存細胞（survival cells）の割合（fraction）が、光増感性化合物の濃度に応じて選択された光量によって調節されたことを特徴とする請求項１０乃至１７のいずれかに記載の、新生物を処理するのに使用する組成物。

【発明の詳細な説明】

本発明は、光力学処理によって細胞の大部分を殺すことなく、光力学処理を用いてエンドソームおよびリソソーム膜を破壊することによって細胞に化合物を移入する方法に関する。

大部分の化合物は細胞膜を容易には通過できない。生細胞のサイトゾルへ化合物を移入する方法は、生物学的プロセスの操作や実験では有用な手段である。今日最も普通に使用されている方法のうちには、マイクロインジェクション、赤血球細胞ゴースト媒介融合およびリソソーム融合、ピノソームの浸透圧溶解、スクレープローディング、エレクトロポレーション、リン酸カルシウムおよびウイルス媒介トランスフェクションがある。これらの技術は、培養中の細胞を検査する上で有用である。ただし、多くの場合、非現実的（impractical）で、時間がかかり、効率が悪く、場合によっては、細胞を殺してしまうという深刻な事態を招きかねない。したがって、こうした技術は、細胞の機能を保持したままであるべき生物学的および医学的研究または治療においては最適とはいえない。

ポルフィリン類およびその他の光増感性化合物が細胞および組織に対して細胞障害を誘発することはよく知られている。これらの効果は、露光に際して、光増感性化合物がシングレット$^1O_2$を放出し、これが細胞の膜および細胞構造を分解し、もし破壊が広範囲に及べば（extensive）結局は細胞を殺してしまうことになる。この細胞障害効果はいくつかのタイプの腫瘍等の新生物病を治療するのに利用されてきた。この治療は光力学療法（photodynamic therapy［PDT］）と命名され、光増感性を有し且つ腫瘍位置を決定できる染料の注入、続いての腫瘍領域での露光に基づく。細胞障害効果は主としてシングレット酸素の形成を通じて媒介される。この反応性中間体は非常に短い細胞中寿命（＜0.04μ秒）を有する。かくして、PDTの第一の細胞障害効果は光照射の間に$^1O_2$の形成部位の非常に近くで発揮される。$^1O_2$はタンパク質（ヒスチジン、トリプトファン、メチオニン、システイン、チロシン）、DNA（グアニン）、不飽和脂肪酸およびコレステロールと反応しそれを酸化する。PDTの利点の１つは、光に曝されなかった組織が影響されないということである。望まない細胞集団、例えば、新生物細胞を破壊するためのPDTの使用に関して多くの文献がある。単独の光力学化合物、または複合体をより細胞特異的とする新生物細胞レセプター抗原決定基に指向された免疫グロブリンと結合された光力学化合物に関するいくつかの特許がある。ヘマトポルフィリンのごときある種の光化学化合物はさらに悪性細胞に濃縮する固有の能力を有する。望まない細胞を破壊することに向けられたこれらの方法および化合物はノルウェー特許第173319号、ノルウェー特許出願第900731号、第902634号、第901018号、第941548号、第851897号、第934837号、第924151号および第891491号に記

載されている。
PCT/US93/00683は、コポリマー担体に結合させた抗癌薬物および光活性化薬物からなる薬物送達系を開示している。投与に際して、この複合体は、飲作用または食作用によって細胞内部に侵入し、エンドソームおよびリソソーム内部に止まるであろう。リソソームでは、抗新生物化合物とポリマーとの間の結合が加水分解され、前者はリソソーム膜を通って受動的にサイトゾルまで拡散できる。したがって、この方法はリソソーム膜を通過して拡散できる小さな分子化合物のための方法に限定される。拡散のタイムラグの後、適当な波長およびエネルギーの光源を適用して、光増感性化合物を活性化させる。抗癌薬物および光活性化薬物の相乗効果により、細胞が破壊される。かくして、公知の光活性化化合物を使用した場合は、すべて細胞構造を広範囲にわたって破壊し、結局細胞を死滅させることになる。エンドソーム／リソソーム膜の局所的破壊の後に膜不浸透性化合物をサイトゾルに放出する方法は知られていない。
かくして、本発明の目的は、その取込みを円滑にするため担体を用いて生きた細胞（living cells）を、光活性化化合物とサイトゾルに移入すべき化合物とに接触させ（exposing）、さらに、適当な波長およびエネルギー量の光に曝すことにより、大部の細胞の機能を温存ししつ、エンドソーム膜およびリソソーム膜を破壊して前記化合物をサイトゾルに放出する（release）ことによって、培養または組織中の、生細胞のサイトゾルに化合物を移入する方法を提供することにある。光増感剤とサイトゾルに移入すべき化合物とは、適当な担体と複合体化されるか、又は、別個に適当な担体に担持されることによって、随意に目的とする化合物を容易に摂取（uptake）ができる。その場合、担体は、光増感剤と移入予定の化合物の両方、またはそのいずれかに結合されている。
本発明の目的は、添付の請求の範囲に特定された本発明の特徴的構成によって達成される。
本発明は、化合物がサイトゾルでの利用可能性を保ち、また細胞もその機能を失うことなく、化合物を生細胞のサイトゾルに移入する方法に関する。これは、担体化合物、標的化免疫グロブリン類およびサイトゾルに移入されるべき化合物に結合された状態で、または分離された状態で一緒に細胞に摂取され、エンドソーム、リソソームまたは他の細胞区画に位置する筈の光活性化化合物に細胞を曝し、光増感性化合物を活性化する適当な波長の光に細胞を曝して、光活性化化合物の作用およびエンドソーム／リソソーム内容物の可能な作用によって、エンドソーム、リソソームまたは他の細胞区画膜のみが破壊され、細胞がその機能を喪失することなく該化合物がサイトゾルに放出されることによって達成される。
以下、本発明を図面に従い詳説する。
図１は、本発明によって、どのようにして化合物を細胞サイトゾルに移入できるかを図示している。光増感剤（Ｓ）および選択した化合物（Ｍ）は細胞（Ｉは飲食プロセス（endocytic process）を開始する原形質膜の嵌入部を示す）によって飲食され、両物質は同一の小胞（II）に至る。これらの小胞が光に曝されると、小胞の膜は破壊され、内容物は放出される（released）（III）。
図２は、$TPPS_{2a}$の不存在下および存在下におけるゲロニンでの処理および50秒での光照射の後におけるNHIK3025細胞におけるタンパク質合成を示す。記号:○、$TPPS_{2a}$＋光；●、-$TPPS_{2a}$－光；▽、＋$TPPS_{2a}$－光；▼、-$TPPS_{2a}$＋光。細胞を3.2μg/ml $TPPS_{2a}$および示した濃度のゲロニンで一晩処理し、すべての場合、同一の光量とする。タンパク質合成は、光照射の24時間後における$^{3}$［H］ロイシンのタンパク質への取込を測定する方法とした。
図３は、$TPPS_{2a}$および光のみで処理した（○）、または図２に記載した0.2μg/ml（▽）もしくは2.0μg/mlゲロニンと組み合わせて処理した細胞についての用量－反応曲線を示す。
図４は、0.2μg/mlゲロニンの不存在下および存在下における3.2μg/ml $TPPS_{2a}$での処理後におけるNHIK3025細胞でのタンパク質合成を示す。記号：●、$TPPS_{2a}$－ゲロニン；○、$TPPS_{2a}$＋ゲロニン。ゲロニンの不存在下または存在下で細胞を$TPPS_{2a}$で一晩処理し、示し

た量の光に曝した。タンパク質合成は、$^{3}$［H］ロイシンのタンパク質への取込を測定する方法とした。
図５は、１μg/mlゲロニンの不存在下および存在下における25μg/ml $AlPcS_2$および光での処理後のV79細胞でのタンパク質合成を示す。記号：●光増感剤＋トキシン；○光増感剤。
図６は、１μg/mlゲロニンの不存在下および存在下における0.3μg/ml $TPPS_{2a}$および光での処理後のH146細胞でのタンパク質合成を示す。記号：図５に同じ。
図７は、１μg/mlゲロニンの不存在下および存在下における１μg/ml $TPPS_{2a}$および光での処理後のV79細胞でのタンパク質合成を示す。記号：図５に同じ。
図８は、１μg/mlアグロスチンの不存在下および存在下における3.2μg/ml $TPPS_{2a}$および光での処理後のNHIK3025細胞でのタンパク質合成を示す。記号：図５に同じ。
図９は、１μg/mlサポリンの不存在下および存在下における3.2μg/ml $TPPS_{2a}$および光での処理後のNHIK3025細胞でのタンパク質合成を示す。記号：図５に同じ。
図10は、１μg/mlゲロニンの不存在下および存在下における0.25μg/ml 3-THPPおよび光での処理後のNHIK3025細胞でのタンパク質合成を示す。記号：図５に同じ。
図11は、１μg/mlゲロニンの不存在下および存在下における３μg/ml $TPPS_{2a}$および光での処理後のCOS-7細胞でのタンパク質合成を示す。記号：図５に同じ。
図12は、$TPPS_4$の不存在下または存在下におけるゲロニンでの処理および50秒の光照射後のNHIK3025細胞でのタンパク質合成を示す。記号：■$TPPS_4$＋光；▼－$TPPS_4$－光；◇＋$RPPS_2$－光。細胞を75μg/ml $TPPS_4$および示した濃度のゲロニンで一晩処理し、すべての場合、光量は同じとする。タンパク質合成は光照射24時間後に$^{3}$［H］ロイシンのタンパク質への取込を測定した。
図13は、光の照射前に、３μg/mlゲロニンの不存在下または存在下において、３μg/ml $TPPS_{2a}$で18時間、続いて$TPPS_{2a}$不存在下で４時間処理した後のOHS細胞におけるタンパク質合成を示す。細胞を50μMクロロキンまたは10mM $NH_4Cl$中、同一の４時間インキュベートして、リソソームタンパク質分解を阻害した。
ジスルホン化アルミニウムフタロシアニンおよびテトラスルホン化アルミニウムフタロシアニン、スルホン化テトラフェニルポルフィリン（TPPSn）、ナイルブルー、クロリン$e_6$誘導体、ウロポルフィリンＩ、フィロエリスリンおよび恐らくはヘマトポルフィリンおよびメチレンブルーを含めた多数の薬物が培養中の細胞のエンドソームおよびリソソームに存在することは既に文献上明らかにされている（well documented。これは、ほとんどの場合、飲食作用（endocytic activity）によるものである。本発明者らは、それらのリソソームに光増感剤を含有している細胞を光に曝すことがリソソームの浸透性化および光増感剤の放出に導くことを実証した。いくつかの場合、例えば、$TPPS_{2a}$および$TPPS_1$の場合、かなりの量のリソソーム酵素の活動がPDT後のサイトゾルで起こっていることが確認されており、これは、リソソーム内容物がその活性を失うことなくサイトゾルに放出され得ることを示す。光増感剤染料のこの効果は、一般に、本研究によると、エンドソームおよびリソソームから飲食された化合物を放出するのに使用することができる。
化合物の細胞質への移入は、光増感剤染料、担体化合物および免疫グロブリンと一緒にまたは別々に細胞のサイトゾルに移入したいと思う化合物に、これらはなによりも先ず（preferentially）すべてのエンドソームおよび／またはリソソームに存在することが望まれるが、細胞または組織をまず曝すことによって達成される。第２に、細胞または組織を適当な波長およびエネルギーの光に曝し、光力学反応を誘導する。この光力学反応はリソソームおよび／またはエンドソーム膜を破壊し、これらの小胞の内容物はサイトゾルに放出される。
本発明の原理は図１に示す。光増感剤および細胞に移入すべき化合物は同一区画内に局在する必要がある。また、外部的には、添加された化合物はリソソームおよびエンドソーム以外の細胞内区画、例えば、ゴルジ体（Golgi apparatus）および小胞体に蓄積することができる。かかる場合において、同一区画内に局在した光増感性化合物は光と組み合わせて同一目的で使用できる。但し、光量および光増感性化合物の組合せは細胞の機能を破壊

することはない。
本発明は、光と組み合わせた光増感剤、例えば、$TPPS_{2a}$（隣接するフェニル基上に２のスルホネート基を持つテトラフェニルポルフィン）は、大部分の細胞を生かしつつ機能的に無傷のリソソーム内容物の放出を誘導できるという発明者によるイン・ビトロ証明に基づくものである。同一の効果は、単独の、または光増感剤をエンドソーム・リソソームまたは他の細胞内区画に方向づける担体として使用する他の化合物または粒子と組み合わせた、および／または、それに連結させた他の光増感性化合物を用いることによっても得られる。かかる担体は細胞表面に結合し、かくしてレセプター媒介飲食作用（receptor-mediated endocytosis）を通じて光増感剤の摂取を増加させる組織または細胞特異的抗体または他のリガンドであり得る。もう１つの担体は復元したLDL－粒子の使用であろう。これらの粒子もレセプター媒介飲食作用によって摂取される。LDL粒子当たりの光増感剤の数およびLDL－粒子への結合は、このようにして、天然LDLへの予備結合と比較して増大し得る。
本発明は、イン・ビトロ使用に限定されず、イン・シトゥ処理（insitu treatment）でもエクス・ビボ処理でも、処理細胞の直後の注入を条件に、イン・ビボでも使用できる。エンドソームおよびリソソームへの摂取はイン・ビトロ処理につき前記したと同様にして増強できる。光増感剤が標的細胞によって摂取され、かつ、適量の光（properly delivered）に露光される限りすべての組織（tissues）を処理することができる。
本発明は、光増感剤および光の双方に基づく。光は光増感剤によって吸収されなければならないか、または間接的に光増感剤を励起状態とするものなければならない。従って、使用する波長領域は光増感剤に依存する。照射光は単色または平行にしたものである必要はない。適当な波長を放射するものであれば、光源の如何を問わない。
驚くべきことに、本研究によると光力学作用は、リソソーム内容物を放出する潜在的細胞障害効果を中和すると思われる。本発明者（present authors）は、NHIK3025細胞の培養において、リソソームカテプシンが$TPPD_{2a}$の光力学作用によって実質的に阻害されることを立証している。これは驚くべき本発明の効果であって、エンドソーム／リソソーム膜を破壊することによって化合物をサイトゾルに移入した後に細胞の生存性および機能を維持するのを助ける。
実験例および臨床利用例
１）癌処理
ある種の光増感剤は新生物組織に優先的に蓄積し、周囲の組織一面にひろがる（over the surrounding tissue）腫瘍を選ぶには通常２～３の因子（factor）があるが、この因子は、ある症例、たとえば脳組織の場合にはより高く、すなわち、30くらいになることもある。癌治療に臨床的に関係はある（clinical interest）が、サイトゾルへの摂取性が低いか、またはその可能性がないために制約される化合物は、本発明の手段によって移入することができる。後記するゲロニンはこのような化合物の例である。いくつかの他の化合物は、単独でまたは他の化合物（例えば、抗体、トランスフェリン、光増感剤、復元したLDL－粒子上のアポＢ）に連結して使用できる。かかる組合せ処理の利点は、１）リソソームおよびエンドソームの破壊には毒性下での低い光の量で十分であるので、腫瘍組織の深い層での細胞毒効果（cytotoxic）が増強される；２）PDTは、腫瘍の局在箇所に対してのみ施されるのでトキシンの特性（specificity）が増強されることになる。
２）遺伝子治療
遺伝子治療、すなわち、患者細胞に対する遺伝子の治療的移入は、癌、嚢胞性線維症、心血管病およびその他多くの病気に遺伝的障害を治療する方法として有望である。今日、主な問題は、イン・ビボでおこなう必要があること、あるいは、ある場合にはエクス・ビボでトランスフェクションをおこなわなければならないということである。今日、最も頻繁に使用される担体、すなわち、DNA分子を細胞に移入するのを便ならしめる構造体は、異なるタイプのウイルス、特にレトロウイルスおよびアデノウイルスである。かかる方法の欠点は、担体の安定性が低い、特性が限られている、収率が低い、ウイルスDNAのヒト細胞への移入度が低いことである。

アンチセンスDNAまたは全遺伝子のいずれかのDNAは、エンドソームおよび／またはリソソームが光化学的に破壊されることに助けられて細胞に移入できる。処理はイン・ビボで達成できる。

３）実験的利用

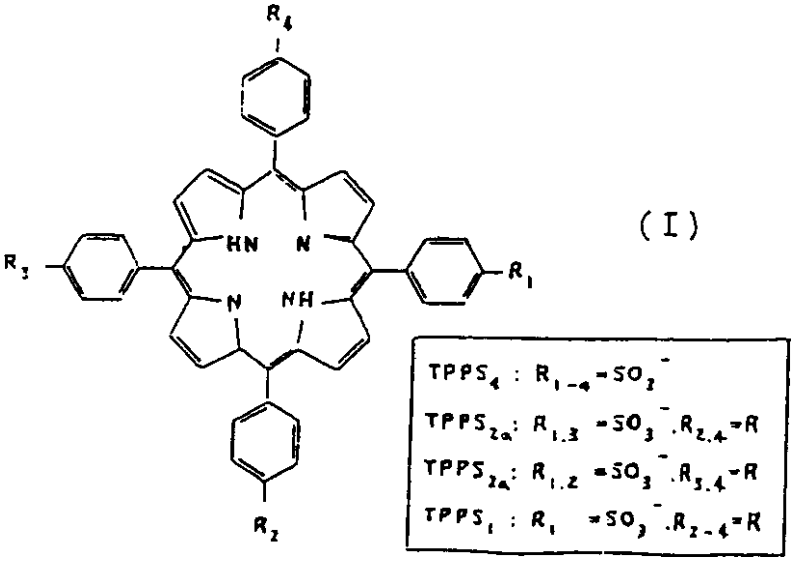
本発明によって、種々の種類の化合物を培養中の細胞に移入することができる。例えば、通常は原形質膜に不浸透性である遺伝子、抗体、操作されたタンパク質および化合物などである。

本発明を以下、実施例に基づいて説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例１　本実施例は、光力学処理によってタンパク質合成阻害化合物がサイトゾルに放出されることを説明する。

多数の植物トキシンは、サイトゾルに侵入し、リボソーム機能を酵素的に不活化することによって細胞を殺す。ほとんどの細胞毒性植物タンパク質は、ジスルフィド架橋によって一緒に連結された２のポリペプチド鎖ＡおよびＢからなる。鎖Ｂの機能はタンパク質を細胞の表面に結合させることにあり、他方、鎖Ａは酵素的活性を含有する。ゲロニンは、無細胞系でタンパク質合成を効果的に阻害する植物トキシンであるが、無傷細胞に対してはほとんどか、または全く効果を有しない。無傷細胞に対する低い細胞障害効果は、恐らくは、ゲロニンにおけるＢ鎖の欠如によるものであろう。

細胞を光に曝す前に、NHIK3025細胞を$TPPS_{2a}$（式Ｉ）およびゲロニンで、別々にまたは一緒に18時間、続いて$TPPS_{2a}$およびゲロニン無しの培地中で１時間インキュベートした。タンパク質合成を光の照射24時間後に測定した。細胞単独を10～20％殺す光力学処理はタンパク質合成を30～40％低下させた（図２）。図２に示すごとく、ゲロニン単独は、光の存在下または不存在下でタンパク質合成をある程度まで阻害する。しかしながら、PDTに$IC_{50}$＝0.2μg/mlゲロニンを組み合わせることによって完全に阻害できる。このように、光力学処理の不存在下では、ゲロニンは実質的にサイトゾルに侵入しなかった。本実施例は、$TPPS_{2a}$および光を用いて、機能的に無傷のマクロ分子を細胞サイトゾルに移入するのに使用できることを示す。




（Ｉ）

実施例２　本実施例は、（染料に吸収される波長を持つ）光を照射することにより（dose of light）、生存する細胞分率の大きさをどのようにして決定できるかを説明する。

NHIK3025細胞を、実施例１と同じようにして$TPPS_{2a}$およびゲロニンと共にインキュベートした。

細胞のクローン原性を24時間の露光後に測定した。図３に示すように、光照射を増加させた場合、実質的に全ての細胞が$TPPS_{2a}$および光で殺された。これは、望まない細胞をPDTで殺すことに関する先行技術と合致する。ゲロニンを添加すると、タンパク質合成に対するゲロニンの阻害効果のため、生存率は降下し、これは今やゲロニンがサイトゾルに移入

されたことを示す。添加ゲロニンの濃度を増加させることにより、サイトゾル内のゲロニンの濃度が増すことは、細胞が光不活化に対しより敏感になることで示されている。
このように、本発明は、各場合における生存レベルを設定し、生きた細胞の所望の割合を維持する光増感性化合物と光照射との組合せを選択する可能性を供する。
実施例３　本実施例は、タンパク質合成比により判断して、いかにして光の照射変化によりサイトゾルに移入されるゲロニンの量が抑制されるかを示している。
実施例１と同様にNHIK3025細胞を$TPPS_{2a}$およびゲロニンと共にインキュベートした。
図４は、タンパク質合成比によって判断して、50秒のトキシン投入（dose）を超える光の照射がサイトゾルにおけるゲロニン比率を増大させたことを示す。
実施例４～11は、異なる細胞系に対する、異なる光増感剤およびトキシンでの、本発明による方法の使用を示す。光増感剤の細胞内位置はリソソーム（$TPPS_4$、$TPPS_{2a}$、$AlPcS_{2a}$）およびリソソーム外（3-THPP）である。以下に示す省略形の内容は次の通りである：隣接するフェニル環上の２個のスルホネート基を持つアルミニウムフタロシアニンを$AlPcS_{2a}$；４個のスルホネート基を持つメソテトラフェニルポルフィンを$TPPS_4$；隣接フェニル環上の２個のスルホネート基を持つメソテトラフェニルポルフィンを$TPPS_{2a}$；テトラヒドロキシフェニルポルフィンを3-THPP。使用した細胞系は、ヒト子宮頚（NHIK3025）、チャイニーズハムスター肺繊維芽細胞（V79）、SV40－形質転換アフリカミドリザル腎臓（CV1－シミアン繊維芽細胞様の細胞）（Cos-７）、ヒト骨肉腫細胞（OHS）および小細胞肺癌細胞（H146）からのイン・シトゥ・カルシノーマ細胞である。すべての実験は実施例１と同じに設定した。
実施例４　本実施例は、トキシンとしてのゲロニンの有無に応じた、V79細胞における光増感剤$AlPcS_{2a}$の使用を示す（図５）。特定の光量（照射時間）を選択することによって、トキシンがない場合には、細胞損失は僅かであり、それはタンパク質合成のわずかな減少によって示される。他方、ゲロニンがある場合には、タンパク質合成は顕著に減少する。これは、ゲロニン分子がリソソームを通じて細胞質内に移入され、その間$AlPcS_{2a}$の細胞内局在化があるにも拘わらず細胞を損失していない（Moan, J.Berg, K., Anholt, H.およびMadslien, K.［1994］）。光化学療法のための増感剤としてのスルホン化アルミニウムフタロシアニン、V79細胞における局在化、染料蛍光および光感受性に対する小光量の効果, Int. J. Cancer 58:865-870）、実質的に細胞を障害することなく、リソソームを介してゲロニン分子が細胞質に移入されることを示す。
実施例５　本実施例は、細胞の生存に実質的に影響することなく、トキシンゲロニンがH146細胞に移入されることを示す（図６）。$TPPS_{2a}$は細胞中でリソソームに存在することが知られている（Berg, K., Western, A., Bommer, J.およびMoan, J.（1990）, ヒト・カルシノーマ細胞系におけるスルホン化メソ－テトラフェニルポルフィン類の細胞内局在化, Photochem. Photobiol. 52:481-487;Berg,K., Madslien,K.,Bommer J. C., Oftebro,R., Winkelman, J.C.およびMoan, J.（1991）、NHIK3025細胞におけるスルホン化メソテトラフェニルポルフィン類の光誘導再局在化および用量分率の効果, Photochem. Photobiol. 53:203-210; Berg, K.およびMoan, J.（1994）、光化学標的としてのリソソーム, Int. J. Cancer, 59:814-822）。
実施例６　本実施例は、光増感剤として$TPPS_{2a}$を用いるV79細胞における本発明方法を説明する（図７）。
実施例７　本実施例は、光増感剤として$TPP_{2a}$を用いるトキシンアグロスチンのNHIK細胞3025への移入を説明する（図８）。
実施例８　本実施例は、$TPP_{2a}$を用いるトキシンサポリンのNHIK3025細胞の移入を説明する（図９）。
実施例９　これは、エンドサイトーシス小胞（すなわち、エンドソームおよびリソソーム）（Peng, Q., Danielsen,H.E.およびMoan,J.（1994）、癌の光力学療法についての優れた光増感剤：新生物細胞および組織における光増感剤発蛍光団の蛍光検出のための共焦点レーザー走査顕微鏡の適用：Proceedings of Microscopy, Holography, and Interferometry in Biomedicine, SPIE Vol. 2083:71-82）へ侵入しない光増感剤の場合、ゲロニンの

有り無しにて、３THPPのタンパク質合成効果間の有意な差異はない（図10）。このように、ゲロニンは細胞のサイトゾルに移入されない。

実施例10　本実施例は、本発明に従い$TPPS_{2a}$を用いることによるゲロニンのCOS-7細胞への移入を示す（図11）。

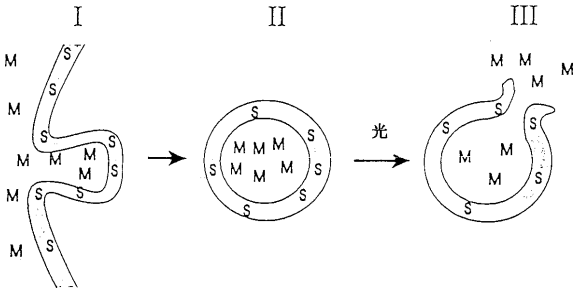
実施例11　本実施例は、本発明に従い$TPPS_{2a}$を用いることによるOHS細胞へのゲロニンの移入を示す（図13）。この細胞系では、リソソームにおいてかなりのタンパク質分解があり、これは、本実施例において、50μＭクロロキンまたは10mM $NH_4Cl$いずれか中で細胞を４時間インキュベートすることによって阻害される。

実施例12　実施例１と同様、本実施例は、細胞を$TPPS_4$および異なる濃度のゲロニンと共にインキュベートし、光に曝した場合に、ゲロニン濃度の関数としての、NHIK3025細胞へのゲロニンの移入を示す（図12）。細胞をゲロニン単独と共にインキュベートし、光に曝した場合、あるいは光の照射なくして$TPPS_4$およびゲロニンと共にインキュベートした場合、ゲロニンの細胞への移入は得られなかった。

上記実施例は、異なる光増感剤および異なる光量を用い、広範囲にわたる多種の細胞において、異なる化合物を細胞サイトゾルに移入できることを示す。移入すべき化合物および光増感剤を同一細胞区画に移入する限り、細胞を殺さない用量の光増感剤および光の照射後、外因性化合物を細胞サイトゾルに移入することができる。生物学的区画に対する光化学効果は、その区画における光増感剤の量、適用した光の量および光源の特性に依存する。従って、培養における細胞に対する光化学効果を評価する最善の方法は、処理の24時間またはそれ以上の後に細胞生存を測定することである。前記した処理の24時間後における細胞死滅に対する影響（effect）とタンパク質合成の抑制との間には上記に示すように相関性があることは確かである（データは示さず）。

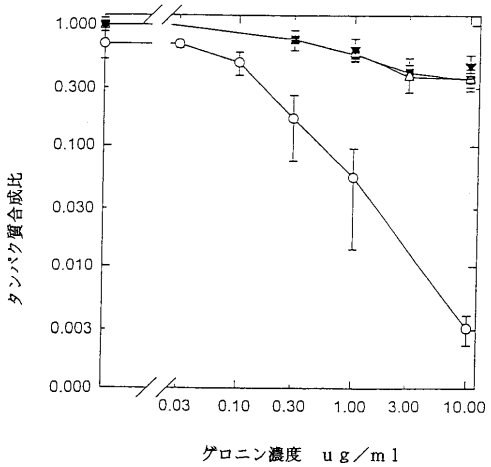
【図１】

FIG. 1



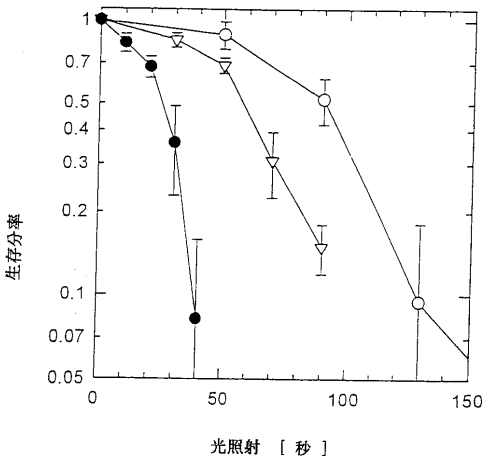

【図２】

FIG. 2



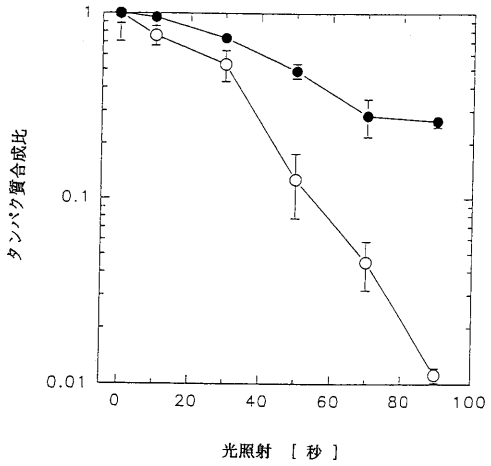
【図３】

FIG. 3



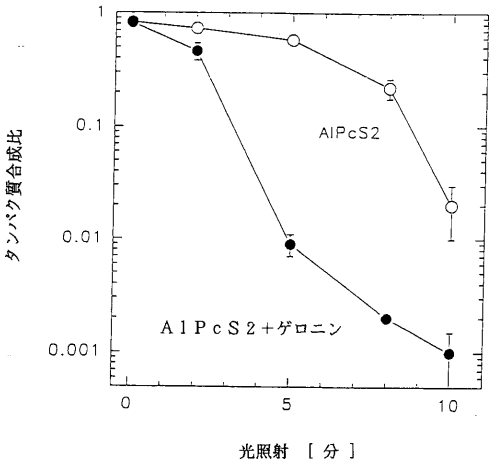

【図４】

FIG. 4



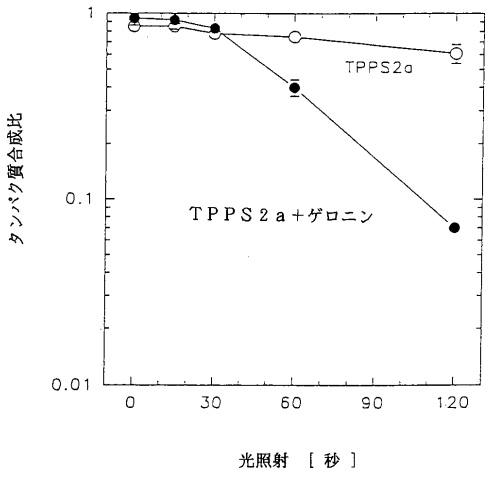

【図５】

FIG. 5



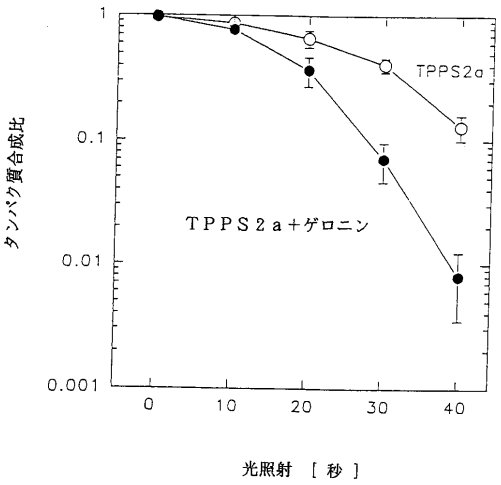

【図６】

FIG. 6



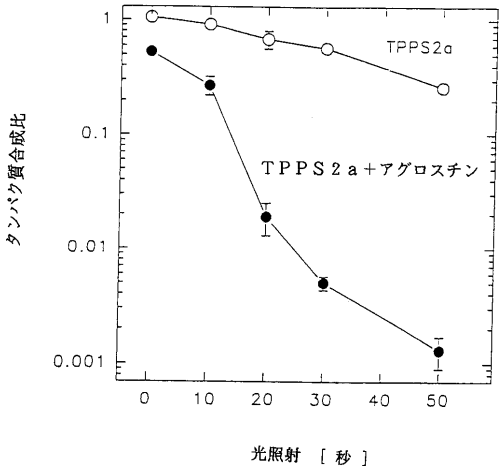
【図７】

FIG. 7



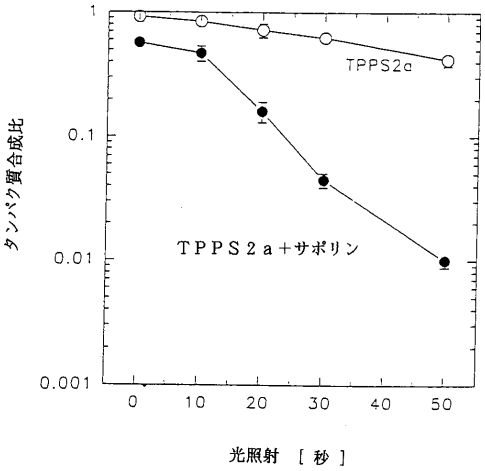

【図８】

FIG. 8



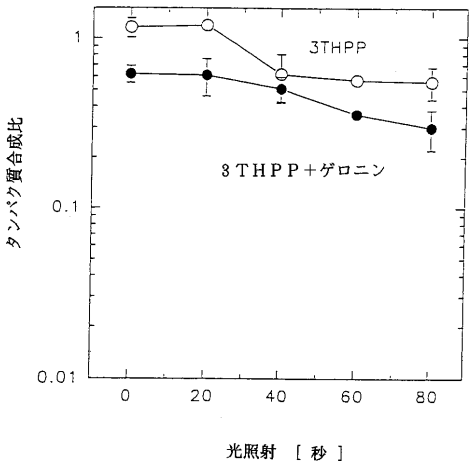

【図９】

FIG. 9



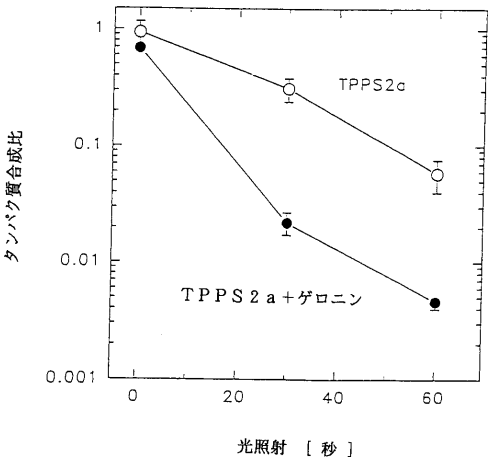

【図１０】

FIG. 10



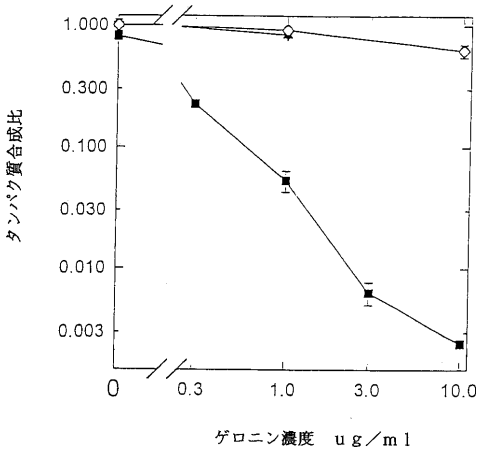
【図１１】

FIG. 11



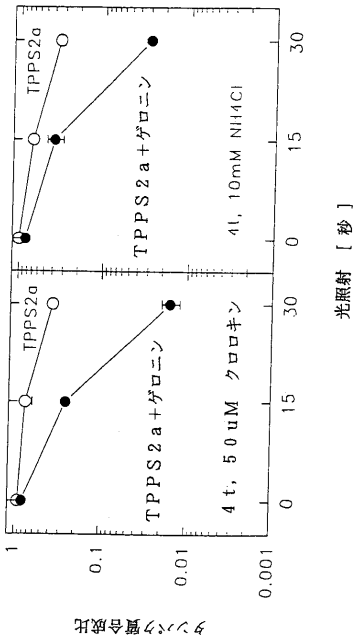

【図１２】

FIG. 12




【図１３】

FIG. 13



フロントページの続き

(72)発明者　ムーアン，ヨハン
ノルウェー　エヌ－０３８１　オスロ　オースストゥッベン　６

審査官　齋藤　恵

(56)参考文献　英国特許出願公開第２２０９４６８（ＧＢ，Ａ）
国際公開第９３／１４１４２（WO，Ａ１）
SANDVIG, K. et al., Entry of the toxic proteins abrin, modiccin, ricin, and diphtheria toxin into cells, J. Biol. Chem., １９８２年　6月１０日, Vol.257, No.13, p.7495-7503

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 47/00 - 48
A61K 38/00