HU 000222984 B1

(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

222 984 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 98 00153
(22) A bejelentés napja: 1995. 09. 04.
(30) Elsőbbségi adatok:
943327 1994. 09. 08. NO
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/NO 95/00149
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 96/07432

(51) Int. Cl.[7]

A 61 K 47/48
A 61 K 47/00

(40) A közzététel napja: 1998. 05. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2004. 01. 28.

(72) Feltalálók:
Berg, Kristian, Heggedal (NO)
Moan, Johan, Oslo (NO)
Sandviq, Kirsten, Oslo (NO)

(73) Szabadalmas:
PHOTOCURE AS, Oslo (NO)

(74) Képviselő:
Kovári György, ADVOPATENT Szabadalmi és Védjegy Iroda, Budapest

(54) Eljárás molekulák in vitro bevezetésére élő sejtek citoszoljába fotoszenzibilizáló vegyület alkalmazásával

KIVONAT

A találmány egyik tárgya eljárás molekulák in vitro bevezetésére élő sejtek citoszoljába fotoszenzibilizáló vegyületek és a fotoszenzibilizáló vegyületek által abszorbeált fény alkalmazásával, amelynek az a lényege, hogy

a) az élő sejtekhez hozzáadják a fotoszenzibilizáló vegyületet és a bejuttatandó molekulá(ka)t, amelyek adott esetben rögzítve lehetnek azonos vagy eltérő hordozómolekulákhoz;
b) ezután ezeket endolitikusan vagy más módon átjuttatják az endoszómákba, lizoszómákba vagy más, intracelluláris membránnal határolt sejtrészlegekbe; majd
c) a sejteket a fotoszenzibilizáló vegyület abszorpciós spektrumának megfelelő hullámhosszúságú fénynek teszik ki változó dózisokban, a kívánt túlélési aránytól függően, így az endoszomális, lizoszomális vagy más, intracelluláris sejtalkotó membránokat szétzúzzák, és a citoszolba bejuttatandó molekulákat a citoszolban kibocsátják, amelynek során a fénnyel aktivált fotoszenzibilizáló vegyület maga nem pusztítja el a sejtek többségét.

Az eljárás során a fotoaktivált fotoszenzibilizáló vegyület nem pusztítja el a sejteket.

A találmány tárgya továbbá egy készítmény is, amely neoplasztikus vagy más celluláris folyamatok in vitro módosítására szolgál meleg vérű állatokban vagy sejttenyészetekben, valamint egy olyan készlet is, amely a találmány szerinti eljárás végrehajtásához van előirányozva. Ugyancsak tárgya a találmánynak fotoszenzibilizáló vegyület alkalmazása is, molekulák élő sejtek citoszoljába in vitro bevezetésére szolgáló készítmény alkalmazása is, amely az alábbi lépésekből áll: az élő sejtekhez hozzáadják a fotoszenzibilizáló vegyületet és a bejuttatandó molekulá(ka)t, amelyek adott esetben rögzítve lehetnek azonos vagy eltérő hordozómolekulákhoz; ezután ezeket endolitikusan vagy más módon átjuttatják az endoszómákba, lizoszómákba vagy más, intracelluláris membránnal határolt sejtrészlegekbe; majd a sejteket a fotoszenzibilizáló vegyület abszorpciós spektrumának megfelelő hullámhosszúságú fénynek teszik ki változó dózisokban a kívánt túlélési aránytól függően, így az endoszomális, lizoszomális vagy más intracelluláris sejtalkotó membránokat szétzúzzák, és a citoszolba bejuttatandó molekulákat a citoszolban kibocsátják, amelynek során a fénnyel aktivált fotoszenzibilizáló vegyület maga nem pusztítja el a sejtek többségét.

HU 222 984 B1

A leírás terjedelme 24 oldal (ezen belül 13 lap ábra)

A találmány tárgya eljárás molekulák élő sejtek citoszoljába történő in vitro bevezetésére fotoszenzibilizáló vegyületek és ez utóbbiak által abszorbeált fény alkalmazásával. A találmány fotoszenzibilizáló vegyület olyan készítmény előállításához való alkalmazására is vonatkozik, amely molekulák élő sejtek citoszoljába történő in vitro bevezetésére szolgál. A találmány tárgya továbbá készítmény neoplasztikus vagy más celluláris folyamatok in vitro módosítására meleg vérű állatokban vagy sejttenyészetekben. Ugyancsak tárgya a találmánynak egy, az eljárás foganatosítására szolgáló készlet is.

A molekulák legnagyobb része nem képes könnyen áthatolni a sejtmembránokon. A molekuláknak az élő sejtek citoszoljába történő bevezetésére szolgáló eljárások jól alkalmazhatók a biológiai folyamatok befolyásolására és tanulmányozására. A napjainkban leggyakrabban alkalmazott módszerek közé tartoznak – egyebek mellett – például a következők: mikroinjektálás; vörösvérsejt-kísértettel (red blood cell ghost; a hemoglobinját elvesztett vörösvérsejttel) mediált fúzió és liposzómafúzió; pinoszómák ozmitikus lízise; töredékfeltöltés; elektroporáció; valamint kalcium-foszfát- és vírusmediált transzfektálás. Ezek az eljárások ugyan alkalmasak a tenyészetben lévő sejtek vizsgálatára, ugyanakkor azonban gyakran nehezen kivitelezhetők, időigényesek, nem elég hatékonyak, vagy jelentős sejtpusztulást idéznek elő. Így az olyan, biológiai és orvosi kutatásokban, illetve terápiás folyamatokban történő felhasználás szempontjából, amelyekben a sejtek megtartják funkcionális jellegüket, a jelenleg használatos módszerek nem tekinthetők optimális megoldásoknak.

Jól ismert, hogy a porfirinek és más fotoszenzibilizáló (fényérzékenyítő) vegyületek citotoxikus hatást váltanak ki a sejteken és szöveteken. Ezek az effektusok azon a tényen alapulnak, hogy a fotoszenzibilizáló vegyületek megvilágítás hatására a sejtek és a sejtstruktúrák membránjait szétbomlasztó szinglett (nascens) oxigént tesznek szabaddá; ha a roncsolás kiterjedt, ez akár a sejt elhalását is eredményezheti. Ezeket a hatásokat már jelenleg is felhasználják a neoplasztikus betegségek számos típusának a kezelésére. Az ilyen jellegű kezelést fotodinamikus terápiának (photodynamic therapy, PDT) nevezik, amelynek során egy fotoszenzibilizáló és tumorlokalizáló festék injektálása után a tumorrégiót fénnyel megvilágítják. A citotoxikus hatást főleg a szinglett oxigén képződése váltja ki. A szinglett oxigén reaktív intermediernek rendkívül rövid (<0,04 μs) az élettartama a sejtekben. Így a fotodinamikus terápia a megvilágítás ideje alatt és csak a szinglett oxigén képződési helyeinek közvetlen közelében fejti ki primer citotoxikus hatását. A szinglett oxigén a proteinekkel (hisztidinnel, triptofánnal, metioninnal, ciszteinnel, tirozinnal), a DNS-sel (guaninnal), a telítetlen zsírsavakkal és a koleszterinnel reakcióba lép, amelynek során az említett anyagok oxidálódnak. A fotodinamikus terápia egyik előnye az, hogy a meg nem világított szövetek nem károsodnak. Számos szabadalmi dokumentum foglalkozik a fotodinamikus terápiának a nemkívánatos sejtpopulációk, például a neoplasztikus sejtek elroncsolására irányuló felhasználásával. Igen sok szabadalmi dokumentum tárgyát képezik fotodinamikus vegyületek. Ezek egy része önmagukban az ilyen jellegű vegyületekre vonatkozik, mások pedig a fotodinamikus vegyületeknek az olyan immunglobulinokkal alkotott konjugátumaival foglalkoznak, amely immunglobulinok a neoplasztikus sejtreceptor-determinánsokat megcélozva fokozzák a komplexek sejtspecifitását. Bizonyos fotokémiai vegyületek, például a hematoporfinszármazékok különleges hajlamot mutatnak a rosszindulatú sejtekben történő koncentrálódásra. A nemkívánatos sejtek elpusztítására szolgáló eljárásokat és vegyületeket ismertetnek – egyebek mellett – például a következő szabadalmi dokumentumokban: 173 319 számú norvégiai szabadalmi leírás, 90 0731, 90 2634, 90 1018, 94 1548, 85 1897, 93 4837, 92 4151 és 89 1491 számú norvégiai szabadalmi bejelentés. Ezek a szabadalmak/szabadalmi bejelentések a jelen bejelentés elsőbbségi napja, vagyis 1994. 08. 08. előtt már nyilvánosságra kerültek.

A PCT/US93/00683 számú nemzetközi bejelentésben, amelynek közzététele a jelen találmányi bejelentés elsőbbségi napja előtt megtörtént, egy olyan hatóanyag-bejuttató rendszert ismertetnek, amely kopolimer hordozókhoz kapcsolva egy rákellenes hatóanyagot és egy fotoaktiválható hatóanyagot tartalmaz. A beadás során a komplex pinocitózis vagy fagocitózis útján belép a sejt belső terébe, majd az endoszómák, valamint a lizoszómák belsejében lokalizálódik. A lizoszómákban az antineoplasztikus vegyület és a polimer közötti kötés elhidrolizál, aminek eredményeként az antineoplasztikus vegyület passzív diffúzióval képes a lizoszómamembránon áthatolva bejutni a citoszolba. Ily módon ennek az eljárásnak a felhasználhatósága erősen korlátozott, mivel csak olyan kis méretű molekulával rendelkező vegyületek bejuttatására alkalmazható, amelyek képesek a lizoszómamembránokon átdiffundálni. Miután elegendő időt hagytak a diffúzióhoz, bekapcsolnak egy, a fotoaktiválható vegyület aktiválásához megfelelő hullámhosszúságú és energiájú fényforrást. A rákellenes hatóanyag és a fotoaktiválható hatóanyag kombinált hatása elroncsolja a sejtet. A fotoaktiválható vegyületek valamennyi ismert felhasználása a sejtstruktúrának a sejt elhalásához vezető kiterjedt elroncsolására irányul. Ez idáig nem ismert olyan eljárás, amely arra irányulna, hogy az endoszóma/lizoszóma membránok lokalizált széttöredezése után a membránon áthatolni nem képes molekulákat lehessen bejuttatni a citoszolba.

A GB 2 209 468 A lajstromszámú brit szabadalmi leírásból fényérzékenyítő szereket tartalmazó liposzómák ismerhetők meg, amelyeket ha fényhatásnak tesznek ki, destabilizálják a lipid-kettősréteget, és ezáltal stimulálják a liposzómák fúzióját és/vagy a liposzómák membránkötött alkotórészeinek a cseréjét. Ebben az esetben tehát liposzómákat alkalmaznak molekulák sejtekbe internalizálásához.

A jelen találmány tárgya eljárás molekuláknak tenyészetben vagy szövetekben lévő élő sejtek citoszoljába történő bejuttatására, amelynek során a sejteket egy fotoaktiválható vegyülettel és a citoszolba bejuttatandó egy- vagy többfajta molekulával kezeljük, ahol a fotoaktiválható vegyület és az egy- vagy többfajta moleku-

la felvételét különféle hordozókkal segíthetjük elő, majd a sejteket alkalmas hullámhosszúságú és energiájú fénnyel megvilágítva az endoszóma-, valamint lizoszómamembránokat elroncsoljuk, és az egy- vagy többfajta molekulát bejuttatjuk a citoszolba anélkül, hogy a sejtek legnagyobb része elvesztené működőképességét. A fotoszenzibilizátor és a citoszolba bejuttatandó egy- vagy többfajta molekula tetszés szerint kapcsolható alkalmas hordozókhoz, melyek lehetnek ugyanazok vagy különbözőek, megkönnyítve az adott molekulák felvételét, melynek során a hordozók a bevitelhez mind a fotoszenzibilizátorhoz, mind a molekulához, vagy csak a fotoszenzibilizátorhoz, vagy csak a molekulához kapcsolódnak.

A kitűzött célt a találmány értelmében olyan, molekulák élő sejtek citoszoljába in vitro bevezetésére szolgáló eljárással oldottuk meg fotoszenzibilizáló vegyületek és a fotoszenzibilizáló vegyületek által abszorbeált fény alkalmazásával, amely eljárásnak az a lényege, hogy

a) az élő sejtekhez hozzáadjuk a fotoszenzibilizáló vegyületet és a bejuttatandó molekulá(ka)t, amely(ek) adott esetben rögzítve lehet(nek) azonos vagy eltérő hordozómolekulákhoz;
b) ezután ezeket endolitikusan vagy más módon átjuttatjuk az endoszómákba, lizoszómákba vagy más, intracelluláris membránnal határolt sejtrészlegekbe; majd
c) a sejteket a fotoszenzibilizáló vegyület abszorpciós spektrumának megfelelő hullámhosszúságú fénynek tesszük ki változó dózisokban a kívánt túlélési aránytól függően, így az endoszomális, lizoszomális vagy más intracelluláris sejtalkotó membránokat szétzúzzuk, és a citoszolba bejuttatandó molekulákat a citoszolban kibocsátjuk, amelynek során a fénnyel aktivált fotoszenzibilizáló vegyület maga nem pusztítja el a sejtek többségét.

Az eljárás egy előnyös foganatosítási módja szerint az említett hordozómolekulákat rögzítjük mind a citoszolban kibocsátandó vegyülethez, mind a fotoszenzibilizáló vegyülethez; vagy legalább egy hordozót rögzítünk a citoszolban kibocsátandó vegyülethez, és egy másik, hasonló vagy eltérő hordozót rögzítünk a fotoszenzibilizáló vegyülethez. Az is előnyös lehet, ha a citoszolban az alábbi molekulák valamelyikét bocsátjuk ki: DNS, oligo(dezoxi)nukleotidok, mRNS, antiszensz DNS, cukrok, fehérjék, peptidek, membránon át nem hatoló gyógyszerek, egyéb, membránon át nem hatoló vegyületek, valamint az említett molekulák kovalensen vagy nem kovalensen kötött kombinációi; célszerűen a citoszolba fehérjéket vagy peptideket bocsátunk ki. Az is célszerű lehet, ha a citoszolban fehérje-szintetikusaktivitást módosító anyagokat bocsátunk ki.

Az eljárás egy másik foganatosítási módjára az jellemző, hogy a citoszolban gelomint, szeporint vagy agrosztint vagy ezek valamely kombinációját bocsátjuk ki. Egy további eljárási ismérvnek megfelelően fotoszenzibilizáló vegyületként a következő vegyületek valamelyikét adjuk az élő sejtekhez: porfirinok, ftalocianinok, purpurinok, klozinok, benzoporfirinok, naftalocianinok, kationos festékek, tetraciklinek és lizoszomatrop gyenge bázisok, valamint származékaik; ebben az esetben előnyös, ha fotoszenzibilizáló vegyületként a szomszédos fenilcsoportokon két szulfonátcsoporttal rendelkező tetrafenil-porfirint, azaz $TPPS_{2a}$-t, vagy négy szulfonátcsoporttal rendelkező *mezo*-tetrafenil-porfint, vagyis $TPPS_4$-et, vagy a szomszédos fenilcsoportokon két szulfonátcsoporttal rendelkező alumínium-ftalocianint, vagyis $AlPcS_{2a}$-t, vagy mindezek bármely kombinációját adjuk az élő sejtekhez. Előnyös lehet továbbá, ha hordozómolekulákként helyre irányuló molekulákat rögzítünk, amelyek megkönnyítik a fotoszenzibilizáló vegyület vagy a citoszolban kibocsátandó molekulák felvételét; valamint ha a túlélő sejtek hányadosát a fény mennyiségének a fotoszenzibilizáló vegyület koncentrációjának figyelembevételével történő megválasztásával szabályozzuk.

A találmány tárgyát képezi egy készítmény (kompozíció) is neoplasztikus vagy más celluláris folyamatok in vitro módosítására meleg vérű állatokban vagy sejttenyészetekben, amelynek az a lényege, hogy tartalmaz egy, a citoszolban kibocsátandó, membránon át nem hatoló vegyületet, és egy fotoszenzibilizáló vegyületet, amely fénnyel történő aktiválás hatására szétzúzza az intracelluláris sejtmembránokat; a nevezett komponensek adott esetben hozzákapcsolhatók azonos vagy különböző hordozómolekulákhoz annak érdekében, hogy megkönnyítsék az átjutást az intracelluláris sejtrészlegekbe, például endoszómákba, lizoszómákba, vagy más intracelluláris részlegekbe. E készítmény egy kiviteli alakjára az jellemző, hogy az említett hordozómolekulák rögzítve vannak mind a citoszolban kibocsátandó, celluláris folyamatokat módosító vegyülethez, mind a fotoszenzibilizáló vegyülethez; vagy legalább egy hordozó van rögzítve a citoszolban kibocsátandó vegyülethez, és egy másik, hasonló vagy eltérő hordozó van rögzítve a fotoszenzibilizáló vegyülethez. Célszerű lehet, ha az említett, a citoszolban kibocsátandó vegyület egy antineoplasztikus vegyület; előnyösen az antineoplasztikus vegyület gelonin.

Egy másik készítményismérvnek megfelelően a citoszolban kibocsátandó vegyület DNS, oligo(dezoxi)nukleotidok, mRNS, antiszensz DNS, cukrok, fehérjék, peptidek, membránon át nem hatoló gyógyszerek, más, membránon át nem hatoló molekulák valamelyike, vagy az említett molekulák valamely kovalensen vagy nem kovalensen összekapcsolt kombinációja. Előnyös lehet, ha a fotoszenzibilizáló vegyületek porfirinok, ftalocianinok, purpurinok, klorinok, benzoporfirinok, naftalocianinok, kationos festékek, tetraciklinek és lizoszomotrop gyenge bázisok, vagy mindezek származékai; ebben az esetben a fotoszenzibilizáló vegyületet tetrafenil-porfinként szulfonátcsoporttal szomszédos fenilcsoportok képezhetik.

Egy másik készítményismérvnek megfelelően a hordozómolekula helyre irányuló molekula, amely megkönnyíti a fotoszenzibilizáló vegyület vagy a citoszolban kibocsátandó molekulák felvételét.

A készítmény egyik további ismérve, hogy rákterápiában alkalmazható.

A készítmény egy további kiviteli alakjára az jellemző, hogy az említett, a citoszolban kibocsátandó vegyület DNS, oligo(dezoxi)nukleotid, mRNS vagy antiszensz

DNS, vagy az említett molekulák kovalensen vagy nem kovalensen kötött kombinációi, génterápiákon való alkalmazáshoz.

Az eljárás foganatosítására szolgáló készletre az jellemző, hogy tartalmazza a fotoszenzibilizáló vegyületeket, a szállítandó molekulákat, és kívánt esetben tartalmaz olyan hordozóvegyületeket, amelyek megkönnyítik ezeknek a molekuláknak a szállítását.

Az ugyancsak a találmány tárgyát képező, molekulák élő sejtek citoszoljába in vitro bevezetésére szolgáló készítmény gyártásához fotoszintetizáló vegyület alkalmazásának az a lényege, hogy a nevezett alkalmazás az alábbi lépésekből áll:

a) az élő sejtekhez hozzáadjuk a fotoszenzibilizáló vegyületet és a bejuttatandó molekulá(ka)t, amelyek adott esetben rögzítve lehetnek azonos vagy eltérő hordozómolekulákhoz;

b) ezután ezeket endolitikusan vagy más módon átjuttatjuk az endoszómákba, lizoszómákba vagy más, intracelluláris membránnal határolt sejtrészlegekbe; majd

c) a sejteket a fotoszenzibilizáló vegyület abszorpciós spektrumának megfelelő hullámhosszúságú fénynek tesszük ki változó dózisokban a kívánt túlélési aránytól függően, így az endoszomális, lizoszomális vagy más intracelluláris sejtalkotó membránokat szétzúzzuk, és a citoszolba bejuttatandó molekulákat a citoszolban kibocsátjuk, amelynek során a fénnyel aktivált fotoszenzibilizáló vegyület maga nem pusztítja el a sejtek többségét.

Célszerű, ha az említett hordozómolekulák, szállítandó molekulák és fotoszenzibilizáló molekulák a 2–9. igénypontok bármelyikében meghatározottak; valamint ha a túlélő sejtek hányadosát a fény mennyiségének a fotoszenzibilizáló vegyület koncentrációjának figyelembevételével történő megválasztásával szabályozzuk. Az alkalmazási találmányunk például génterápiához vagy rák kezelésére alkalmazható.

A találmány szerinti eljárás előnyösen alkalmazható rákkal kapcsolatos állatok kezelésére szolgáló gyógyszer előállításához.

A találmány szerinti eljárással tehát bármely molekula bejuttatható élő sejt citoszoljába, és ezt követően a molekulák hozzáférhetők a citoszolban, és a sejtek megtartják működőképességüket. Ezt úgy érjük el, hogy a sejteket egy célkiválasztó immunglobulinokkal és a citoszolba bejuttatandó molekulákkal összekapcsolt vagy azoktól elkülönített fotoaktiválható vegyülettel és hordozómolekulákkal kezeljük, a sejtek felveszik a fotoaktiválható vegyületet, amely az endoszómákban, liposzómákban vagy más sejtalkotókban lokalizálódik, majd a sejteket a fotoszenzibilizáló vegyület aktiválására alkalmas hullámhosszúságú fénnyel világítjuk meg, amelynek eredményeként csak az endoszóma, lizoszóma és egyéb sejtalkotó membránok roncsolódnak, és a molekulák bejutnak a citoszolba anélkül, hogy a fotoaktiválható vegyület hatására és az endoszóma/lizoszóma tartalom lehetséges hatására a sejtek elveszítenék működőképességüket.

Bizonyított tény, hogy számos hatóanyag, egyebek mellett például a di- és tetraszulfonált alumínium-ftalocianin, a szulfonált tetrafenil-porfinok ($TPPS_n$), a níluskék, a chlorin-e_6 származékok, az uroporfirin I, a filloeritrin, valamint a hematoporfirin és a metilénkék a tenyészetben lévő sejtek endoszómáiban és lizoszómáiban lokalizálódik. A legtöbb esetben ez az endocitikus aktivitás következménye. Megfigyeltük, hogy a sejtek lizoszómáiban fotoszenzibilizátorokat tartalmazó sejtek megvilágítása a lizoszómákat permeábilissé teszi, és így a fotoszenzibilizátorok szabaddá válnak. Bizonyos esetekben, például a $TPPS_{2a}$ és a $TPPS_1$ esetében a fotodinamikus terápia után jelentős enzimaktivitást figyeltünk meg a citoszolban, ami azt jelzi, hogy a lizoszóma tartalma szabaddá válva bejut a citoszolba, mégpedig anélkül, hogy a lizoszóma tartalma elveszítené aktivitását. A fotoszenzibilizáló festékeknek ez a hatása – a találmány szerinti megoldás értelmében – felhasználható az endocitizált molekuláknak az endoszómákból és lizoszómákból történő kiszabadítására.

A molekuláknak a sejtcitoplazmába történő bevezetését úgy valósíthatjuk meg, hogy *először* a sejteket egy olyan fotoszenzibilizáló festékkel és a sejtek citoszoljába bejuttatandó egy vagy több olyan molekulával, valamint adott esetben olyan hordozómolekulákkal és olyan immunglobulinokkal kezeljük, amelyek mindegyike elsősorban az endoszómákban és/vagy a lizoszómákban lokalizálódik. Másodszor a sejteket vagy szöveteket egy fotodinamikus reakció indukálására alkalmas hullámhosszúságú és energiájú fénnyel megvilágítjuk. Ez a fotodinamikus reakció a lizoszóma- és/vagy endoszómamembránok roncsolódását eredményezi, és így a vesiculák tartalma szabaddá válva bejut a citoszolba.

A találmány szerinti megoldás lényegét az 1. ábra mutatja be. Elengedhetetlen feltétel, hogy a fotoszenzibilizátor és a sejtekbe bevezetendő molekula ugyanabban a sejtalkotóban helyezkedjen el. Hangsúlyozni kell azt is, hogy a külsőleg hozzáadott molekulák a lizoszómáktól és az endoszómáktól eltérő intracelluláris sejtalkotókban, például a Golgi-apparátusban és az endoplazmatikus reticulumban akkumulálódhatnak. Ilyen esetekben az ugyanazon sejtalkotókban lokalizálódó fotoszenzibilizáló molekulák fénnyel kombinálva felhasználhatók ugyanazokra a célokra, mint amelyeket a fentiekben említettünk, biztosítva azt, hogy a fénymennyiség és a fotoszenzibilizáló vegyület kombinációja nem károsítja a sejtek működőképességét.

A jelen találmány azon az *in vitro* bizonyításunkon alapul, amelynek értelmében egy fotoszenzibilizátor, például a $TPPS_{2a}$ (a $TPPS_{2a}$ egy olyan tetrafenil-porfin, amely a szomszédos fenilcsoportokon két szulfonátcsoportot tartalmaz) fénnyel kombinálva a sejtek nagyobb részének elpusztítása nélkül képes kiváltani a funkcionálisan intakt lizoszómatartalom szabaddá válását. Ugyanilyen hatás érhető el akkor is, ha más fotoszenzibilizáló vegyületeket alkalmazunk önmagukban, vagy pedig más olyan molekulákkal vagy részecskékkel társítva/kapcsolva, amelyeket a fotoszenzibilizátoroknak az endoszómákhoz/lizoszómákhoz vagy más intracelluláris sejtalkotókhoz történő irányításához vektorokként

használunk. Az ilyen vektorok szövet- vagy sejtspecifikus antitestek vagy más olyan ligandok lehetnek, amelyek a sejtfelülethez kötődnek, és így fokozzák a fotoszenzibilizátornak a receptormediált endocitózis útján történő felvételét. Egy másik vektor például a helyreállított LDL-részecskék alkalmazása lehet. A receptormediált endocitózis ezeket a részecskéket is felveszi. A natív LDL-hez történő előzetes kötéshez képest ily módon növelhető az egy LDL-részecskére eső fotoszenzibilizátor molekulák és az LDL-részecskékhez kapcsolódó kötések száma.

A találmány szerinti megoldás nemcsak *in vitro* alkalmazható, hanem *in situ* kezeléssel vagy *ex vivo* kezelés, majd a kezelt sejtek injektálása útján *in vivo* is felhasználható. Az endoszómákba és lizoszómákba történő felvétel ugyanúgy fokozható, mint ahogyan azt az *in vitro* kezeléssel kapcsolatban ismertettük. Valamennyi szövet mindaddig kezelhető, amíg a célsejtek felveszik a fotoszenzibilizátort, és a fény megfelelően bejuttatható a fotoszenzibilizátorhoz.

A jelen találmány alapját egy fotoszenzibilizátor és a fény együttesen alkotja. A fotoszenzibilizátornak abszorbeálnia kell a fényt, illetve a fénynek ki kell váltania a fotoszenzibilizátornak egy gerjesztett állapotát. Az alkalmazott hullámhossztartomány értéke az adott fotoszenzibilizátortól függ. A megvilágításnak nem kell szükségszerűen monkromatikusnak vagy párhuzamosítottnak (kollimáltnak) lennie. Minden, megfelelő hullámhosszokon emittáló fényforrás felhasználható.

Úgy tűnik, hogy a találmány szerinti fotodinamikus hatás – meglepő módon – semlegesíti a szabaddá váló lizoszómatartalom potenciális citotoxikus hatását. Bebizonyítottuk, hogy az NHIK 3025 sejtek tenyészetében a $TPPS_{2a}$ fotodinamikus hatása alapvetően gátolja a lizoszomális katepszint. Ez a találmány szerinti megoldásnak egy rendkívül váratlan hatása, amely – a molekuláknak az endoszomális/lizoszomális membránok széttörése útján a citoszolba történő bejuttatása után – hozzájárul a sejtek életképességének és működőképességének fenntartásához.

Kísérleti példák és klinikai felhasználás

1. Rákkezelés

Számos fotoszenzibilizátor elsődlegesen a neoplasztikus szövetekben akkumulálódik. A tumorokban történő felhalmozódásnak a környező szövetekhez viszonyított szelektivitása két-háromszoros, de ez a szorzó bizonyos esetekben, például az agyszövetekben nagyobb, például harmincszoros is lehet. A találmány szerinti megoldás alkalmazásával bejuttathatók a citoszolba az olyan, a rák kezelésének szempontjából klinikai jelentőségű molekulák is, amelyeket egyébként a citoszol csak igen gyengén vagy egyáltalán nem vesz fel. Az ilyen típusú molekulák egyik példája az alábbiakban részletezett gelonin. Ugyanakkor azonban számos más molekula is felhasználható, akár önmagában, akár pedig más molekulákhoz (például antitestekhez, transzferrinhez, fotoszenzibilizátorhoz, helyreállított LDL-részecskéken lévő apoB-hez) kapcsolva. Az ilyen kombinációs kezelés előnye az, hogy 1. a tumorszövetek mélyebb rétegeiben fokozott citotoxikus hatás lép fel, mivel a lizoszómák és endoszómák széttöredezéséhez a fény kisebb és szubtoxikus dózisai is elegendőek; 2. nagyobb a toxin specifitása, mivel a fotodinamikus terápia csak a tumor helyének területét érinti.

2. Génterápia

A génterápia, azaz géneknek a beteg sejtekbe történő terápiás célú bevitele, ígéretes módszer számos genetikai rendellenesség, például rák, cisztikus fibrosis, cardiovascularis betegségek és nagyszámú egyéb betegség kezelésére. Jelenleg a legnagyobb probléma a transzfekció, amelynek *in vivo* kell megtörténnie, illetve bizonyos esetekben végrehajtható *ex vivo* is. Napjainkban a leggyakrabban alkalmazott vektorok, azaz a DNS-molekuláknak a sejtekbe történő bejutását elősegítő struktúrák, különböző típusú vírusok, különösen retro- és adenovírusok. Ezeknek a módszereknek a hátrányai közé tartozik például a vektor gyenge stabilitása, a korlátozott specifitás, a gyenge eredményesség, valamint az, hogy vírus-DNS-t kell humán sejtekbe bejuttatni.

Az endoszómák és/vagy litoszómák fotokémiai úton indukált széttöredezésének segítségével a DNS, akár antiszensz DNS-ként, akár teljes génekként, bevezethető a sejtekbe. A kezelés *in vivo* végrehajtható.

3. Kísérleti felhasználás

A találmány szerinti megoldás felhasználható rendkívül sokféle molekulának a tenyészetben lévő sejtekbe történő bevezetésére; ilyenek például a gének, az antitestek, a manipulált proteinek és az olyan vegyületek, amelyek egyébként a plazmamembránon általában nem képesek áthatolni.

A találmány szerinti megoldás illusztrálására, illetve részletesebb bemutatásához a mellékelt ábrákat használjuk fel, amelyeket röviden az alábbiakban ismertetünk.

1. ábra: Az ábra azt mutatja be, hogy a találmány szerinti megoldás alkalmazásával hogyan juttathatók be különféle molekulák a celluláris citoszolba. Az I fázisban a fotoszenzibilizátor (S) és a kiválasztott molekulák (M) sejtek általi endocitózisa játszódik le (az ábrán az endocitikus folyamatot iniciáló plazmamembrán invaginációt látható). A II fázisban mindkét anyag ugyanabba a vesiculába záródik. Amikor a vesiculát megvilágítjuk, a vesicula membránja széttöredezik, és a vesicula tartalma szabaddá válik.

2. ábra: Az ábra NHIK 3025 sejtekben a geloninnal, $TPPS_{2a}$ jelenlétében vagy $TPPS_{2a}$ nélkül végzett kezelés és 50 másodperces megvilágítás utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése a következő: ○, $TPPS_{2a}$+fény; ●, – $TPPS_{2a}$–fény; ▽, + $TPPS_{2a}$–fény; ▼, – $TPPS_{2a}$+fény. A sejteket 3,2 μg/ml $TPPS_{2a}$-val és a megadott koncentrációjú geloninnal egy éjszakán keresztül kezeltük. Valamennyi esetben ugyanolyan fénymennyiséget alkalmaztunk. A proteinszintézist úgy határoz-

tuk meg, hogy 24 órával a megvilágítás után mértük a proteinekbe beépült [^{3}H]leucin mennyiségét.

3. ábra: Az ábra a $TPPS_{2a}$-val és csak fénnyel (○), illetve 0,2 μg/ml geloninnal kombinációban (▽) vagy a 2. ábránál ismertetetteknek megfelelően 2,0 μg/ml geloninnal kezelt sejtek esetén nyert dózis-válasz görbéket mutatja be.

4. ábra: Az ábra NHIK 3025 sejtekben a 3,2 μg/ml $TPPS_{2a}$-val és fénnyel, 0,2 μg/ml gelonin jelenlétében vagy gelonin nélkül végzett kezelés utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése a következő: ●, $TPPS_{2a}$–gelonin; ○, $TPPS_{2a}$+gelonin. A sejteket gelonin jelenlétében vagy gelonin nélkül egy éjszakán keresztül reagáltattuk a $TPPS_{2a}$-val, és a jelzett fénymennyiségeket alkalmaztuk. A proteinszintézist a proteinekbe beépült [^{3}H]leucin mennyiségének mérésével határoztuk meg.

5. ábra: Az ábra V79 sejtekben a 25 μg/ml $AlPcS_2$-vel és fénnyel, 1 μg/ml gelonin jelenlétében vagy gelonin nélkül végzett kezelés utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése a következő: ●, fotoszenzibilizátor+toxin; ○, fotoszenzibilizátor.

6. ábra: Az ábra H146 sejtekben a 0,3 μg/ml $TPPS_{2a}$-val és fénnyel, 1 μg/ml gelonin jelenlétében vagy gelonin nélkül végzett kezelés utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése azonos az 5. ábránál megadottakkal.

7. ábra: Az ábra V79 sejtekben az 1 μg/ml $TPPS_{2a}$-val és fénnyel, 1 μg/ml gelonin jelenlétében vagy gelonin nélkül végzett kezelés utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése azonos az 5. ábránál megadottakkal.

8. ábra: Az ábra NHIK 3025 sejtekben a 3,2 μg/ml $TPPS_{2a}$-val és fénnyel, 1 μg/ml agrosztin jelenlétében vagy agrosztin nélkül végzett kezelés utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése azonos az 5. ábránál megadottakkal.

9. ábra: Az ábra NHIK 3025 sejtekben a 3,2 μg/ml $TPPS_{2a}$-val és fénnyel, 1 μg/ml saporin jelenlétében vagy saporin nélkül végzett kezelés utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése azonos az 5. ábránál megadottakkal.

10. ábra: Az ábra NHIK 3025 sejtekben a 0,25 μg/ml 3-THPP-vel és fénnyel, 1 μg/ml gelonin jelenlétében vagy gelonin nélkül végzett kezelés utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése azonos az 5. ábránál megadottakkal.

11. ábra: Az ábra COS–7 sejtekben a 3 μg/ml $TPPS_{2a}$-val és fénnyel, 1 μg/ml gelonin jelenlétében vagy gelonin nélkül végzett kezelés utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése azonos az 5. ábránál megadottakkal.

12. ábra: Az ábra NHIK 3025 sejtekben a geloninnal, $TPPS_4$ jelenlétében vagy $TPPS_4$ nélkül végzett kezelés és 50 másodperces megvilágítás utáni proteinszintézist mutatja be. A szimbólumok jelentése a következő: ■, $TPPS_4$+fény; ▼, – $TPPS_4$–fény; ◊, + $RPPS_4$–fény. A sejteket 75 μg/ml $TPPS_4$-gyel és a megadott koncentrációjú geloninnal egy éjszakán keresztül kezeltük. Valamennyi esetben ugyanolyan fénymennyiséget alkalmaztunk. A proteinszintézist úgy határoztuk meg, hogy 24 órával a megvilágítás után mértük a proteinekbe beépült [^{3}H]leucin mennyiségét.

13. ábra: Az ábra OHS-sejtekben mutatja be a proteinszintézist a következő kezelés után: 18 óra $TPPS_{2a}$-val, majd 4 óra $TPPS_{2a}$ nélkül és 3 μg/ml gelonin jelenlétében vagy gelonin nélkül a megvilágítás előtt. A négyórás időtartam alatt a lizoszóma proteindegradáció megakadályozása érdekében a sejteket 50 μM chloroquine-ban vagy 10 mM ammónium-kloridban inkubáltuk.

A következőkben az alábbi, nem korlátozó jellegű példákon keresztül mutatjuk be részletesebben a találmány szerinti megoldást.

1. példa

Ez a példa azt kívánja bemutatni, hogy a fotodinamikus kezelés hatására felszabadul és a citoszolba bejut egy, a proteinszintézist gátló vegyület.

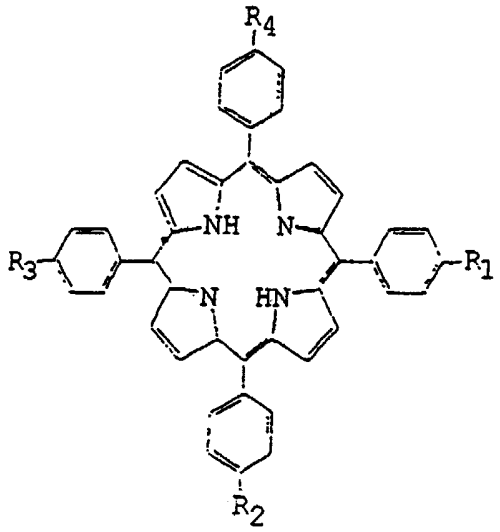
Számos növényi toxin oly módon öli el a sejteket, hogy a toxin belép a citoszolba, és enzimatikusan inaktiválja a riboszomális funkciót. A legtöbb citotoxikus növényi protein két, diszulfidhidakkal összekapcsolt, A és B polipeptidláncból áll. A B lánc funkciója az, hogy a proteint hozzákösse a sejtek felületéhez, míg az A lánc hordozza az enzimatikus aktivitást. A gelonin egy olyan növényi toxin, amely sejtmentes rendszerekben hatásosan gátolja a proteinszintézist, viszont intakt sejtekre csak gyenge hatást fejt ki, illetve az intakt sejtekkel szemben hatástalan. Az intakt sejtek esetén tapasztalt gyenge citotoxikus hatás feltehetően annak a következménye, hogy a geloninban nincsen B lánc.

NHIK 3025 sejteket (I) általános képletű $TPPS_{2a}$-val és geloninnal, együttesen vagy egymástól elkülönítve inkubáltunk 18 órán keresztül, majd ezt követően a sejteket egy órán keresztül $TPPS_{2a}$-ban és geloninmentes médiumban inkubáltuk, mielőtt a sejteket megvilágítottuk.

A nevezett sejteket a Norvegian Radium Hospitalban fejlesztették ki, és ott, a Dept. 1 of Biophisicsnél, név szerint Dr. Kristian Bergnél (Montebello, N–U310, Oslo, Norvégia) rendelkezésre állnak.

A proteinszintézist a megvilágítás után 24 órával mértük. A fotodinamikus kezelés, amely önmagában a sejtek

10–20%-át elpusztítja, a proteinszintézist 30–40%-kal csökkentette (2. ábra). Amint az a 2. ábrán látható, a gelonin fény jelenlétében vagy fény nélkül bizonyos mértékig önmagában is gátolja a proteinszintézist. Viszont a PDT és gelonin kombináció IC_{50}=0,2 μg/ml geloninkoncentráció mellett teljes mértékben gátolja a proteinszintézist. Ez azt jelzi, hogy a fotodinamikus kezelés nélkül a gelonin lényegében nem jut be a citoszolba. Ez a példa azt jelzi, hogy a $TPPS_{2a}$ és a fény alkalmas funkcionálisan intakt makromolekuláknak a sejtcitoszolba történő bejuttatására.



(I)

$TPPS_4$: $R_{1-4}=SO_3^-$;
$TPPS_{2c}$: $R_{1,3}=SO_3^-$; $R_{2,4}=H$;
$TPPS_{2a}$: $R_{1,2}=SO_3^-$; $R_{3,4}=H$;
$TPPS_1$: $R_1=SO_3^-$; $R_{2-4}=H$.

2. példa

Ez a példa azt mutatja be, hogy hogyan használhatjuk fel a festék által abszorbeált hullámhosszúságú fény mennyiségét a túlélő sejtfrakció méretének meghatározásához.

NHIK 3025 sejteket az 1. példában ismertetetteknek megfelelően $TPPS_{2a}$-val és geloninnal inkubáltunk.

A sejtek klonogén túlélését a megvilágítás után 24 órával mértük. Amint az a 3. ábrán látható, a $TPPS_{2a}$-val és a fénnyel gyakorlatilag az összes sejtet elpusztítottuk, amikor növeltük a megvilágítást. Ez összhangban van a nemkívánatos sejtek PDT-vel történő elpusztítására vonatkozó korábbi megfigyelésekkel. Ha a rendszerhez gelonint adunk, a túlélési arány csökken, ami annak a következménye, hogy a gelonin gátlóhatást fejt ki a proteinszintézisre, jelezve azt, hogy a gelonin szabaddá válva bejut a citoszolba. A hozzáadott gelonin koncentrációjának növelésével több gelonin jut be a citoszolba, amit a sejtek fokozott fényinaktivációs érzékenysége jelez.

A találmány szerinti megoldás ennek megfelelően lehetőséget kínál minden egyes esetben egy adott túlélési szint beállítására, valamint a fotoszenzibilizáló vegyület és a megvilágítás olyan kombinációjának a megválasztására, amely a sejtek kívánt frakcióját életben tartja.

3. példa

Ez a példa azt mutatja be, hogy a fénymennyiségek változtatásával hogyan szabályozható a citoszolban a szabaddá vált geloninnak a relatív proteinszintézis által meghatározott mennyisége.

NHIK 3025 sejteket az 1. példában ismertetetteknek megfelelően $TPPS_{2a}$-val és geloninnal inkubáltunk.

A 4. ábrán látható, hogy az 50 másodperces toxikus dózis feletti fénymennyiségek növelték a citoszolban a relatív proteinszintézissel meghatározott geloninfrakciót.

A 4–11. példa különböző sejtvonalakon, valamint különböző fotoszenzibilizátorokkal és toxinokkal mutatja be a találmány szerinti eljárás alkalmazását. A fotoszenzibilizátorok intracelluláris lokációja lizoszomális ($TPPS_4$, $TPPS_{2a}$, $AlPcS_{2a}$) és extralizoszomális (3.HTPP). A leírásban alkalmazott rövidítések jelentései a következők: $AlPcS_{2a}$=a szomszédos fenilcsoportokon két szulfonátcsoporttal rendelkező alumínium-ftalocianin; $TPPS_4$=négy szulfonátcsoporttal rendelkező *mezo*-tetrafenil-porfin; $TPPS_{2a}$=a szomszédos fenilcsoportokon két szulfonátcsoporttal rendelkező *mezo*-tetrafenil-porfin; 3-THPP=tetra(hidroxi-fenil)-porfin. A következő sejtvonalakat alkalmazzuk: NHIK 3025=humán cervixből *in situ* előállított karcinómasejtek; V79 (ATCC CCL93)=kínaihörcsög-tüdőfibroblasztok; COS–7 (ATCC CRL–1651)=SV40-transzformált afrikai kabócamajom-vesesejtek (CV1 emberszabású majomszerű sejtek); OHS=humán osteosarcomasejtek; és H146 (ATCC HTB–173)=kis sejtes tüdőráksejtek. Valamennyi kísérletet az 1. példában ismertetetteknek megfelelően hajtottuk végre. Az OHS-t a Norvegian Radium Hospitalban fejlesztették ki, és azok ott bárki számára rendelkezésre állnak, a Dept. of Biophisicsnél dr. Kristian Bergnél (Montebello, NO31U Oslo, Norvégia).

4. példa

Ez a példa az $AlPcS_{2a}$ fotoszenzibilizátor V79 sejtekben, toxinként geloninnal és gelonin nélkül történő alkalmazására vonatkozik (5. ábra). Egy specifikus fénymennyiség (besugárzási idő) megválasztásával azt igazoljuk, hogy toxin nélkül csak nagyon kis sejtkárosodás alakul ki, amit a proteinszintézisben tapasztalt csekély mértékű csökkenés bizonyít, ugyanakkor geloninnal a proteinszintézis rendkívül nagy mértékben csökken. Ez azt mutatja, hogy a geloninmolekuláknak a sejtekbe a lizoszómákon keresztül történő bejutása még úgy sem okozza a sejtek lényeges károsodását, hogy az $AlPcS_{2a}$ intracelluláris lokalizációja lizoszomális [Moan, J., Berg, K., Anholt, H., and Madslien, K., „Sulfonated aluminium phtalocyanines as sensitisers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells.", Int. J. Cancer, *58*, 865–870 (1994)].

5. példa

Ez a példa azt mutatja be, hogy a gelanin toxinnak a H146 sejtekbe történő transzportja nem befolyásolja

hátrányosan a sejtek életképességét (6. ábra). Ismert, hogy a $TPPS_{2a}$ a sejtben lizoszomálisan lokalizált [Berg., K., Western, A., Bommer, J., and Moan, J., „Intracellular localisation of sulfonated meso-tetraphenylporphines in a human carcinoma cell line.", Photochem. Photobiol., *52,* 481–487 (1990); Berg, K., Madslien, K., Bommer, J. C., Oftebro, R., Winkelman, J. C., and Moan, J., „Light induced relocalization os sulfonated meso-tetraphenylporphines in NHIK 3025 cells and effects os dose fractionation.", Photochem. Photobiol., *53,* 203–210 (1991); Berg, K. and Moan, J., „Lysosomes as photochemical targets.", Int. J. Cancer, *59,* 814–822 (1994)].

6. példa

A példa a találmány szerinti eljárás V79 sejtekben, $TPPS_{2a}$ mint fotoszenzibilizátor alkalmazásával történő alkalmazását mutatja be (7. ábra).

7. példa

Ebben a példában az agrosztin toxint $TPPS_{2a}$ fotoszenzibilizátor alkalmazásával NHIK 3025 sejtekbe transzportáljuk (8. ábra).

8. példa

Ebben a példában a saporin toxint $TPPS_{2a}$ fotoszenzibilizátor alkalmazásával NHIK 3025 sejtekbe transzportáljuk (9. ábra).

9. példa

Összehasonlító példa. Ha egy olyan fotoszenzibilizátort (3-THPP) alkalmazunk, amely nem jut be az encocitikus vesiculumokba (azaz az endoszómákba és lizoszómákba) [Peng, Q., Danielsen, H. E., and Moan, J., „Potent photosenzitizers for photodynamic therapy of cancer: Applications of confocal laser scanning microscopy for fluorescence detection of photosensitizing fluorophores in neoplactic cells and tissues." Proceedings of Microscopy, Holography, and Interferometry in Biomedicine, SPIE, Vol. 2083:71–82 (1994)], a 3-HTPP-nek a proteinszintézisre gyakorolt hatásában nincs észrevehető különbség abból a szempontból, hogy a folyamat gelonin jelenlétében vagy pedig gelonin nélkül játszódik le (10. ábra). Tehát a gelonin nem jut be a sejtek citoszoljába.

10. példa

Ebben a példában a gelonint $TPPS_{2a}$ fotoszenzibilizátor alkalmazásával COS–7 sejtekbe transzportáljuk a találmány szerinti megoldásnak megfelelően (11. ábra).

11. példa

Ebben a példában a gelonint $TPPS_{2a}$ fotoszenzibilizátor alkalmazásával OHS-sejtekbe transzportáljuk a találmány szerinti megoldásnak megfelelően (13. ábra). Ebben a sejtvonalban jelentős proteindegradáció történik a lizoszómákban; ezt a proteindegradációt a jelen példában úgy gátoljuk, hogy a sejteket 4 órán keresztül 50 μM chloquine-ban vagy 10 mM ammónium-kloridban inkubáljuk.

12. példa

Az 1. példához hasonlóan, ebben a példában azt mutatjuk be, hogy a geloninkoncentráció függvényében miként jut be a gelonin az NHIK 3025 sejtekbe, amikor a sejteket $TPPS_4$-gyel és a gelonin különböző koncentrációival inkubáltuk, majd megvilágítottuk (12. ábra). Amikor a sejteket csak geloninnal inkubáltuk, majd megvilágítottuk, vagy pedig $TPPS_4$-gyel és geloninnal inkubáltuk, de megvilágítást nem alkalmaztunk, a gelonin nem jutott be a sejtekbe.

A példák azt igazolják, hogy különféle molekulák sokféle sejt sejtcitoszoljába bejuttathatók különféle fotoszenzibilizátorok és fénymennyiségek alkalmazásával. A sejteket el nem ölő fotoszenzibilizátorok és fénymennyiségek alkalmazása után az exogén molekulák mindaddig bejuttathatók a sejtcitoszolba, amíg a bevezetendő molekulák és a fotoszenzibilizátorok ugyanazokba a sejtalkotókba transzportálódnak. A biológiai komponensekre gyakorolt fotokémiai hatást az adott összetevőben lévő fotoszenzibilizátor mennyisége, az alkalmazott fénymennyiség és a fényforrás spektrális tulajdonságai határozzák meg. A tenyészetben lévő sejtekre gyakorolt fotokémiai hatást legjobban úgy értékelhetjük, hogy a kezelés után 24 órával vagy még hosszabb idő elteltével a sejtek túlélését mérjük. Huszonnégy órával a kezelés után a sejtpusztulásra gyakorolt hatás és a proteinszintézisre gyakorolt hatás között szoros összefüggés áll fenn.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás molekulák in vitro bevezetésére élő sejtek citoszoljába fotoszenzibilizáló vegyületek és a fotoszenzibilizáló vegyületek által abszorbeált fény alkalmazásával, *azzal jellemezve,* hogy

a) az élő sejtekhez hozzáadjuk a fotoszenzibilizáló vegyületet és a bejuttatandó molekulá(ka)t, amely(ek) adott esetben rögzítve lehet(nek) azonos vagy eltérő hordozómolekulákhoz;

b) ezután ezeket endolitikusan vagy más módon átjuttatjuk az endoszómákba, lizoszómákba vagy más, intracelluláris membránnal határolt sejtrészlegekbe; majd

c) a sejteket a fotoszenzibilizáló vegyület abszorpciós spektrumának megfelelő hullámhosszúságú fénynek tesszük ki változó dózisokban a kívánt túlélési aránytól függően, így az endoszomális, lizoszomális vagy más intracelluláris sejtalkotó membránokat szétzúzzuk, és a citoszolba bejuttatandó molekulákat a citoszolban kibocsátjuk, amelynek során a fénnyel aktivált fotoszenzibilizáló vegyület maga nem pusztítja el a sejtek többségét.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett hordozómolekulákat rögzítjük mind a citoszolban kibocsátandó vegyülethez, mind a fotoszenzibilizáló vegyülethez; vagy legalább egy hordozót rögzítünk a citoszolban kibocsátandó vegyülethez, és egy másik, hasonló vagy eltérő hordozót rögzítünk a fotoszenzibilizáló vegyülethez.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a citoszolban az alábbi molekulák valamelyikét bocsátjuk ki: DNS, oligo(dezoxi)nukleotidok, mRNS, antiszensz DNS, cukrok, fehérjék, peptidek, membránon át nem hatoló gyógyszerek, egyéb, membránon át nem hatoló vegyületek, valamint az említett molekulák kovalensen vagy nem kovalensen kötött kombinációi.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a citoszolba fehérjéket vagy peptideket bocsátunk ki.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a citoszolban fehérje-szintetikusaktivitást módosító anyagokat bocsátunk ki.

6. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a citoszolban gelonint, szeporint vagy agrosztint, vagy ezek valamely kombinációját bocsátjuk ki.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy fotoszenzibilizáló vegyületként a következő vegyületek valamelyikét adjuk az élő sejtekhez: porfirinok, ftalocianinok, purpurinok, klozinok, benzoporfirinok, naftalocianinok, kationos festékek, tetraciklinek és lizoszomatrop gyenge bázisok, valamint származékaik.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy fotoszenzibilizáló vegyületként a szomszédos fenilcsoportokon két szulfonátcsoporttal rendelkező tetrafenil-porfirint, azaz $TPPS_{2a}$-t, vagy négy szulfonátcsoporttal rendelkező *mezo*-tetrafenil-porfint, vagyis $TPPS_4$-et, vagy a szomszédos fenilcsoportokon két szulfonátcsoporttal rendelkező alumínium-ftalocianint, vagyis $AlPcS_{2a}$-t, vagy mindezek bármely kombinációját adjuk az élő sejtekhez.

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy hordozómolekulákként helyre irányuló molekulákat rögzítünk, amelyek megkönnyítik a fotoszenzibilizáló vegyület vagy a citoszolban kibocsátandó molekulák felvételét.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a túlélő sejtek hányadosát a fény mennyiségének a fotoszenzibilizáló vegyület koncentrációjának figyelembevételével történő megválasztásával szabályozzuk.

11. Készítmény neoplasztikus vagy más celluláris folyamatok in vitro módosítására meleg vérű állatokban vagy sejttenyészetekben, *azzal jellemezve,* hogy tartalmaz egy, a citoszolban kibocsátandó, membránon át nem hatoló vegyületet, és egy fotoszenzibilizáló vegyületet, amely fénnyel történő aktiválás hatására szétzúzza az intracelluláris sejtmembránokat; a nevezett komponensek adott esetben hozzákapcsolhatók azonos vagy különböző hordozómolekulákhoz annak érdekében, hogy megkönnyítsék az átjutást az intracelluláris sejtrészlegekbe, például endoszómákba, lizoszómákba vagy más intracelluláris részlegekbe.

12. A 11. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az említett hordozómolekulák rögzítve vannak mind a citoszolban kibocsátandó, celluláris folyamatokat módosító vegyülethez, mind a fotoszenzibilizáló vegyülethez; vagy legalább egy hordozó van rögzítve a citoszolban kibocsátandó vegyülethez, és egy másik, hasonló vagy eltérő hordozó van rögzítve a fotoszenzibilizáló vegyülethez.

13. A 11. vagy 12. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az említett, a citoszolban kibocsátandó vegyület egy antineoplasztikus vegyület.

14. A 13. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az antineoplasztikus vegyület gelonin.

15. A 11. vagy 12. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a citoszolban kibocsátandó vegyület DNS, oligo(dezoxi)nukleotidok, mRNS, antiszensz DNS, cukrok, fehérjék, peptidek, membránon át nem hatoló gyógyszerek, más, membránon át nem hatoló molekulák valamelyike, vagy az említett molekulák valamely kovalensen vagy nem kovalensen összekapcsolt kombinációja.

16. A 11–15. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a fotoszenzibilizáló vegyületek porfirinok, ftalocianinok, purpurinok, klorinok, benzoporfirinok, naftalocianinok, kationos festékek, tetraciklinek és lizoszomatrop gyenge bázisok, vagy mindezek származékai.

17. A 16. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a fotoszenzibilizáló vegyületet tetrafenil-porfinként szulfonátcsoporttal szomszédos fenilcsoportok képezik.

18. A 11–17. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a hordozómolekula helyre irányuló molekula, amely megkönnyíti a fotoszenzibilizáló vegyület vagy a citoszolban kibocsátandó molekulák felvételét.

19. A 11–18. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy rákterápiában alkalmazható.

20. A 11., 12. vagy 16–18. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az említett, a citoszolban kibocsátandó vegyület DNS, oligo(dezoxi)nukleotid, mRNS vagy antiszensz DNS, vagy az említett molekulák kovalensen vagy nem kovalensen kötött kombinációi, génterápiákon való alkalmazáshoz.

21. Készlet az 1–9. igénypont szerinti eljárás kivitelezésére, *azzal jellemezve,* hogy tartalmazza a fotoszenzibilizáló vegyületeket, a szállítandó molekulákat, és kívánt esetben tartalmaz olyan hordozóvegyületeket, amelyek megkönnyítik ezeknek a molekuláknak a szállítását.

22. Fotoszenzibilizáló vegyület alkalmazása molekulák élő sejtek citoszoljába in vitro bevezetésére szolgáló készítmény előállítására, *azzal jellemezve,* hogy a nevezett alkalmazás az alábbi lépésekből áll:

a) az élő sejtekhez hozzáadjuk a fotoszenzibilizáló vegyületet és a bejuttatandó molekulá(ka)t, amelyek adott esetben rögzítve lehetnek azonos vagy eltérő hordozómolekulákhoz;

b) ezután ezeket endolitikusan vagy más módon átjuttatjuk az endoszómákba, lizoszómákba vagy más, intracelluláris membránnal határolt sejtrészlegekbe; majd

c) a sejteket a fotoszenzibilizáló vegyület abszorpciós spektrumának megfelelő hullámhosszúságú fénynek tesszük ki változó dózisokban a kívánt túl-

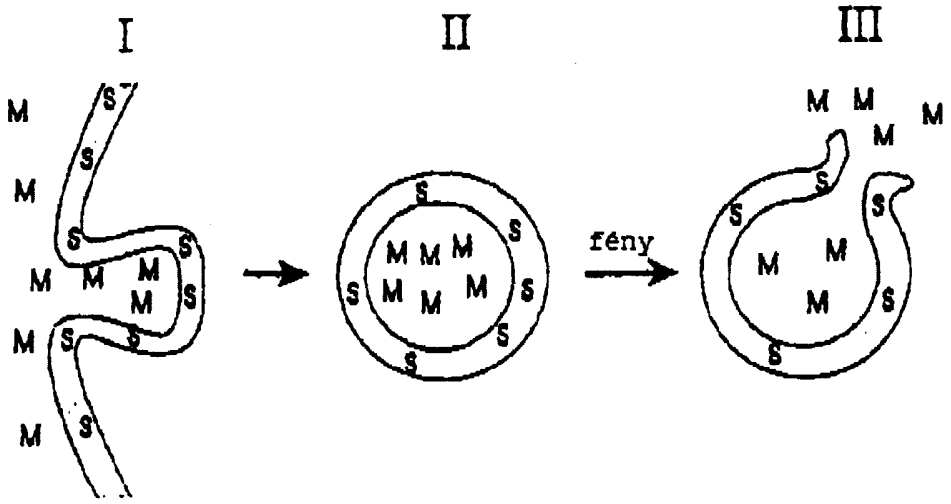
élési aránytól függően, így az endoszomális, lizoszomális vagy más intracelluláris sejtalkotó membránokat szétzúzzuk, és a citoszolba bejuttatandó molekulákat a citoszolban kibocsátjuk, amelynek során a fénnyel aktivált fotoszenzibilizáló vegyület maga nem pusztítja el a sejtek többségét.

23. A 22. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve,* hogy az említett hordozómolekulák, szállítandó molekulák és fotoszenzibilizáló molekulák a 2–9. igénypontok bármelyikében meghatározottak.

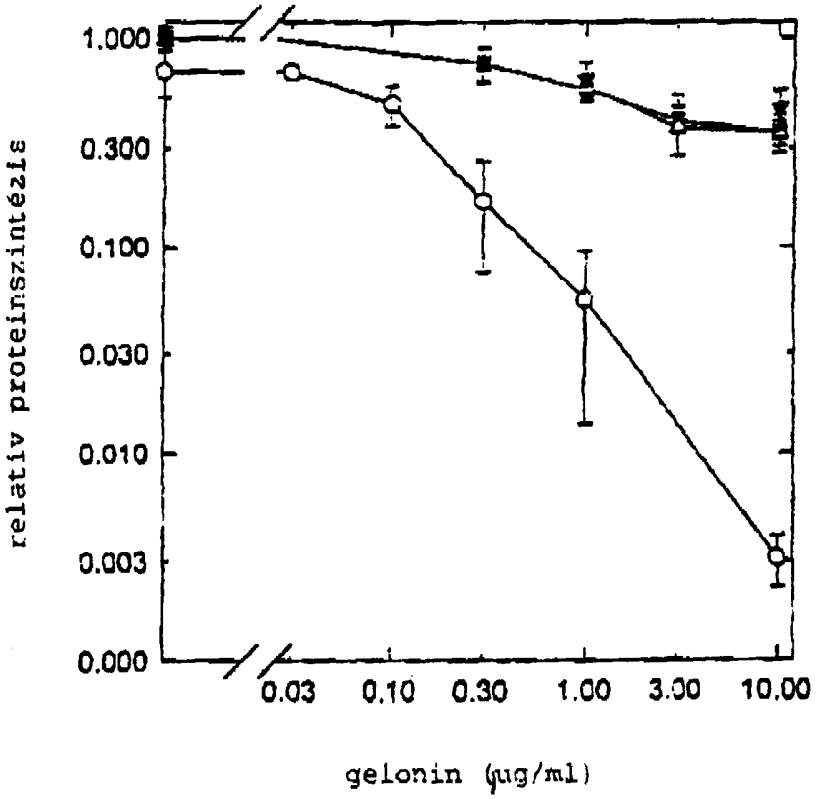
24. A 22. vagy 23. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve,* hogy a túlélő sejtek hányadosát a fény mennyiségének a fotoszenzibilizáló vegyület koncentrációjának figyelembevételével történő megválasztásával szabályozzuk.

25. A 22–24. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás génterápiához vagy rák kezeléséhez.

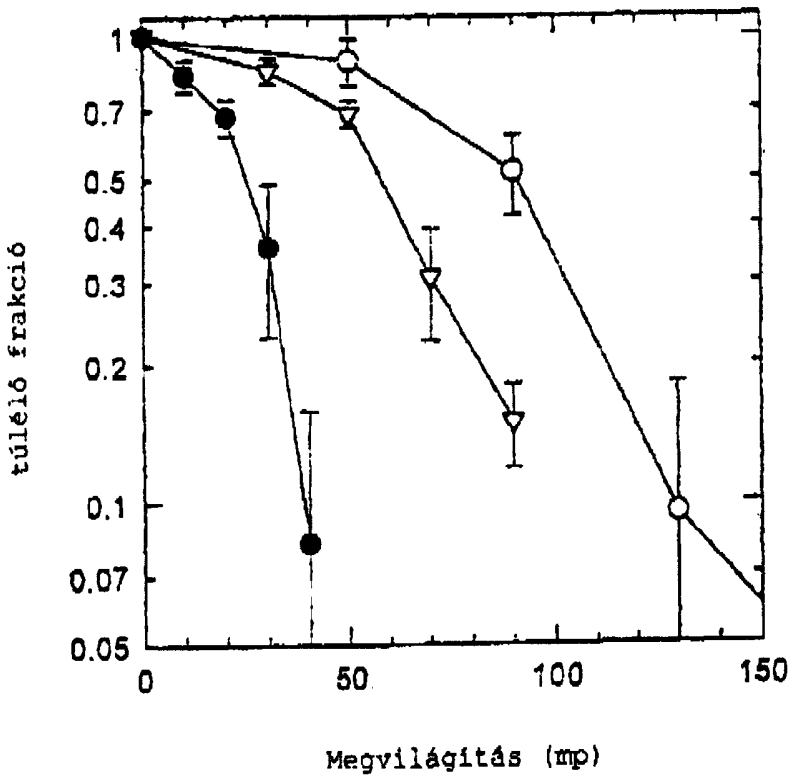
26. Az 1. igénypont szerinti eljárás alkalmazása rákkal kapcsolatos állapotok kezelésére (alkalmas gyógyszer előállítására).



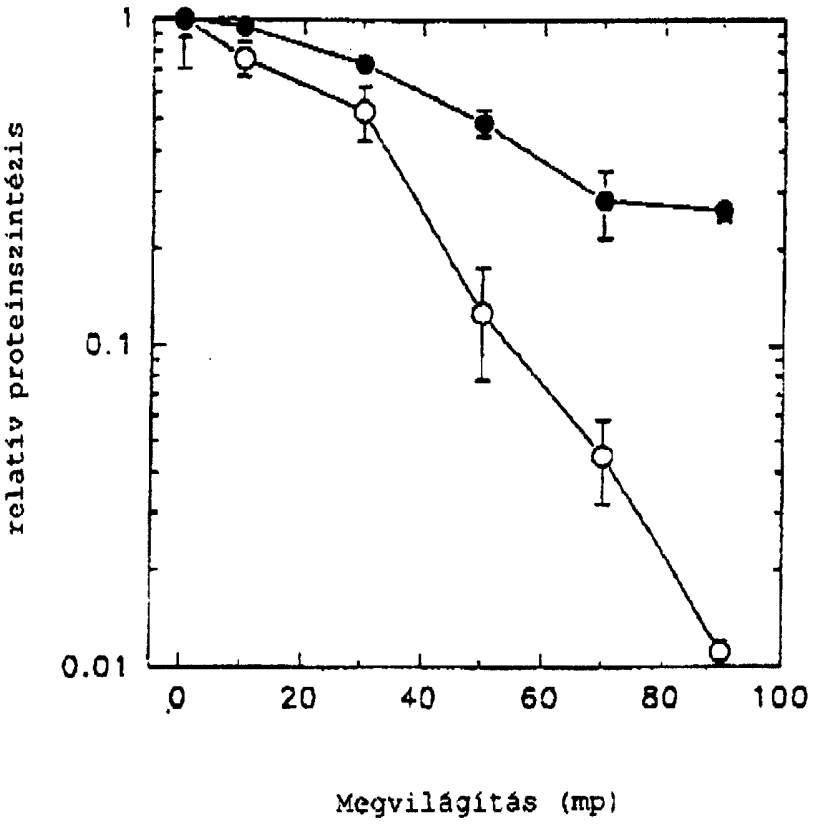
1. ábra


relatív proteinszintézis
1.000
0.300
0.100
0.030
0.010
0.003
0.000
0.03
0.10
0.30
1.00
3.00
10.00
gelonin (μg/ml)

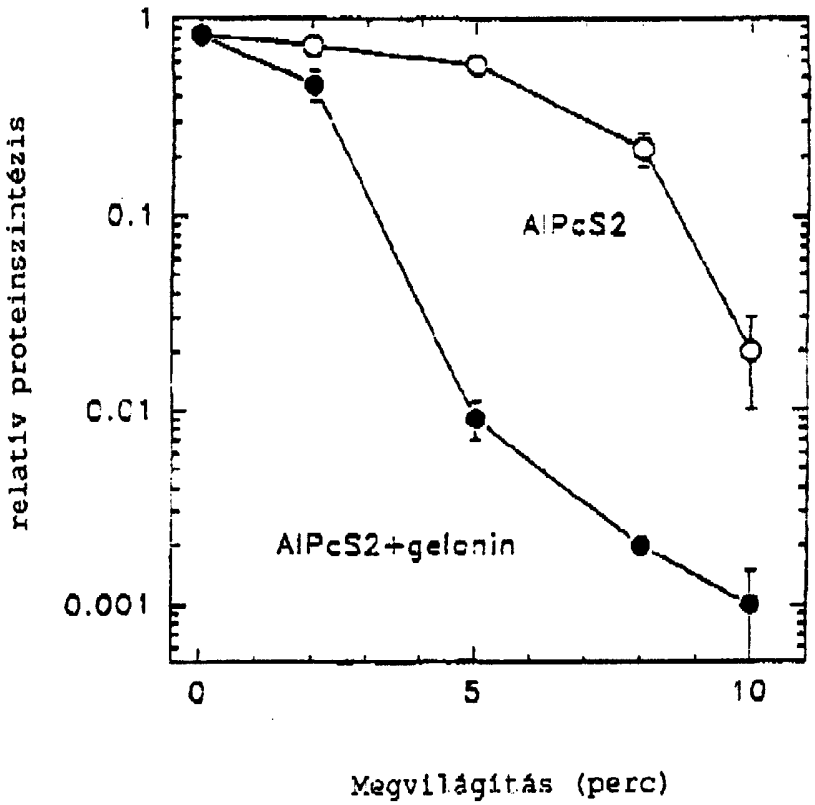
2. ábra


1
0.7
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.07
0.05
túlélő frakció
0
50
100
150
Megvilágítás (mp)

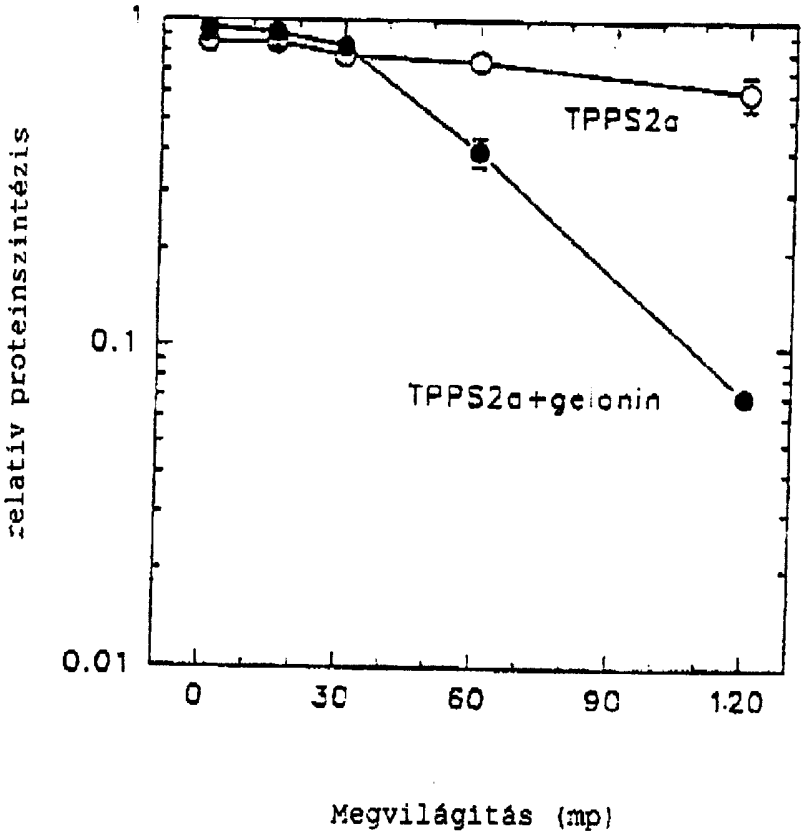
3. ábra


relatív proteinszintézis
1
0.1
0.01
0
20
40
60
80
100
Megvilágítás (mp)

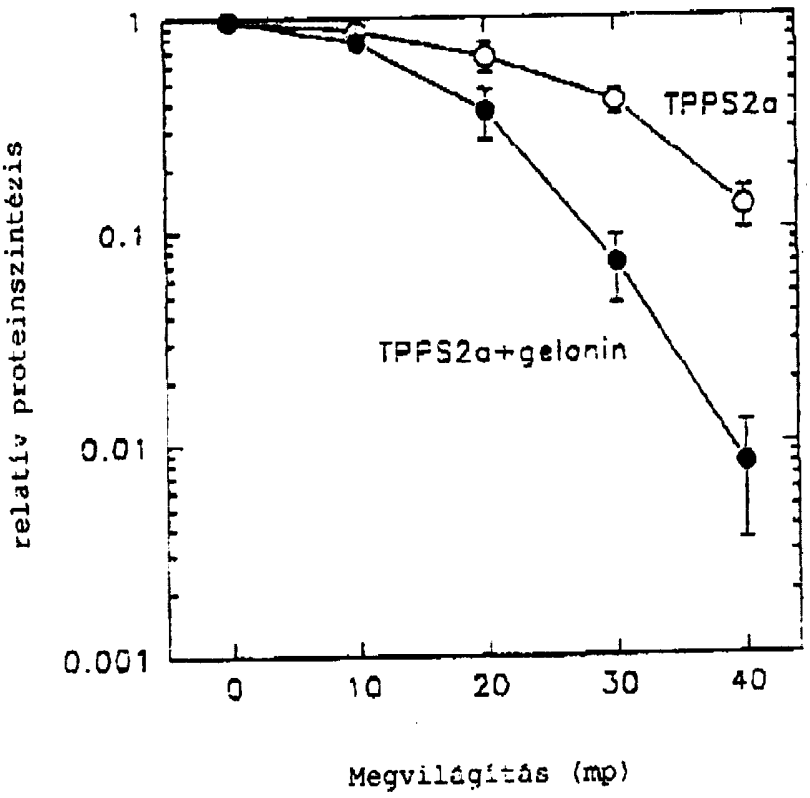
4. ábra


relatív proteinszintézis
1
0.1
0.01
0.001
0
5
10
AlPcS2
AlPcS2+gelonin
Megvilágítás (perc)

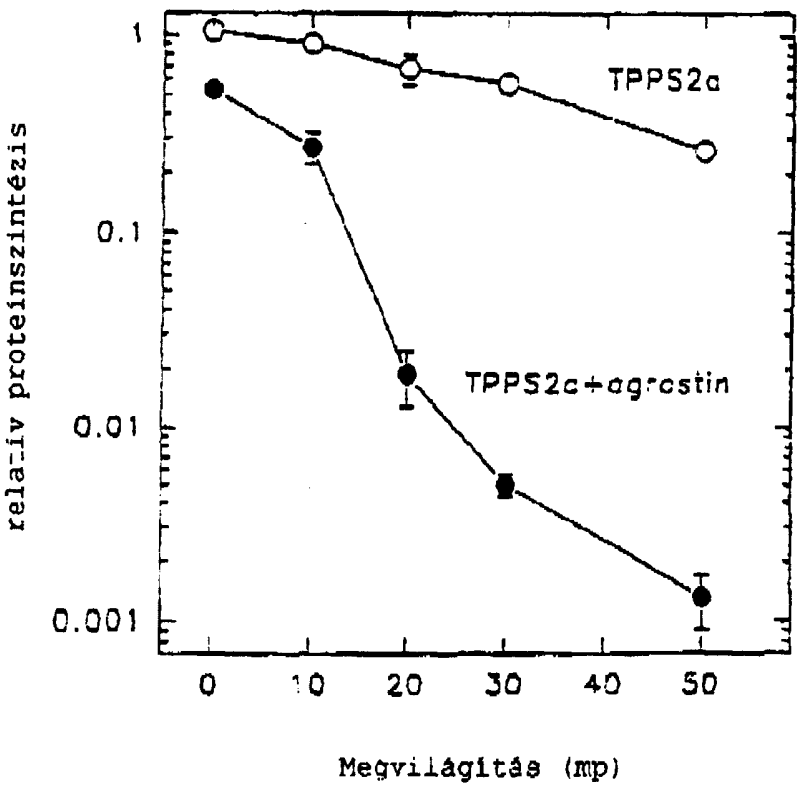
5. ábra


1
0.1
0.01
relatív proteinszintézis
TPPS2a
TPPS2a+gelonin
0
30
60
90
120
Megvilágitás (mp)

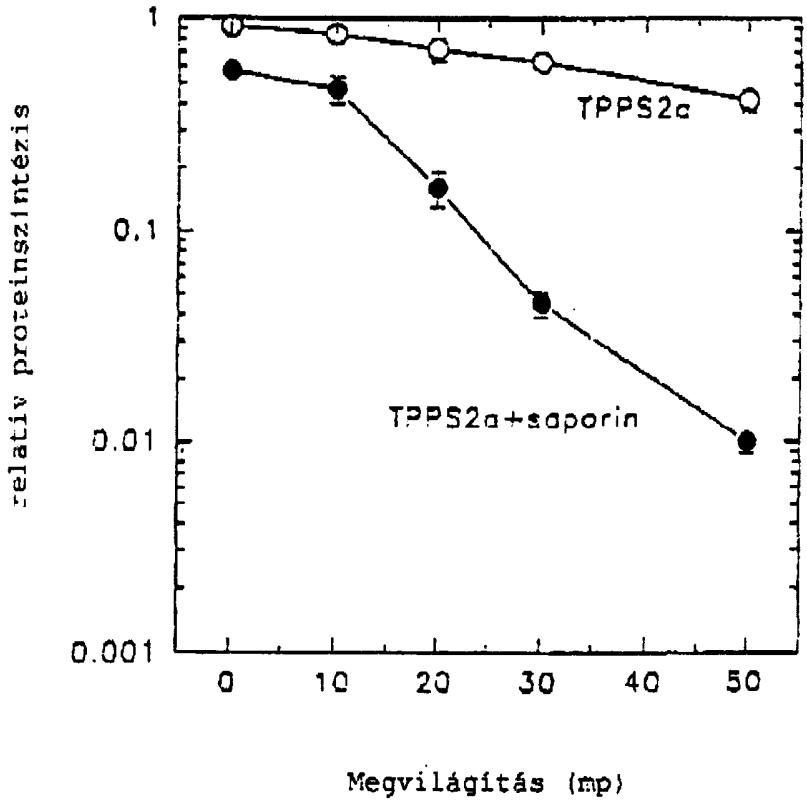
6. ábra


1
0.1
0.01
0.001
relatív proteinszintézis
TPPS2a
TPPS2a+gelonin
0
10
20
30
40
Megvilágítás (mp)

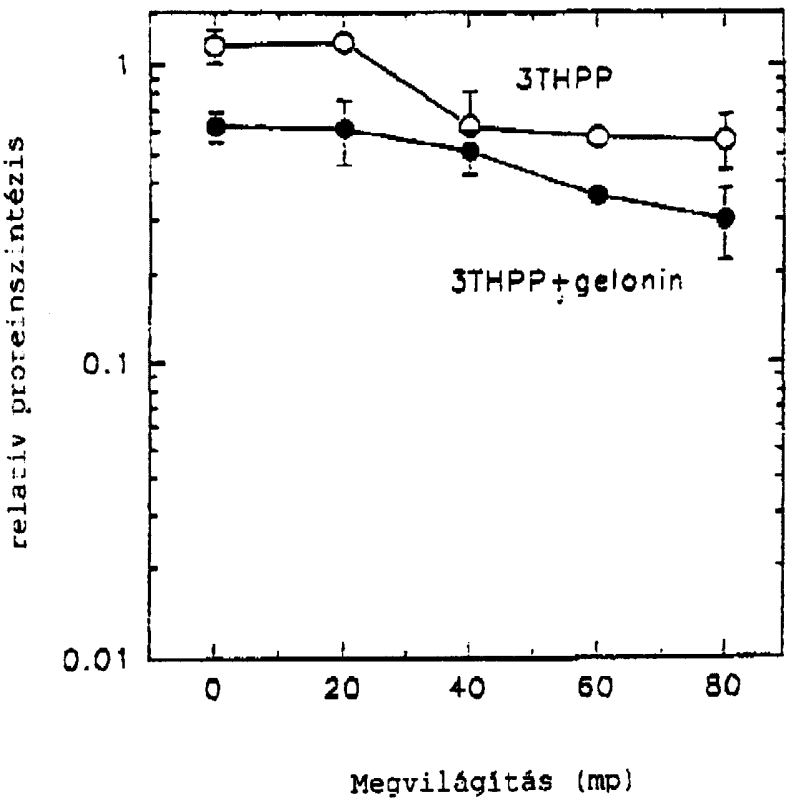
7. ábra


1
0.1
0.01
0.001
relatív proteinszintézis
TPPS2a
TPPS2a+agrostin
0
10
20
30
40
50
Megvilágítás (mp)

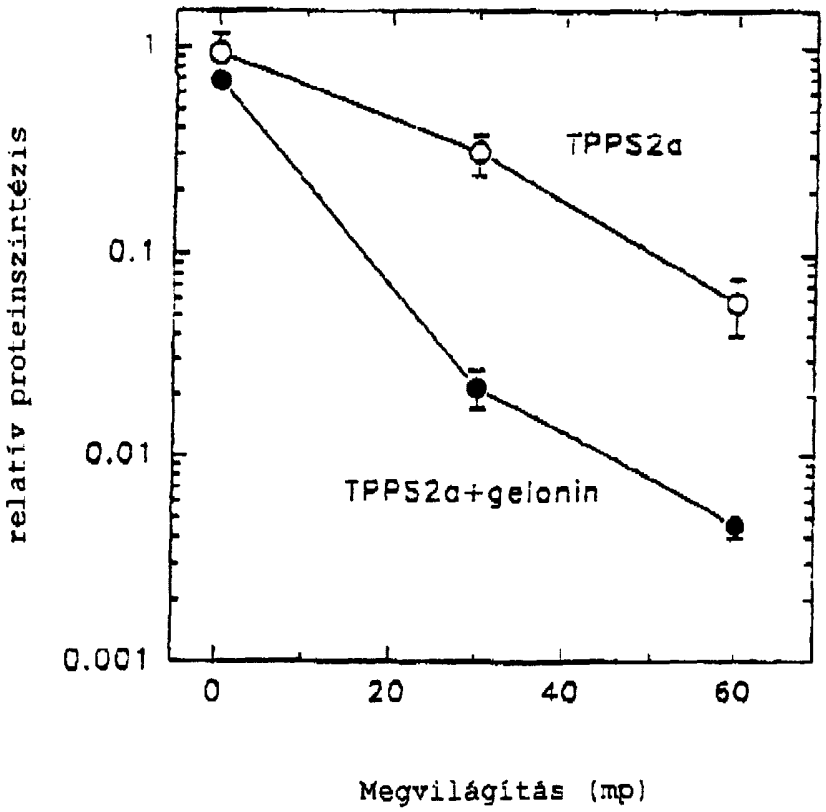
8. ábra


1
0.1
0.01
0.001
relatív proteinszintézis
TPPS2a
TPPS2a+saporin
0
10
20
30
40
50
Megvilágítás (mp)

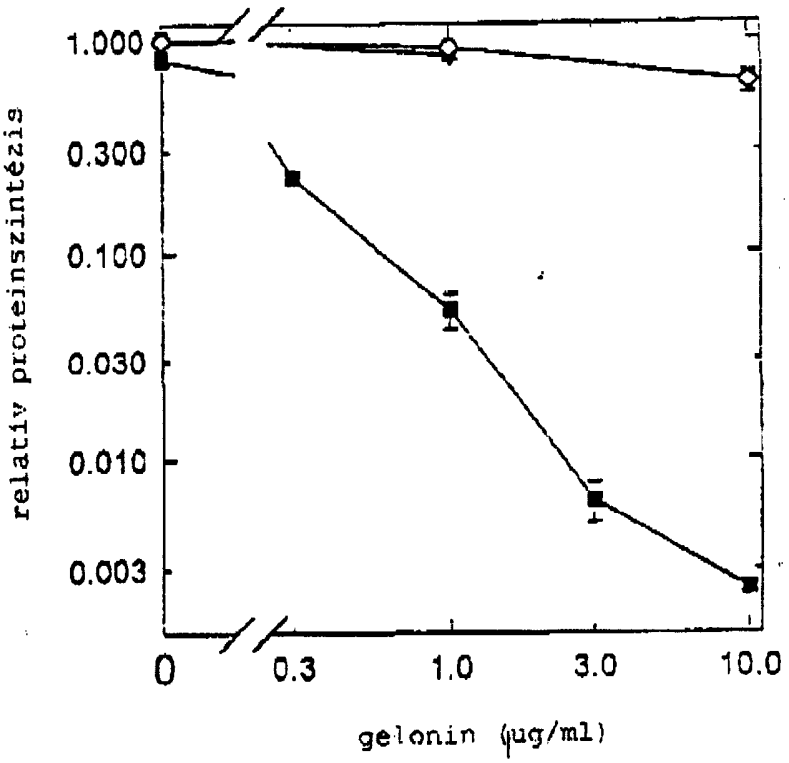
9. ábra


relatív proteinszintézis
1
0.1
0.01
0
20
40
60
80
3THPP
3THPP+gelonin
Megvilágítás (mp)

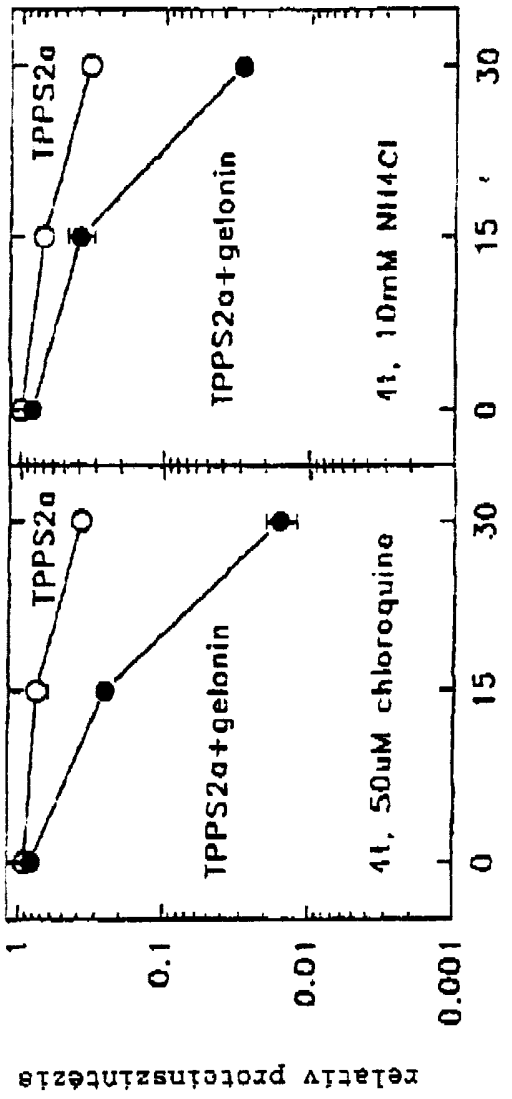
10. ábra


relatív proteinszintézis
1
0.1
0.01
0.001
0
20
40
60
TPPS2a
TPPS2a+gelonin
Megvilágítás (mp)

11. ábra


relatív proteinszintézis
1.000
0.300
0.100
0.030
0.010
0.003
0
0.3
1.0
3.0
10.0
gelonin (μg/ml)

12. ábra


relatív proteinszintézis
1
0.1
0.01
0.001
0
15
30
TPPS2a
TPPS2a+gelonin
41, 50uM chloroquine
41, 10mM NH4Cl
Megvilágítás (mp)

13. ábra