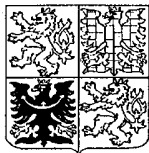


UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

9727

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998 - 8748

(22) Přihlášeno: 04.09.1995

(30) Právo přednosti:
08.09.1994 NO 1994/943327

(47) Zapsáno: 10.03.2000

(86) PCT číslo: PCT/NO95/00149

(87) PCT číslo zveřejněn WO 96/07432

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.⁷:

A 61 K 31/00

A 61 K 38/00

A 61 P 35/04

(73) Majitel :

PHOTOCURE AS, Oslo, NO;

(72) Původce :

Berg Kristian, Heggedal, NO;

Sandvik Kirsten, Oslo, NO;

Moan Johan, Oslo, NO;

(74) Zástupce:

Fischer Michael Ing.,

Podskalská 2 P.O.BOX 82, Praha 2, 128 00;

(54) Název užitého vzoru:

**Prostředek pro modifikaci buněčných
zejména nádorových procesů**

CZ 9727 U1

Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů

Oblast techniky

Technické řešení se týká prostředku pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů u teplokrevných živočichů nebo kultur buněk, obsahujícího látku zvyšující fotocitlivost, schopnou absorpce světla.

Dosavadní stav techniky

Většina molekul neproniká snadno do membrán buněk. Zavádění molekul do cytozolu živých buněk je potřebné pro zpracování a studii biologických dějů. Mezi dnes nejobvykleji používané postupy tohoto druhu patří mikroinjekce, stínově zprostředkovaná fuze pomocí červených krvinek a liposomová fuze, osmotická lyse pinosomů, plnění škrábáním, elektroporace, transfekce zprostředkovaná fosforečnanem vápenatým a viry. Tyto postupy jsou užitečné pro zkoumání buněk v kultuře, ač jsou v mnoha případech nepraktické, časově náročnější, neúčinné nebo způsobují podstatné ničení buněk. Nejsou tudíž optimální pro použití v biologickém a lékařském výzkumu nebo při léčbě, při kterém buňky musí zůstat funkční. Je dobře známo, že porfyriny a mnoho dalších látek, které zvyšují fotocitlivost, vyvolávají cytotoxické efekty na buňkách a tkáních. Tyto efekty jsou založeny na skutečnosti, že látky zvyšující fotocitlivost, tj. látky, které po vystavení světlu, včetně světla ultrafialového a infračerveného vyvolávají reakci, vylučují při vystavení světlu 102 singlety, které rozkládají membrány buněk a strukturu buněk a při rozsáhlé destrukci nakonec buňky zničí. Tyto efekty byly využity při léčbě několika druhů nádorových onemocnění. Léčba je známa pod jménem fotodynamická terapie (Photodynamic Therapy, dále jen PDT) a je založena na injekci fotocitlivého a nádor lokalizujícího barviva, následované vystavením nádorové oblasti světlu. Cytotoxický efekt je zprostředkován zejména tvorbou singletového oxidu. Meziprodukt této reakce má v buňkách velmi krátkou životnost ($<0,04 \mu s$). Proto je základní cytotoxický efekt PDT uskutečněn během vystavení světlu a to velmi blízko míst tvorby 102. 102 reaguje s proteiny (his-tidinem, triptofanem, metioninem, cysteinem, tyrosinem), DNA (guaninem), nenasycenými mastnými kyselinami a cholesterolem a oxiduje je. Jedna z výhod PDT spočívá v tom, že tkáň nevystavená světlu zůstane nezasazena. Existuje rozsáhlá dokumentace, týkající se použití PDT pro zničení nežádoucí populace buněk, například nádorových buněk. Několik řešení se týká samotných fotodynamických látek nebo látek spojených s imunoglobuliny zaměřenými na determinanty receptoru nádorové buňky, čímž se komplex stane buňkově více specifický. Některé fotodynamické látky, jako např. odvozeniny hematorfyrinu, které jsou zaměřeny na ničení nežádoucích buněk jsou popsány v norském patentu číslo 173319, v norských patentových přihláškách 900731, 902634, 901018, 941548, 851897, 934837, 924151 a 891491. V PCT/US93/00683 je popsán způsob dodávky léku, tvořeného protinádorovým lékem a fotoaktivačním lékem připojeným na kopolymerní nosiče. Po podání vstoupí tento komplex do nitra buňky pinocytozou nebo fagocytozou a umístí se uvnitř endosomů a lyzosomů. V lyzosomech je vazba mezi protinádorovou látkou a polymerem hydrolyzována a uvedená látka může pasivně difundovat přes lyzosomovou membránu do cytozolu. Tato metoda je tedy omezena na malé molekulární látky, které jsou schopné difundovat napříč lyzosomními membránami. Po určité časové prodlevě na difuzi se použije světelný zdroj o příslušné vlnové délce a energii pro aktivaci fotoaktivační látky. Sloučený efekt protinádorového léku a fotoaktivačního léku zničí buňku. Všechna známá použití fotoaktivních látek jsou tedy zaměřena na rozsáhlé ničení struktury buněk, vedoucí až ke zničení buňky. Není znám prostředek ani metoda uvolnění buněčné membrány nepropustné molekulám pro proniknutí do cytozolu po místním prolomení endosomních a/nebo lyzosomních membrán. Cílem tohoto technického řešení je tudíž zajistit prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů, obsahující látku zvyšující fotocitlivost, který by po vystavení buňky světlu o vhodné vlnové délce a energii umožnil narušení endosomních a lyzosomních membrán, aniž by zničil funkčnost většiny buněk.

Podstata technického řešení

Nevýhody dosavadního stavu techniky podstatnou měrou odstraňuje a cíl technického řešení splňuje prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů u teplokrevných živočichů nebo kultur buněk, obsahující látku zvyšující fotocitlivost, schopnou absorpce světla, který podle technického řešení obsahuje látku uvolnitelnou do cytozolu buněk, samu o sobě nepronikající buněčnou membránou, přičemž látka zvyšující fotocitlivost a/nebo látka uvolnitelná do cytozolu buněk nebo jejich komponenty jsou volitelně připojeny ke stejným nebo různým molekulám nosiče. Podle výhodného provedení mohou být molekuly nosiče zvoleny ze skupiny polohově orientovaných molekul, látek usnadňujících absorpci látky zvyšující fotocitlivost nebo molekul, které mají být uvolněny do cytozolu. S výhodou může být látka uvolnitelná do cytozolu zvolena ze skupiny obsahující DNA, oligo(deoxy) nukleotidy, mRNA, protisměrné DNA, cukry, proteiny, peptidy, membránou nepronikající léky, jiné molekuly samy o sobě nepronikající buněčnou membránou a kovalentně nebo nekovalentně vázané kombinace shora uvedených molekul. S výhodou může být látka uvolnitelná do cytozolu zvolena ze skupiny látek modifikujících proteosyntetickou aktivitu, může být protinádorovou látkou, která může být alespoň jednou ze skupiny gelonin, saporin, agrostin nebo jejich kombinace. S výhodou může být látka zvyšující fotocitlivost zvolena ze skupiny obsahující porfyriny, ftalocyaniny, purpuriny, choriny, benzoporfyriny, naftalocyaniny, kationová barviva, tetracykliny a lyzosomotropicky slabé zásady a jejich deriváty. S výhodou může být rovněž látka zvyšující fotocitlivost alespoň jednou látkou zvolenou ze skupiny tetrafenylporfyrin s dvěma sulfonanovými skupinami na přilehlých fenylových kruzích (TPPS_{2a}), mezotetrafenylporfin se 4 sulfonanovými skupinami (TPPS₄) a ftalocyanin hliníku se 2 sulfonanovými skupinami na přilehlých kruzích (AlPcS_{2a}). Látka zvyšující fotocitlivost může být s výhodou tetrafenylporfin s dvěma sulfonanovými skupinami na přilehlých fenylových skupinách. Koncentrace látky zvyšující fotocitlivost je s výhodou závislá na množství přežívajících buněk. Látka zvyšující fotocitlivost opčně vektorové molekuly a dopravovaná(é) molekul(y) volitelně připojené ke stejným nebo různým molekulám nosiče mohou být vzájemně sloučené nebo oddělené. Jsou aplikovány na živé buňky a potom endocyticky nebo jiným způsobem přemístěny do endosomů, lyzosomů nebo jiných mezibuněčných, membránou omezených komůrek, přičemž jsou buňky vystaveny světlu o vhodné vlnové délce podle absorpčního spektra látky zvyšující fotocitlivost v rozličných dávkách, závislých na požadované míře přežití tak, aby membrány endosomních, lyzosomních nebo jiných mezibuněčných komůrek se nenarušily a do cytozolu zaváděné molekuly se uvolní do cytozolu, aby samotná světlem aktivovaná látka zvyšující fotocitlivost nezničila většinu buněk. Podle výhodného provedení jsou molekuly uvolňované v cytozolu zvoleny ze skupiny obsahující DNA, oligo(deoxy) nukleotidy, mRNA, protisměrné DNA, cukry, proteiny, peptidy, buněčnou membránou nepronikající léky, jiné buněčnou membránou samy o sobě nepronikající molekuly a kovalentně nebo nekovalentně vázané kombinace shora uvedených molekul, ze skupiny látek modifikujících proteosyntetickou aktivitu, látka uvolňovaná do cytozolu může být s výhodou gelonin, saporin nebo agrostin nebo jakákoliv jejich kombinace, použité látky zvyšující fotocitlivost mohou být zvoleny ze skupiny obsahující porfyriny, ftalocyaniny, purpuriny, chloriny, benzoporfyriny, naftalocyaniny, kationová barviva, tetracykliny a lyzosomotropické slabé zásady a jejich deriváty, použitá látka zvyšující fotocitlivost může být tetrafenylporfin s 2 sulfonanovými skupinami na přilehlých fenylových kruzích (TPPS_{2a}), mezotetrafenylporfin se 4 sulfonanovými skupinami (TPPS₄) nebo ftalocyanin hliníku se 2 sulfonanovými skupinami na přilehlých kruzích (AlPcS_{2a}) nebo jakákoliv jejich kombinace, použité vektorové molekuly mohou být polohově orientované molekuly nebo látky, které usnadňují absorpci látky zvyšující fotocitlivost nebo molekul, které mají být uvolněny do cytozolu, frakce přežívajících buněk může být regulována volbou dávky světla ve vztahu ke koncentraci fotocitlivosti zvyšující látky. Prostředek pro modifikaci nádorových nebo jiných buněčných procesů u teplokrevných živočichů nebo kultur buněk obsahující jak látku, která má být uvolněna do cytozolu, tak látku zvyšující fotocitlivost a nosiče, může obsahovat člen zvolený ze skupiny složené z nosiče na usnadnění translokace do mezibuněčných komůrek, jako např. endosomy, lyzosomy nebo jiné mezibuněčné komůrky, mající navíc připojené jak látky modifikující buněčný proces, které mají

být uvolněny do cytozolu, tak i látku zvyšující fotocitlivost, která po aktivaci světlem prolomí membrány mezibuněčných komůrek, několik z řečených nosičů z nichž nejméně jeden nosič má navíc připojenou látku, která má být uvolněna do cytozolu, a jiný podobný nebo odlišný nosič má navíc připojený fotocitlivost zvyšující látku a oddělenou prostředek nosičů, která má být spolu se látkou uvolněna do cytozolu, a látku zvyšující fotocitlivost s výhodou může být řečená látka, která má být uvolněna do cytozolu, protinádorová látka, kterou může být gelonin, látka, která má být uvolněna do cytozolu, může být zvolena ze skupiny obsahující DNA, oligo(dexy)nukleitidy, mRNA, protisměrnou DNA, cukry, proteiny, peptidy, membránou nepronikající léky, jiné buněčnou membránou samy o sobě nepronikající molekuly, kovalentně nebo nekovalentně vázané kombinace shora uvedených molekul, látka zvyšující fotocitlivost může být zvolena ze skupiny obsahující porfyriny, ftalocyaniny, purpuriny, chloriny, benzoporfyriny, naftalocyaniny, kationová barviva, tertracykliny a lyzosomotropicky slabé zásady a jejich deriváty, může být tetrafenylporfín s dvěma sulfonanovými skupinami na přilehlých fenylových skupinách nebo mohou být nosiče zvoleny z polohově orientovaných molekul nebo látek, které usnadňují absorpci látek zvyšujících fotocitlivost nebo molekuly, které mají být uvolněny do cytozolu. Předmětem technického řešení je rovněž souprava pro provádění tohoto způsobu obsahující látku zvyšující fotocitlivost a jiné látky modifikující přenos přes membránu buňky, usnadňující určité populace buněk nebo jiné související funkce. Při použití prostředku pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle technického řešení zůstanou molekuly dostupné v cytozolu a buňka si udrží svou funkčnost. Fotoaktivační látka, absorbována buňkou a je umístěna v endosomech, lyzosomech nebo jiných buněčných komůrkách, sloučeně nebo odděleně, spolu s nosnými molekulami, cílovými imunoglobuliny a molekulami, které se mají dopravit do cytozolu. Vystavením buněk světlu o vhodné vlnové délce pro aktivaci látky zvyšující fotocitlivost jsou prolomeny jen endosomní, lyzosomní a jiné buněčné komory a molekuly budou uvolněny v cytozolu beze ztráty funkčnosti buňky akcí fotoaktivované látky a případnou akcí obsahu endosomu a/nebo lyzosomu.

Přehled obrázků na výkrese

Technické řešení je dále detailně popsáno a ilustrováno vyobrazeními, kde obr. 1 ukazuje, jak mohou být molekuly zavedeny do cytozolu buňky podle tohoto technického řešení. Látka (S) zvyšující fotocitlivost volitelné molekuly (M) jsou endocytovány buňkami (I, představuje invaginaci plazmy membrány spouštějící endocytický postup) a obě látky končí ve stejných vezikulách (váčcích) (II). Po vystavení těchto vezikul světlu se membrány vezikul prolomí a obsah se uvolní (III). Obr. 2 představuje syntézu proteinu v buňkách NHIK 3025 po ošetření geloninem za nepřítomnosti nebo přítomnosti TPPS_{2a} světla po dobu 50 s. Na obr. 2 jsou použity tyto značky: ○, TPPS_{2a} + světlo; ●, -TPPS_{2a} -světlo, +TPPS_{2a} -světlo; ▽, -TPPS_{2a} + světlo. Tyto buňky byly přes noc ošetřeny pomocí 3,2 μg/ml TPPS_{2a} a indikovanou koncentrací geloninu a ve všech případech vystaveny stejné dávce světla. Syntéza proteinu byla měřena měřením vtělení 3 [H] leucinu do proteinů, 24 hodin po vystavení světlu. Obr. 3 představuje křivky dávkové reakce buněk ošetřených jen TPPS_{2a} a světlem (○) nebo v kombinaci s 0,2 μg/ml (▽) nebo 2,0 μg/ml geloninu, jak popsáno v obr. 2. Obr. 4 představuje syntézu v buňkách NHIK 3025 po ošetření pomocí 3,2 μg/ml TPPS_{2a} a světla za nepřítomnosti nebo přítomnosti 0,2 μg/ml geloninu. Použité značky: ●, TPPS_{2a} - gelonin; TPPS_{2a} + gelonin. Buňky byly ošetřeny přes noc pomocí TPPS_{2a} v nepřítomnosti nebo přítomnosti geloninu a vystaveny naznačeným dávkám světla. Syntéza proteinu byla měřena vtělením 3 [H] leucinu do proteinu. Obr. 5 představuje syntézu v buňkách V79 po ošetření pomocí 25 μg/ml AIPcS₂ a světlem v nepřítomnosti nebo přítomnosti 1 μg/ml geloninu. Použité značky: ● látka zvyšující fotocitlivost + toxin; ○ látka zvyšující fotocitlivost. Obr. 6 představuje syntézu v buňkách H146 po ošetření pomocí 0,3 μg/ml TPPS_{2a} a světlem v nepřítomnosti nebo přítomnosti 1 μg/ml geloninu. Použité značky: jako v obr. 5. Obr. 7 představuje syntézu v buňkách V79 po ošetření pomocí 1 μg/ml TPPS_{2a} a světlem v nepřítomnosti nebo přítomnosti 1 μg/ml geloninu. Použité značky jako v obr. 5. Obr. 8 představuje syntézu v buňkách NHIK 3025 po ošetření pomocí 3,2 μg/ml TPPS_{2a} a světlem

v nepřítomnosti nebo přítomnosti 1 $\mu\text{g/ml}$ agrostinu. Použité značky jako v obr. 5. Obr. 9 představuje syntézu v buňkách NHIK 3025 po ošetření pomocí 3,2 $\mu\text{g/ml}$ TPPS_{2a} a světlem v nepřítomnosti nebo přítomnosti 1 $\mu\text{g/ml}$ saporinu. Použité značky jako v obr. 5. Obr. 10 představuje syntézu v buňkách NHIK 3025 po ošetření pomocí 0,25 $\mu\text{g/ml}$ 3-THPP a světlem v nepřítomnosti nebo přítomnosti 1 $\mu\text{g/ml}$ geloninu. Použité značky jako v obr. 5. Obr. 11 představuje syntézu v buňkách COS-7 po ošetření pomocí 3 $\mu\text{g/ml}$ TPPS_{2a} a světlem v nepřítomnosti nebo přítomnosti 1 $\mu\text{g/ml}$ geloninu; použité značky jako v obr. 5. Obr. 12 představuje syntézu v buňkách NHIK 3025 po ošetření geloninem v nepřítomnosti nebo přítomnosti TPPS₄ a osvětlení po dobu 50 s. Použité značky $\square$ TPPS₄ + světlo, ∇ - TPPS₄ - světlo; +RPPS₄ - světlo. Buňky byly ošetřeny přes noc 75 $\mu\text{g/ml}$ TPPS₄ a naznačenou koncentrací geloninu a ve všech případech byly vystaveny stejné dávce světla. Syntéza proteinu byla měřena měřením vtělení 3 [H] leucinu do proteinu 24 hodin po vystavení světlu. Obr. 13 představuje syntézu v buňkách OHS po ošetření 3 $\mu\text{g/ml}$ TPPS_{2a} po dobu 18 hodin, následovaném 4 hodinami bez přítomnosti TPPS_{2a} a za nepřítomnosti nebo přítomnosti 3 $\mu\text{g/ml}$ geloninu před vystavením světlu. Buňky byly inkubovány po stejné 4 hodiny v 50 μM chlorochininu nebo 10 mM NH₄Cl pro zabránění degradace lyzosomního proteinu. Je plně doloženo, že celá řada léků, včetně di- a tetrasulfo-nátovaného hliníku ftalocyaninu, sulfonátovaných tetrafenylprofinů (TPPSn), nilské modře, e6 derivátů chloru, uroporfinu I, fyloerythrinu a případně hemetoporfyrinu a metylové modře jsou umístěny v endosomech a v lyzosomech buněk v kultuře. Ve většině případů je to způsobeno endocytickou aktivitou. Původci prokázali, že vystavení buněk obsahujících látky zvyšující fotocitlivost ve svých lyzosomech vede k propustnosti lyzosomů a uvolnění látky zvyšující fotocitlivost. V některých případech, jako např. u TPPS₂ a TPPS₁, podstatná část aktivity lyzosomního enzymu byla po PDT zjištěna v cytozolu, což naznačuje, že obsah lyzosomu lze uvolnit do cytozolu beze ztráty jeho aktivity. Tento efekt barviv zvyšujících fotocitlivost lze podle této studie použít všeobecně na uvolnění endocytizovaných molekul z endosomů a lyzosomů. Zavedení molekul do buněčné cytoplazmy se docílí v první řadě vystavením buněk nebo tkáně barvivu zvyšujícímu fotocitlivost, molekulu(y), kterou(é) chceme dodat do cytozolu buněk s nebo bez nosných molekul a imuglobinů, které by všechny měly být přednostně umístěny v endosomech a/nebo lyzosomech. V druhé řadě se buňky nebo tkáň vystaví světlu o vhodné vlnové délce a energii pro vyvolání fotodynamické reakce. Tato fotodynamická reakce povede k prolomení lyzosomních a/nebo endosomních membrán a obsah těchto vezikul bude uvolněn do cytozolu. Principy tohoto technického řešení jsou naznačeny na obr. 1. Je nutné, aby látka zvyšující fotocitlivost a molekula, které se mají zavést do buněk, byly umístěny v těchto komůrkách. Je rovněž nutné zdůraznit, že externě přidané molekuly se mohou hromadit v mezibuněčných komůrkách, jiných než jsou lyzosity a endosomy, jako např. v Golgiho aparatuře a v endoplasmatickém retikulu. V takových případech lze fotocitlivost zvyšující látky, nacházející se ve stejných komůrkách, použít ve spojení se světlem pro stejné účely za předpokladu, že kombinace světelné dávky a fotocitlivost zvyšující látka nezničí funkčnost buněk. Toto technické řešení je založeno na naší in vitro demonstraci, podle které fotocitlivost zvyšující látka, např. TPPS_{2a} (terafenylporfin s 2 sulfonanovými skupinami nebo přílehlými fenylovými skupinami) v kombinaci se světlem mohou vyvolat uvolnění funkčně neporušeného obsahu lyzosomu bez zničení velkého podílu buněk. Téhož efektu lze docílit použitím jiných fotocitlivost zvyšujících látek samotnými nebo ve spojení nebo ve vazbě s jinými molekulami a částicemi použitými jako vektory pro nasměrování fotocitlivost zvyšujících látek na endosom a/nebo lyzosom nebo jiné mezibuněčné komůrky. Takovými vektory mohou být tkáň nebo buněčně specifické protilátky nebo jiné ligandy, které se vážou na povrch buněk, čímž zvyšují absorpci fotocitlivost zvyšujících látek receptory zprostředkované endocytozy. Jiným vektorem by mohlo být použití rekonstruovaných částic LDL. Tyto částice jsou rovněž absorbovány receptory zprostředkované endocytozy. Tímto způsobem lze zvýšit počet fotocitlivost zvyšujících molekul na LDL částici a vazbu na částice LDL v porovnání s předvazbou na původní LDL. Technické řešení není omezeno na použití in vitro, ale může být také použito in vivo, buď na ošetření na místě, nebo na ex vivo ošetření, následované injekcí ošetřených buněk. Absorpce do endosomů a lyzosomů může být zlepšena stejným způsobem,

který byl popsán pro in vitro ošetření. Ošetřit lze všechny tkáně, pokud fotocitlivost zvyšující látka je absorbována cílovými buňkami a světlo je dodáno správně. Kromě fotocitlivost zvyšující látky je podstatné i světlo. Světlo musí být absorbováno fotocitlivost zvyšující látkou nebo musí nepřímou vyvolat vybuzeň stav látky zvyšující fotocitlivost. Oblast vlnové délky bude proto záviset na fotocitlivost zvyšující látce. Expoziční světlo nemusí být monochromatické nebo kolimační. Lze použít každý zdroj světla vyzařující příslušnou vlnovou délku. Překvapující je, že fotodynamická akce podle tohoto technického řešení zřejmě neutralizuje potenciálně cytotoxický efekt uvolňování lyzozomního obsahu. Vynálezci tak prokázali, že vzniku lyzozomního katepsinu je podstatně zabráněno fotodynamickou akcí TPPS_{2a} v kultuře buněk NHIK 3025. To tvoří překvapující jev tohoto technického řešení a pomáhá udržet životnost a funkčnost buněk po dopravě molekul do cytozolu narušením endosomních a /nebo lyzozomních membrán.

Příklady experimentálního a klinického využití

Toto technické řešení je dále objasněno následujícími příklady, aniž by bylo na ně omezeno:

1) Léčení rakoviny

Několik fotocitlivost zvyšujících látek se přednostně usazuje v nádorových tkáních, přičemž selektivita nádoru nad okolní tkáň má obvykle faktor 2 - 3, avšak v některých případech, jako např. u mozkových tkání, tento faktor může být vyšší, konkrétně až do 30. Molekuly, které mohou být klinického zájmu pro léčení rakoviny, ale jsou omezeny nízkou nebo žádnou absorpcí, v cytozolu, mohou být zavedeny do cytozolu pomocí tohoto technického řešení. Gelonin, jak ukázáno v níže uvedeném příkladu, je například takové molekuly. Rovněž mohou být použity některé další molekuly, a to buď samostatně nebo ve spojení s jinými molekulami (jako např. protilátkami, transferinem, látkami zvyšujícími fotocitlivost, aponemB na rekonstruovaných LDL částicích). Výhoda takového kombinovaného ošetření by spočívala ve zlepšeném cytotoxickém efektu v hlubších vrstvách nádorové tkáně, jelikož nízké a subtoxické dávky světla jsou dostatečné na narušení lyzozomů a endosomů, a ve zlepšené specifčnosti toxinu, jelikož PDT je aplikována jen na oblast nádorové oblasti.

2) Genová terapie

Genová terapie, tj. terapeutický přenos genů do buněk pacienta, tvoří slibnou metodu pro léčení genetických poruch, jako jsou např. rakovina, cystická fibrozitida, kardiovaskulární onemocnění a mnoho dalších nemocí. Hlavní dnešní problém je transfekce, která musí nastat in vivo, nebo v některých případech ji lze provést ex vivo. Dnes nejčastěji používaný vektor, tj. struktura, která pomáhá dodat molekuly DNA do buněk, jsou rozličné druhy virů, zejména retro a endoviry. Nevýhody těchto metod jsou nízká stabilita vektoru, omezená specifčnost, nízká výtěžnost a zavedení DNA viru do lidské tkáně. DNA může být zavedena do buněk, buď jako protismysla DNA nebo jako celé geny, prostřednictvím fotochemicky vyvolaného narušení endosomů a/nebo lyzozomů. Ošetření může být provedeno in vivo.

3) Experimentální využití

Toto technické řešení může být použito na zavedení široké škály molekul do buněk v kultuře, jako např. genů, protilátek, upravenými proteiny a látkami, které obvykle samy o sobě nepronikají membránou plazmatu.

Příklad 1

Tento příklad dokládá, že fotodynamické ošetření uvolňuje látku zabíhající syntézu proteinu do cytozolu. Řada rostlinných toxinů ničí buňky tím, že vniká do cytozolu a enzymaticky deaktivuje ribozomní funkci. Nejcytotoxičtější rostlinné proteiny jsou tvořeny 2 polypeptidními řetězci, A a B, vzájemně vázanými dvojsířičitanovými můstky. Funkce řetězce B je vázat protein na povrch buněk, zatímco řetězec A obsahuje enzymatickou aktivitu. Gelonin je rostlinný toxin, který

účinně brání syntéze proteinu v bezbuněčném systému, ale má jen malý nebo žádný vliv na neporušené buňky. Nízký cytotoxický vliv na neporušené buňky je pravděpodobně způsoben nedostatkem řetězce B v geloninu. Buňky NHIK 3025 byly inkubovány s TPPS_{2a} (vzorec I) a geloninem, odděleně nebo společně, po dobu 18 hodin a následně 1 hodinu v TPPS_{2a} a bezgeloninovém prostředí dříve, než byly buňky vystaveny světlu. Syntéza proteinu byla měřena 24 hodin po vystavení světlu. Fotodynamické ošetření, které ničí 10 - 20 % samotných buněk, snížilo syntézu proteinu o 30 - 40 % (obr. 2). Z obr. 2 vyplývá, že samotný gelonin v přítomnosti nebo nepřítomnosti světla zabraňuje do jisté míry syntézu proteinu. Syntéza proteinu může být zcela zamezena 5 kombinací PDT a geloninu o IC₅₀ = 0,2 µg/ml geloninu. V nepřítomnosti fotodynamického ošetření gelonin tedy v podstatě nevnikl do cytozolu. Tento příklad naznačuje, že lze použít TPPS_{2a} a světla po zavedení funkčně neporušených makromolekul do buněčného cytozolu.

Příklad 2

Tento příklad ukazuje, jak může být dávka světla (o vlnové délce, která je absorbována barvivem) použita na rozhodnutí o velikosti přežívající frakce buněk. Buňky NHIK 3025 byly inkubovány s TPPS_{2a} a geloninem podle plánu příkladu 1. Klonogenní přežití buněk bylo měřeno 24 hodin po vystavení světlu. Z obr. 3 vyplývá, že prakticky všechny buňky byly zničeny pomocí TPPS_{2a} a světla při prodloužení expozice světlu. To je v souladu s předchozím stavem techniky týkající se ničení nežádoucích buněk pomocí PDT. Přidáním geloninu klesne míra přežití z důvodu útlumového vlivu geloninu na syntézu proteinu, což značí, že gelonin je nyní uvolněn v cytozolu. Zvýšená koncentrace přidaného geloninu vede k více geloninu v cytozolu, jak naznačeno zvýšenou citlivostí buněk na fotodeaktivaci. Toto technické řešení v každém případě nabízí možnost nastavení hladiny přežití a volbu kombinace fotocitlivost zvyšující látky a vystavení světlu, která zachová životnost žádané frakce buněk.

Příklad 3

Tento příklad předvádí, jak mění se dávka osvětlení řídí množství geloninu uvolněného v cytozolu, stanoveného relativní syntézou proteinu. Buňky NHIK 3025 byly inkubovány pomocí TPPS_{2a} a geloninem podle plánu příkladu. Z obr. 4 vyplývá, že shora uvedená toxická dávka 50 s zvýšila frakci geloninu v cytosolu, stanovenou relativní syntézou proteinu. Příklad 4 - 11 předvádí použití na různých druzích buněk a s různými fotocitlivost zvyšujícími látkami a toxiny. Mezibuněční umístění fotocitlivost zvyšujících látek je lyzosomní (TPPS₄, TPPS_{2a}, AlPcS_{2a}) a extralyzosomní (3-THPP). Použité značky znamenají: AlPcS_{2a} je ftalocyanin hliníku s 2 sulfonanovými skupinami na přilehlých fenylových kruzích; TPPS₄ je mezotetrafenylporfin se 4 sulfonanovými skupinami; TPPS_{2a} je mezotetrafenylporfin se 2 sulfonanovými skupinami na přilehlých fenylových kruzích; 3-THPP je tetrahydroxyfenylporfin. Použité druhy buněk jsou karcinomatózní buňky v místě z lidského hrdla (NHIK 3025), plicní fibroblasty z čínského křečka (V79), SV-40 transformovaná játra z africké zelené opice (CV1-opičí fibroblastům podobné buňky) (cos-7), lidské osteosarkomní buňky (OHS) a malé buňky plicní rakoviny (H146). Všechny pokusy byly vedeny jako v příkladu č.1.

Příklad 4

Tento příklad se týká použití látek AlPcS_{2a} zvyšujících fotocitlivost ve V79 buňkách s nebo bez geloninu jako toxinu (obr. 5). Volbou specifické dávky osvětlení (ozářovací doby) je předvedeno, že bez toxinu dochází k velmi malému poškození buňky, jak doloženo malým snížením syntézy proteinu, zatímco s geloninem je syntéza proteinu hluboce snížena. To ukazuje, jak jsou molekuly geloninu přenášeny do cytoplazmy buňky prostřednictvím lyzosomů bez podstatného poškození buněk, přestože mezibuněková lokalizace AlPcS_{2a} je lyzosomní (Moan.J., Berg.K.; Anholt.H. a Madslie.K.: (1994). Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for phototherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells. Sulfonanované ftalocyaniny hliníku jako zvyšovače citlivosti pro

fototerapii. [Vliv malých dávek světla na lokalizaci, fluorescenci barviv a fotocitlivost v buňkách V79]. *Int.J.Cancer* 58: 865-870).

Příklad 5

Tento příklad předvádí přenos toxinu geloninu do buněk H146 bez podstatného ovlivnění životnosti buněk. (Obr. 6) je známo, že TPPS_{2a} je lyzomně umístěna v buňce. (Berg.K., Western.A., Bommer.J. a Moan.J.: (1990) Intracellular localisation of sulfonated meso-tetraphenylporphines in human carcinoma cell line. [Mezibuňkové umístění sulfonanovaného mezotetrafenylporfinu v lidském karcinomním druhu buněk.] *Photochem.Photobiol.* 52: 481-487; Berg.K., Madslie.K., Bommer J.C., Oftebro.R., Winkelman J.C. a Moan.J.: (1991) Light induced relocation of sulfonated mesotetraphenyl-porphines in NHIK 3025 cells and effects of dose fractionation. [světlem vyvolaná relokace sulfonanových mezotetrafenylporfinův buňkách NHIK 3025 a vlivy frakcionalizace dávkování.] *Photochem.Photobiol.* 53: 203-210; Berg.K. a Moan.J.: (1994) Lysosomes as photochemical targets. [Lyzosomy jako fotochemické cíle.] *Int.J.Cancer* 59: 814-822).

15 Příklad 6

Tento příklad převádí způsob podle technického řešení v buňkách V79 za použití TPPS_{2a} jako látky zvyšující fotocitlivost (obr. 8).

Příklad 7

Tento příklad předkládá přenos toxinu agrostin do buněk NHIK 3025 pomocí látky TPP_{2a} zvyšující fotocitlivost (obr. 9).

Příklad 8

Tento příklad představuje přenos toxinu saporin do NHIK 3025 buněk pomocí TPP_{2a} (obr. 9).

Příklad 9

Toto je porovnávací příklad předvádějící, že u látky zvyšující fotocitlivost (3-THPP), která nevstupuje do endocytických vezikulí (tj. endosomů a lyzosomů) (Peng.Q., Danielsen, H.E. a Moan.J.: (1994) Potent photosensitizers for photodynamic therapy of cancer: Applications of confocal laser scanning microscopy for fluorescence detection of photosensitizing fluorophores in neoplastic cells and tissues. [Scopné látky zvyšující fotocitlivost pro fotodynamickou terapii rakoviny: Aplikace konfokální (souhnikové) laserové snímání mikroskopie pro fluorescenční detekci fluoronosičů zvyšujících fotocitlivost v nádorových buňkách a tkáních.]: *Proceedings of microscopy, Holography and Interferometry in Biomedicine*. SPIE svazek 2083:71-82, neexistuje podstatný rozdíl mezi vlivem 3-THPP s nebo bez geloninu na syntézu proteinu (obr. 10). Tudíž gelonin není dopravován do cytozolu buněk.

Příklad 10

Tento příklad předkládá přenos geloninu do buněk COS-7 pomocí TPPS_{2a} podle technického řešení (obr. 11).

Příklad 11

Tento příklad předkládá přenos geloninu do buněk OHS pomocí TPPS_{2a} podle technického řešení (obr. 13). U tohoto druhu buněk dochází k podstatné degradaci proteinu v lyzosomech, které jsou v tomto příkladu potlačeny 4-hodinovou inkubací buněk buď v 50 μ M chlorochininu nebo v 10 mM NH₄CL.

Příklad 12

Tento příklad předvádí, podobně jako v příkladu 1, přenos geloninu do buněk NHIK 3025 jako funkci koncentrace geloninu, když jsou buňky inkubovány s TPPS₄ a s různými koncentracemi geloninu a vystaveny světlu (obr. 12). Při inkubaci buněk jen se samostatným geloninem a vystavení světlu, nebo inkubací s TPPS₄ a geloninem bez vystavení světlu, nedochází k přenosu geloninu do buněk. Příklady ukazují, že různé molekuly mohou být zavedeny do cytozolu širokého sortimentu buněk pomocí různých látek zvyšujících fotocitlivost a světelných dávek. Exogenní molekuly mohou být zavedeny do buněčného cytozolu po dávkách látek zvyšujících fotocitlivost a osvětlení, které neničí buňky, pokud jsou zaváděné molekuly a fotocitlivost zvyšující látky dopravovány do těchto komůrek buněk. Fotochemický efekt na biologické komůrky závisí na daném množství fotocitlivost zvyšující látky v této komůrce, na dávce použitého světla a na spektrálních vlastnostech světelného zdroje. Nejlepší způsob vyhodnocení fotochemických účinků na buňky v kultuře je proto měření přežití buňky 24 hodin nebo déle po ošetření. Jak uvedeno shora, existuje dobrá korelace mezi vlivem ničení buněk a potlačením syntézy proteinů 24 hodin po ošetření, jak uvedeno shora (data však nejsou uvedena).

NÁROKY NA OCHRANU

1. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů u teplokrevných živočichů nebo kultur buněk, obsahující látku zvyšující fotocitlivost, schopnou absorpce světla, **vyznačující se tím**, že obsahuje látku uvolnitelnou do cytozolu buněk, samu o sobě nepronikající buněčnou membránou, přičemž látka zvyšující fotocitlivost a/nebo látka uvolnitelná do cytozolu buněk nebo jejich komponenty jsou volitelně připojeny ke stejným nebo různým molekulám nosiče.
2. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že molekuly nosiče jsou zvoleny ze skupiny molekul polohově orientovaných, látek usnadňujících absorpci látky zvyšující fotocitlivost nebo molekul, které mají být uvolněny do cytozolu.
3. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že látka uvolnitelná do cytozolu je zvolena ze skupiny obsahující DNA, oligo(deoxy) nukleotidy, mRNA, protisměrné DNA, cukry, proteiny, peptidy, membránou nepronikající léky, jiné molekuly samy o sobě nepronikající buněčnou membránou a kovalentně nebo nekovalentně vázané kombinace shora uvedených molekul.
4. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle jednoho z předchozích nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že látka uvolnitelná do cytozolu je zvolena ze skupiny látek modifikujících proteosyntetickou aktivitu.
5. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle jednoho z předchozích nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že látka uvolnitelná do cytozolu je protinádorová látka.
6. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že protinádorová látka je alespoň jedna látka ze skupiny gelonin, saporin, agrostin nebo jejich kombinace.
7. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle jednoho z předchozích nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že látka zvyšující fotocitlivost je zvolena

ze skupiny obsahující porfyriny, ftalocyaniny, purpuriny, choriny, benzoporfyriny, naftalocyaniny, kationová barviva, tetracykliny a lysozomotropicky slabé zásady a jejich deriváty.

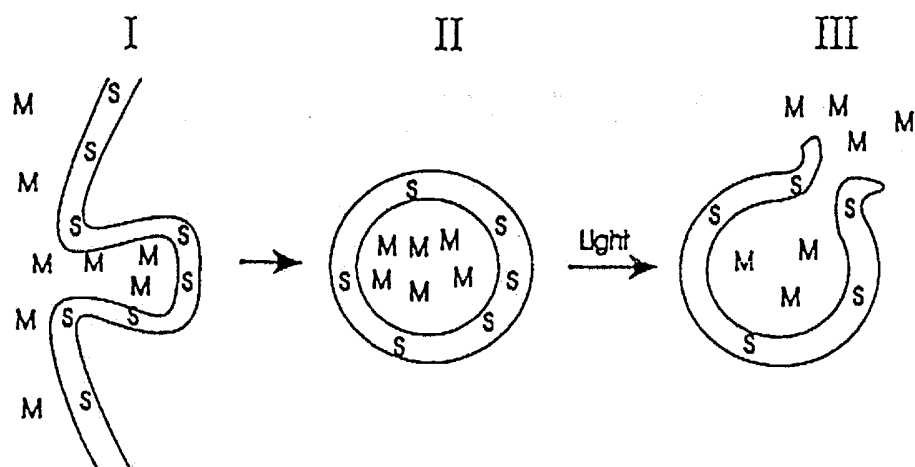
5 8. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle jednoho z předchozích nároků 1 až 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že látka zvyšující fotocitlivost je alespoň jednou látkou zvolenou ze skupiny tetrafenylporfyrin s dvěma sulfonanovými skupinami na přilehlých fenylových kruzích (TPPS_{2a}), mezotetrafenylporfin se 4 sulfonanovými skupinami (TPPS₄) a ftalocyanin hliníku se 2 sulfonanovými skupinami na přilehlých kruzích (AlPcS_{2a}).

10 9. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle jednoho z nároků 1 až 8, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že látka zvyšující fotocitlivost je tetrafenylporfin s dvěma sulfonanovými skupinami na přilehlých fenylových skupinách.

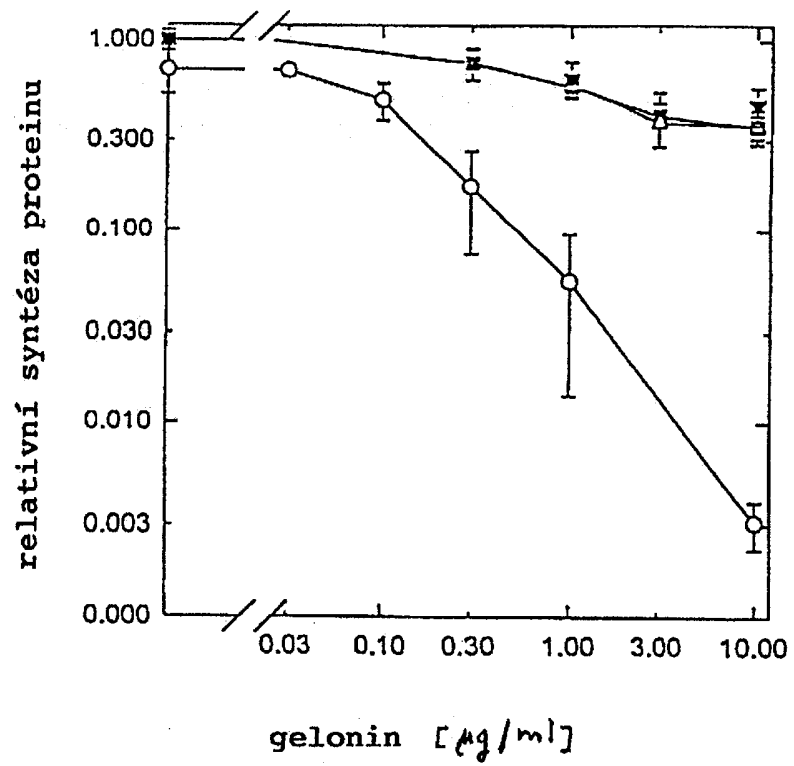
10. Prostředek pro modifikaci buněčných zejména nádorových procesů podle jednoho z nároků 1 až 9, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že koncentrace látky zvyšující fotocitlivost je závislá na množství přežívajících buněk.

15

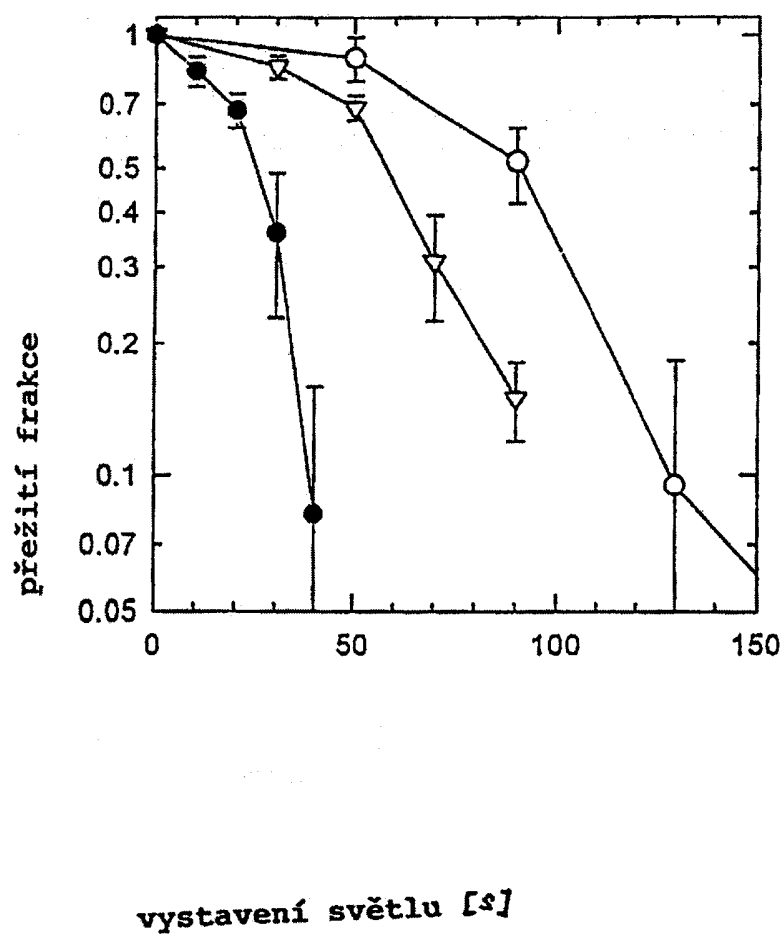
13 výkresů



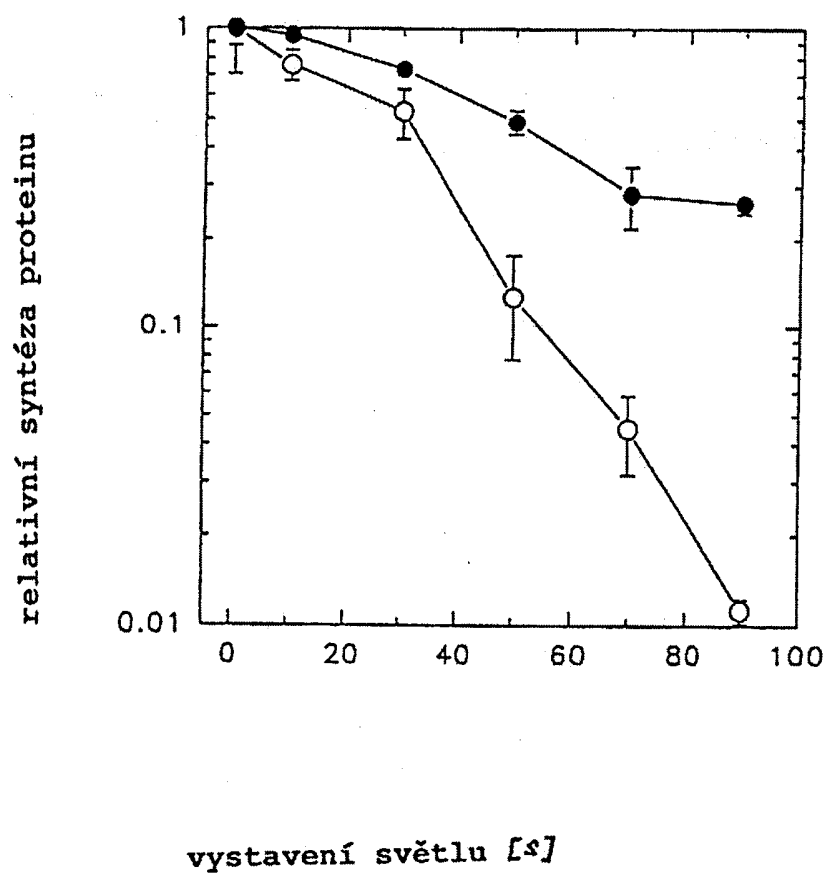
Obr. 1



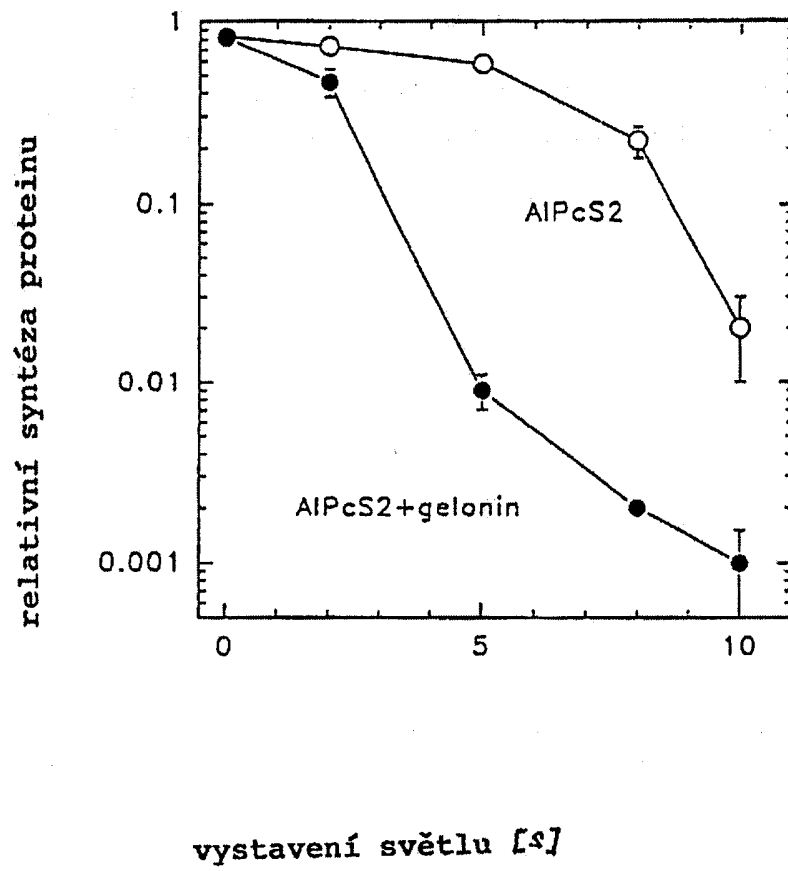
Obr. 2



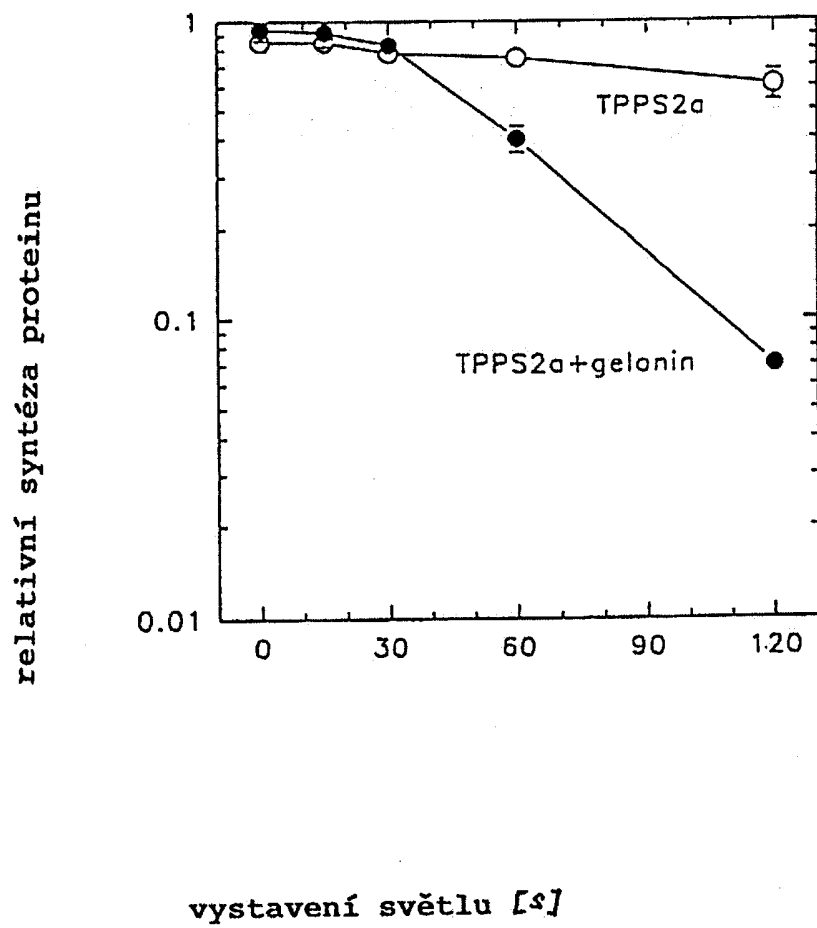
Obr. 3



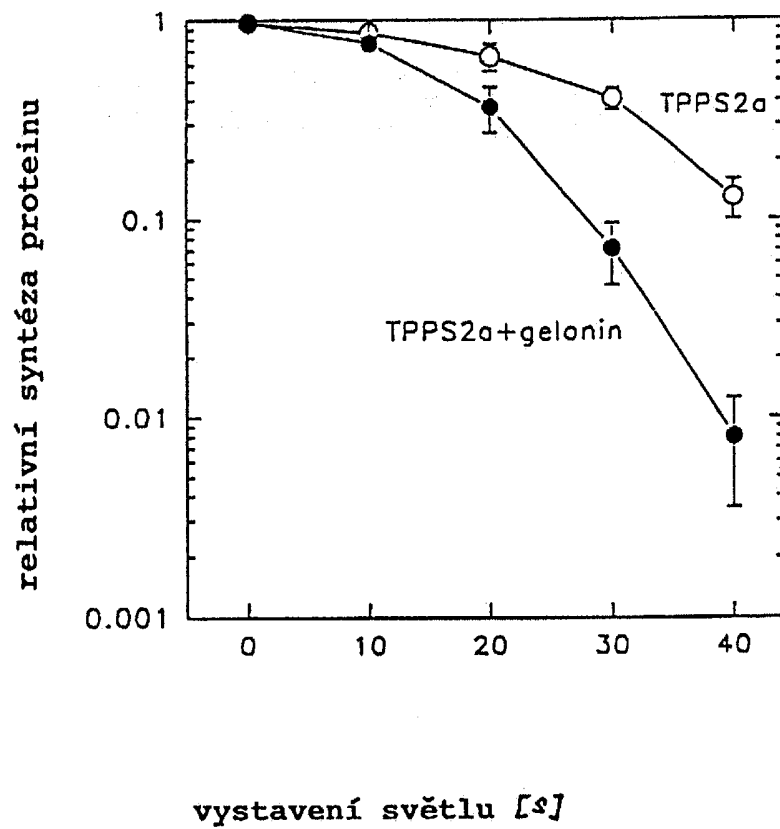
Obr. 4



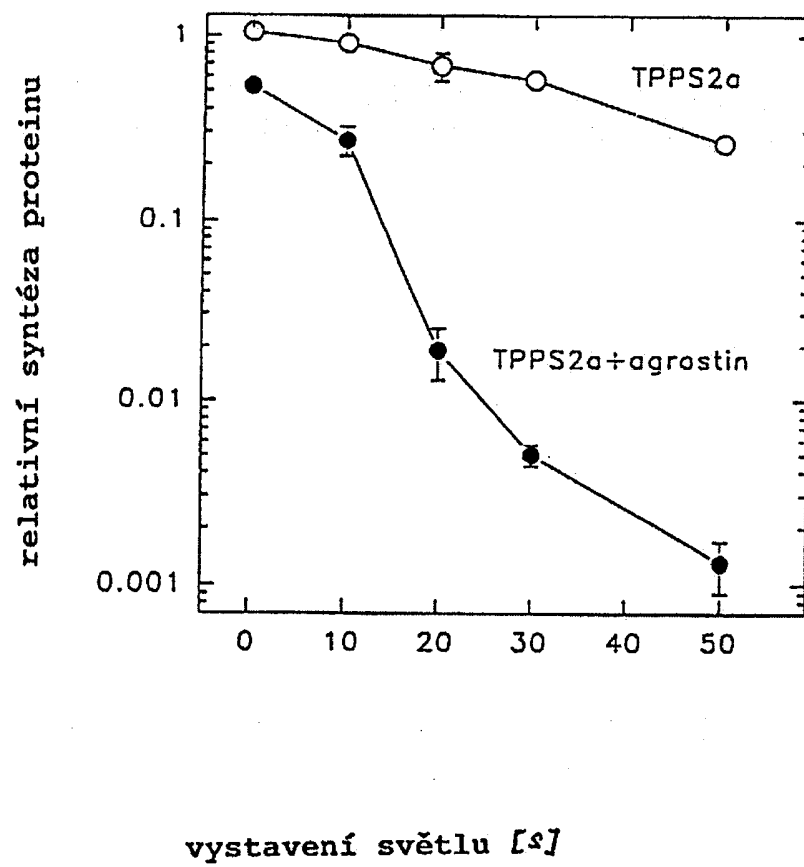
Obr. 5



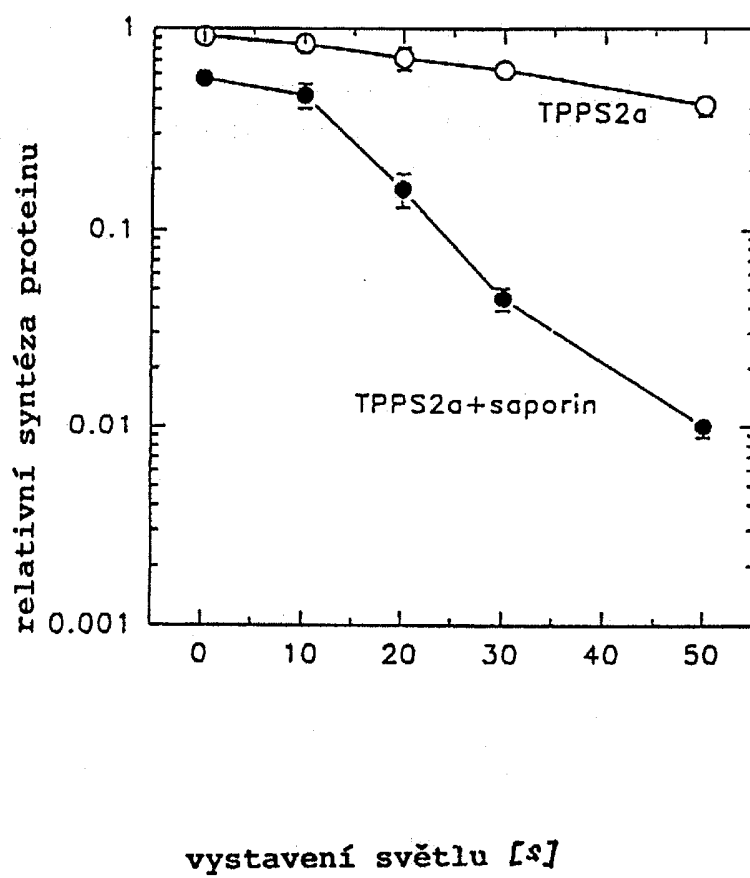
obr. 6



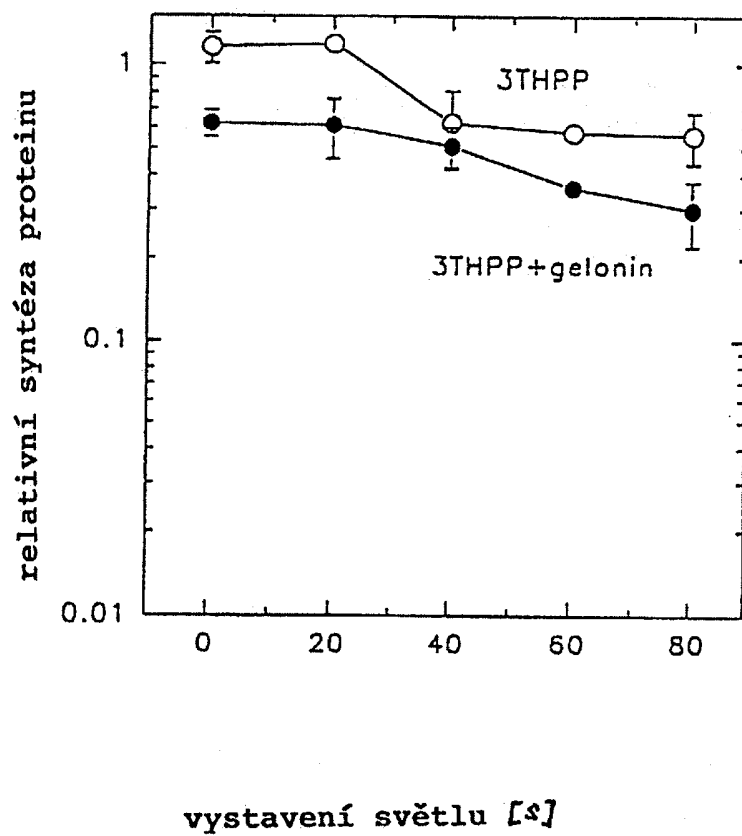
Obr. 7



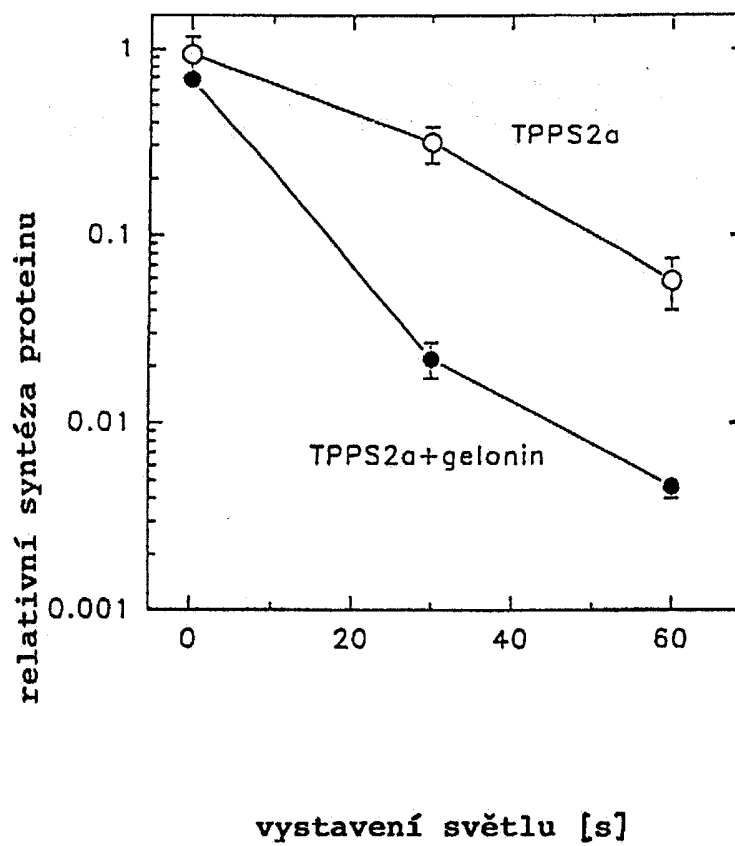
Obr. 8



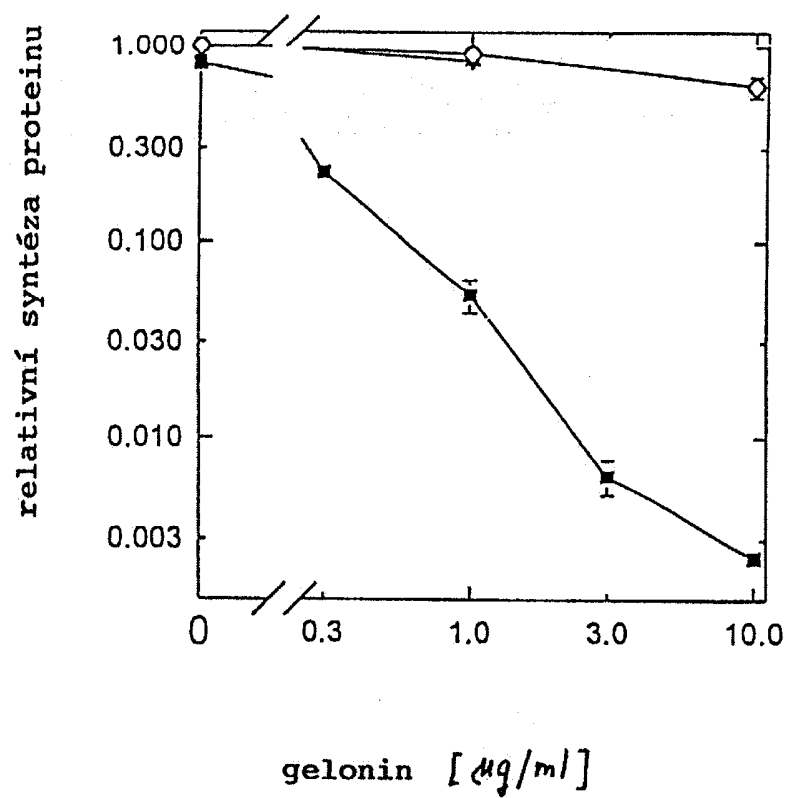
Obr. 9



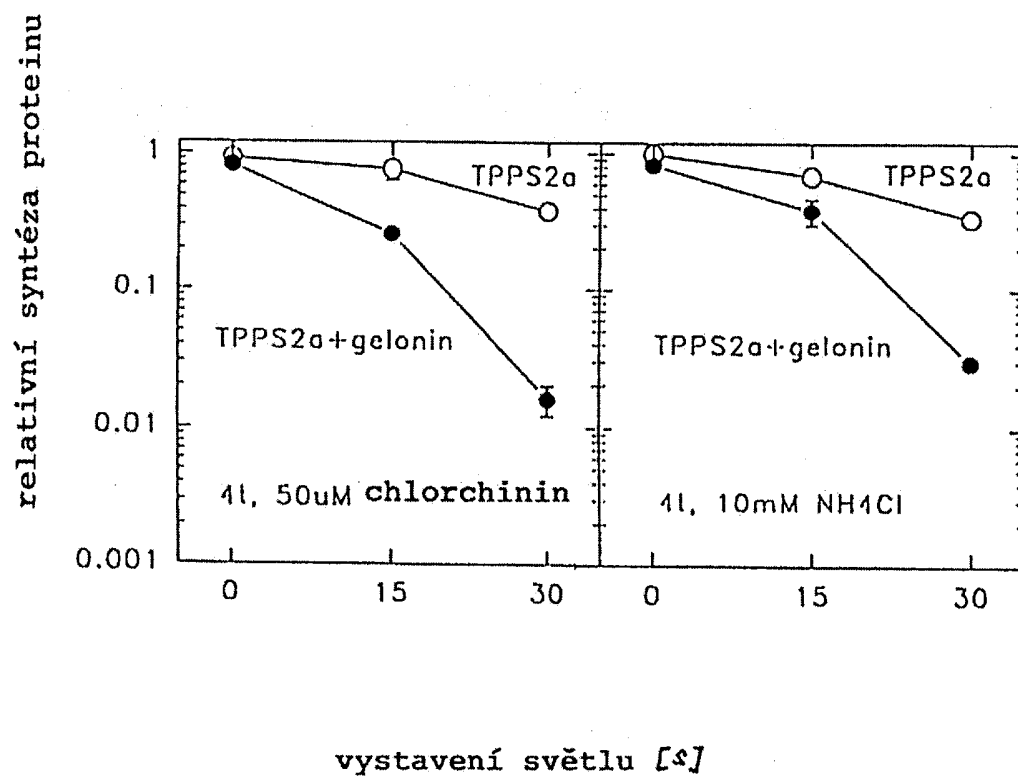
Obr. 10



Obr. 11



Obr. 12



Obr. 13

Konec dokumentu
