

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997 - 2848

(22) Přihlášeno: 08.03.1996

(30) Právo přednosti:

10.03.1995 GB 1995/9504948

18.12.1995 GB 1995/9525822

(40) Zveřejněno: 18.03.1998

(Věstník č. 3/1998)

(47) Uděleno: 22.10.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11.12.2002

(Věstník č. 12/2002)

(86) PCT číslo: PCT/GB96/00553

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 96/028412

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C 229/22

C 07 C 227/18

A 61 K 31/195

(73) Majitel patentu:

PHOTOCURE ASA, Oslo, NO;

(72) Původce vynálezu:

Giersckey Karl Erik, Oslo, NO;

Moan Johan, Oslo, NO;

Peng Qian, Oslo, NO;

Steen Harald, Oslo, NO;

Warloe Trond, Oslo, NO;

Bjorseth Alf, Oslo, NO;

(74) Zástupce:

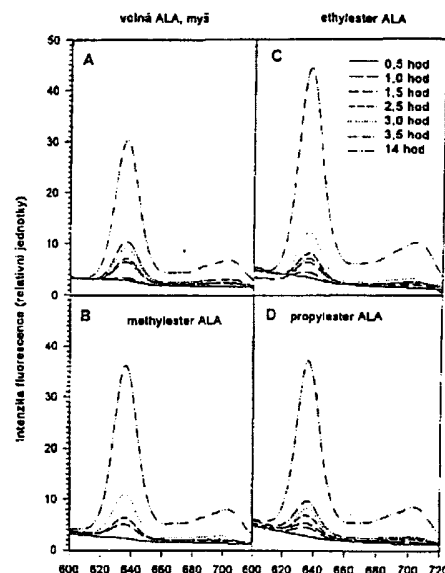
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Estery kyselin 5-aminolevulových a
farmaceutický prostředek s jejich obsahem**

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká sloučenin, kterými jsou estery kyseliny 5-aminolevulové nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli, včetně sloučenin vzorce (I) $(R^2)_2N-CH_2COCH_2-CH_2CO-OR^1$ (kde R^1 může představovat alkyl popřípadě substituovaný skupinami hydroxy, alkoxy, acyloxy, alkoxykarbonyloxy, amino, aryl, oxo nebo fluoro a popřípadě přerušeny atomy kyslíku, dusíku, síry nebo fosforu; a R^2 , který může být vzhledem k R^1 stejný nebo různý, znamená atom vodíku nebo skupinu R^1) pro použití při fotochemoterapii nebo diagnóze poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních tělesných povrchů a kůží pro provedení řešení.



Estery kyselin 5-aminolevulových a farmaceutický prostředek s jejich obsahem

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká derivátů kyseliny 5-aminolevulové (ALA) a zvláště esterů ALA pro použití jako fotosenzitizačních prostředků při fotochemoterapii nebo diagnóze.

10 Dosavadní stav techniky

Význam fotochemoterapie, nebo fotodynamické terapie (PDT), jak se také nazývá, jako techniky pro léčení různých abnormalit nebo poruch kůže nebo jiných epiteliálních orgánů nebo sliznice, zvláště karcinomů nebo prekarcinomových změn, stejně jako určitých nemaligních změn, například kožních onemocnění, jako je lupénka, v poslední době roste. Fotochemoterapie zahrnuje aplikaci fotosenzitizačních (fotochemoterapeutických) prostředků na postiženou oblast těla a následující vystavení fotoaktivujícímu světlu, aby došlo k aktivaci fotosenzitizačních prostředků a jejich převedení na cytotoxickou formu, přičemž postižené buňky jsou usmrceny nebo je zmenšen jejich proliferativní potenciál.

20

Je známa řada fotosenzitizačních prostředků, včetně zejména psoralenů, porfyrinů, chlorinů a ftaloxyaninů. Tyto látky se stanou toxické, když se vystaví světlu.

Fotosenzitizační léky mohou projevit své účinky řadou mechanismů, přímo nebo nepřímo. Tak například určité fotosenzitizační látky se stanou toxickými při aktivaci světlem, zatímco jiné působení za vytvoření látek, například oxidačních látek jako je singletový kyslík, nebo jiné kyslíkaté volné radikály, které jsou extrémně destruktivní pro buněčný materiál a biomolekuly, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Psoraleny jsou příkladem přímo působících fotosenzitizačních látek; po vystavení světlu vytvářejí addukty a zesílení mezi dvěma řetězci molekul DNA a tím inhibují syntézu DNA. Tato terapie má bohužel riziko v tom, že se mohou vyskytovat nežádoucí mutagenní a karcinogenní vedlejší účinky.

Tato nevýhoda může být odstraněna volbou fotosenzitizačních látek s alternativním, nepřímým způsobem účinku. Například porfyriny, které působí nepřímo vytvářením toxických kyslíkatých látek, nemají žádné vedlejší mutagenní účinky a jsou nejvýznamnějšími kandidáty pro fotochemoterapii. Porfyriny jsou přirozeně se vyskytující prekurzory při syntéze hemu. Konkrétně se hem produkuje, když se železo (Fe^{3+}) inkorporuje do protoporfyrinu IX (Pp) působením enzymu ferochelatázy. Pp je extrémně účinná fotosenzitizační látka, zatímco hem fotosenzitizační účinek nemá.

40

Jeden takový na porfyrinu založený lék, Photofrin, byl nedávno schválen jako fotosenzitizační látka při léčení určitých karcinomů. Hlavní nevýhoda je ta, že protože musí být podáván parenterálně, obecně intravenózně, způsobuje fotosenzitivaci kůže, která může trvat několik týdnů po i.v. injekci. Photofrin se skládá z velkých oligomerů porfyrinu a při místním podání nesnadno prochází kůží. Podobné problémy existují s jinými fotosenzitizačními látkami založenými na porfyrinu, jako jsou tzv. „hematoporfyrinové deriváty“ (Hpd), které byly rovněž ohlášeny pro použití při fotochemoterapii karcinomů (viz například S. Dougherty, J. Natl. Cancer Ins., 1974, 52; 1333; Kelly a Snell, J. Urol, 1976, 115: 150). Hpd je komplexní směs, která se získává působením kyseliny octové a sírové na hematoporfyrin a potom se acetylovaný produkt rozpouští v alkálii.

50

Pro odstranění těchto problémů se na fotochemoterapeutický potenciál zkoumaly prekurzory Pp. Výzkumy ukázaly, že zvláště prekurzory Pp, kyselina aminolevulová (ALA), je vhodná jako fotochemoterapeutický prostředek pro určité karcinomy kůže. ALA, která se vytváří ze sukcinyl CoA a glycinu při prvním kroku syntézy hemu je do omezené míry schopna pronikat kůží a vede

55

k lokalizovanému vytváření Pp; protože limitujícím krokem při syntéze hemu je působení ferochelátázy (metalační enzym), přebytek ALA vede k hromadění Pp, fotosenzitizačnímu prostředku. Místní aplikací na kožní tumory a vystavení tumorů světlu po několika hodinách může vést k prospěšnému fotochemoterapeutickému účinku (viz např. WO 91/01727), protože kůže pokrývající bazilomy a karcinomy dlaždicových buněk je snáze prostupná pro ALA než zdravá kůže, a protože koncentrace ferochelátázy je v kožních tumorech nízká, bylo zjištěno, že místní aplikace ALA vede k selektivně zvýšené produkci Pp v tumorech.

Zatímco však použití ALA představuje v oboru významný pokrok, fotochemoterapie ALA není vždy zcela uspokojivá. ALA není schopna penetrovat do všech tumorů a jiných tkání s dostatečnou účinností pro umožnění léčení široké škály tumorů nebo jiných podmínek a ALA má ve farmaceutických prostředcích také sklon k nestabilitě. Existuje tedy potřeba zlepšených fotochemoterapeutických prostředků. Předkládaný vynález si v rámci této potřeby klade konkrétní cíl poskytnout fototerapeutické prostředky, které jsou schopny lépe pronikat do tumoru a jiných abnormalit, a které mají zvýšený fototerapeutický účinek proti v oboru popsaným látkám.

Podstata vynálezu

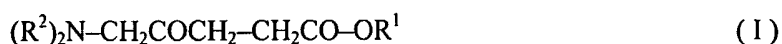
V jednom hledisku tedy předkládaný vynález poskytuje sloučeniny, které jsou estery kyselin 5-aminolevulových nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí pro použití při fotochemoterapii nebo diagnóze.

V esterech podle vynálezu může být 5-aminoskupina substituována nebo nesubstituována, ve druhém případě jde o estery ALA.

Sloučeninami pro použití podle vynálezu jsou zvláště estery 5-aminolevulových kyselin s popřípadě substituovanými alkanoly, tj. alkylestery nebo substituovanými alkylestery.

Databáze Xfire, položky 3060978, 5347132, 5499790, 5620924, 5633390, 5991317 a 6517740 (Beilstein); Cosmo Sogo Kenkyusho KK, Patent Abstracts of Japan, díl 16.; No. 156 (C-0930), 16. 4. 1992; EP-A-316179 (Tokuyama Soda KK); GB-A-2058077 (Hudson a další) a DE-A-2411382 (Boehringer Sohn Ingelheim) popisují alkylesterový derivát kyseliny 5-aminolevulové a jejich deriváty a soli a způsoby pro jejich přípravu.

Z jiného hlediska proto vynález poskytuje sloučeniny vzorce I,



kde R^1 může představovat alkyl popřípadě substituovaný skupinami hydroxy, alkoxy, acyloxy, alkoxykarbonyloxy, amino, aryl, oxo nebo fluoro a popřípadě přerušeny atomy kyslíku, dusíku, síry nebo fosforu; a R^2 je atom vodíku; přičemž jakákoli přítomná alkylová skupina obsahuje až do 10 atomů uhlíku a arylovou skupinou je fenyl nebo monocyklický 5 až 7 členný heteroaromatický kruh a jejich soli pro použití při fotochemoterapii nebo diagnóze.

Substituované alkylové skupiny R^1 mohou být mono nebo polysubstituované. Vhodné skupiny R^1 zahrnují například nesubstituovaný alkyl, alkoxyalkyl, hydroxyalkoxyalkyl, polyhydroxyalkyl, hydroxypolyalkylenoxyalkyl apod. Termín „acyl“, jako se zde používá, zahrnuje jak karboxylátovou, tak i karbonátovou skupinu, tedy acyloxylem substituované alkylové skupiny například zahrnují alkylkarbonyloxyalkyl. V těchto skupinách mají s výhodou alkylénové skupiny obsah uhlíkových atomů, definované pro alkylové skupiny níže. Výhodné arylové skupiny zahrnují fenyl a monocyklické 5 až 7 členné heteroaromatické látky, zvláště fenyl, přičemž tyto skupiny mohou být popřípadě samy substituovány.

Reprezentativní substituované alkylové skupiny R^1 zahrnují alkoxydimethylové, alkoxyethyllové a alkoxypropylové skupiny nebo acyloxydimethylové, acyloxyethyllové a acyloxypropylové skupiny, např. pivaloyloxydimethyl.

- 5 Výhodné sloučeniny pro použití podle vynálezu zahrnují sloučeniny, kde R^1 znamená nesubstituovanou alkylovou skupinu a/nebo každá skupina R^2 znamená atom vodíku.

Jak se zde používá, termín „alkyl“ zahrnuje jakýkoliv dlouhý nebo krátký řetězec, alifatickou nasycenou nebo nenasycenou, přímou nebo větvenou uhlovodíkovou skupinu. Nenasycené alkylové skupiny mohou být mono- nebo polynenasycené a zahrnují jak alkenylové, tak i alkynylové skupiny. Takové skupiny mohou obsahovat až do 40 atomů uhlíku. Zvláště výhodné jsou však alkylové skupiny obsahující až 10, např. 8, zvláště až 6, a zvláště výhodně až 4 atomy uhlíku.

- 15 Zvláště je třeba jmenovat methylester ALA, ethylester ALA, propylester ALA, hexylester ALA, heptylester ALA a oktylester ALA a jejich soli, které jsou výhodnými sloučeninami pro použití podle vynálezu.

Sloučeniny pro použití podle vynálezu je možno připravit s použitím standardních způsobů a postupů známých v oboru pro derivatizaci multifunkčních sloučenin a zvláště esterifikaci. Jak je v oboru známo, taková esterifikace sloučenin může zahrnovat chránění a odstranění ochranných skupin z příslušných skupin, takže pouze požadované skupiny zůstanou aktivní a účastní se za podmínek esterifikace reakce. Tak například mohou být v průběhu esterifikace chráněny substituenty substituovaných alkanolů, používaných pro přípravu esterů. Podobně skupina $N(R^2)_2$ sloučeniny, přinášející tuto skupinu do sloučenin vzorce I, může být v průběhu reakce chráněna a po reakci mohou být ochranné skupiny odstraněny. Takové postupy chránění/odstranění ochranných skupin jsou v oboru pro přípravu derivátů dobře známy; to platí konkrétně pro estery dobře známých aminokyselin, viz například Mcomie v „Protective Groups in Organic Chemistry“, Plenum, 1973 a T. W. Greene v „Protective Groups in Organic Chemistry“, Wiley-Interscience, 1981.

Jako příklad způsob přípravy sloučenin pro použití v rámci vynálezu lze uvést způsob, který zahrnuje vytvoření esteru karboxylové skupiny kyseliny 5-aminolevulové.

- 35 Další způsob přípravy sloučenin pro použití v rámci vynálezu zahrnuje reakci kyseliny 5-aminolevulové nebo jejího esterifikovatelného derivátu s alkanolem nebo jeho ester tvořícím derivátem.

Výhodný je způsob přípravy sloučenin vzorce I, který zahrnuje alespoň jeden z následujících kroků:

40

- (a) reakci sloučenin vzorce II



- 45 (kde X znamená odštěpitelnou skupinu, například hydroxylovou skupinu, atom halogenu nebo alkoxylovou skupinu nebo COX znamená skupinu anhydridu kyseliny a R^2 je jak definován výše)

se sloučeninou vzorce III

50



(kde R^1 je jak definováno výše); a

- (b) přeměnu sloučeniny vzorce I na její farmaceuticky přijatelnou sůl.

55

Reakci v kroku (a) je možno pohodlně provádět v rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel, jako je voda, aceton, diethylether, methylformamid, tetrahydrofuran apod. při teplotách až k teplotě varu směsi, výhodně při teplotách místnosti.

- 5 Podmínky esterifikačních reakcí budou záviset na použitém alkoholu a mohou být voleny tak, aby byl získán maximální výtěžek esteru. Protože esterifikační reakce jsou vratné rovnovážné reakce, reakční podmínky se mohou volit takovým způsobem, aby bylo dosaženo maximálního výtěžku esterového produktu. Těchto podmínek lze dosáhnout volbou rozpouštědla, které je schopno odstranit vodu vytvořenou při typické esterifikační reakci vytvoření azeotropní směsi
10 s vodou. příklady takových rozpouštědel jsou aromatické uhlovodíky nebo jiné látky schopné tvořit azeotropní směsi s vodou, například některé chlorované uhlovodíky, jako je chloroform. Pro vytváření nižších esterů 5-ALA může být posunuta reakční rovnováha na stranu esteru použitím velkého přebytku alkoholu. V případě jiných esterů může být rovnováha posunuta směrem k esterovému produktu použitím velkého přebytku kyseliny.

- 15 Esterifikační reakce jsou v oboru dobře známy, jak je například popisuje Saul Patai v „The chemistry of the carboxylic acids and esters“, (kap. 11, str. 505, Interscience 1069) a Houben Weyl, (Methoden der Organische Chemie, díl E5, „Karbonsäuren und Karbonsäuren-Derivate“, str. 504, Georg Thieme Verlag, 1985). Tvorba derivátů aminokyselin se popisuje v díle XI/2
20 stejné řady, Houben Weyl, Methoden der Organische Chemie, díl XI/2, „Stickstoffverbindungen“, str. 269, Georg Thieme Verlag, 1958).

Reakce se bude pohodlně provádět v přítomnosti katalyzátoru, například anorganické nebo organické kyseliny nebo prostředku vázajícího kyselinu, jako například báze.

- 25 Sloučeniny používané jako výchozí materiály jsou z literatury známy a v mnoha případech jsou komerčně dostupné nebo mohou být získány o sobě známými metodami. ALA je například dostupná od firmy Sigma nebo od firmy Photocure, Oslo, Norsko.

- 30 Jak je uvedeno výše, sloučeniny pro použití podle vynálezu mohou být ve formě farmaceuticky přijatelných solí. Takovými solemi jsou s výhodou kyselé adiční soli s fyziologicky přijatelnými anorganickými nebo organickými kyselinami. Vhodné kyseliny například zahrnují kyselinu chlorovodíkovou, bromovodíkovou, sírovou, fosforečnou, octovou, mléčnou, citronovou, vinnou, jantarovou, maleinovou, fumarovou a askorbovou. Postupy pro tvorbu solí jsou v oboru běžné.

- 35 Jak je uvedeno výše, sloučeniny pro použití podle vynálezu a jejich soli mají cenné farmakologické vlastnosti, totiž jsou fotosenzitizačními prostředky, čímž jsou použitelné jako fotochemoterapeutické prostředky.

- 40 Podobně jako ALA tyto sloučeniny působí zvýšením produkce Pp; po podání na požadované místo působení rozštěpí hydrolytické enzymy jako esterázy, přítomné v cílových buňkách, estery na výchozí ALA, která pak vstoupí do dráhy syntézy hemu a vede k vytváření Pp. Sloučeniny pro použití podle vynálezu však mají proti samotné ALA řadu výhod. Za prvé jsou tyto sloučeniny ve srovnání s ALA schopny lépe pronikat do kůže a jiných tkání; pronikání je jak hlubší, tak
45 i rychlejší. To je důležitá výhoda, zvláště pro místní podávání. Za druhé se ukázalo, že estery překvapivě více zvyšují produkci Pp než ALA; úrovně produkce Pp podání esterů ALA jsou vyšší než po podání samotné ALA. Za třetí vykazují sloučeniny pro použití v rámci vynálezu zlepšenou selektivitu k cílové tkáni, která má být léčena, tj. účinek na zvýšení produkce Pp je lokalizován do požadované cílové léze a nešíří se do obklopujících tkání. To je zvláště zřejmé
50 u tumorů. Konečně se zdá, že sloučenina podle vynálezu se lépe lokalizují do cílové tkáně po podání. To je zvláště důležité pro systémové aplikace, protože to znamená, že mohou být redukovány nebo odstraněny nežádoucí fotosenzitizační účinky, popisované v literatuře pro jiné fotosenzitizační látky založené na porfyrinu.

Dalším hlediskem předkládaného vynálezu je tedy poskytnutí farmaceutického prostředku, obsahující sloučeninu jak je popsáno výše, nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl, spolu s alespoň jedním farmaceutickým nosičem nebo pomocnou látkou.

- 5 V ještě dalším hledisku se také poskytuje použití sloučeniny jak je popsáno výše nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického prostředku pro použití ve fotochemoterapii a zvláště pro léčení poruch a abnormalit vnějších nebo vnitřních tělesných povrchů, které reagují na fotochemoterapii.
- 10 Abnormality a poruchy, které mohou být podle předkládaného vynálezu léčeny, zahrnují jakékoliv maligní, premaligní a nemaligní abnormality nebo poruchy vnímavé k fotochemoterapii, například tumory nebo jiné typy bujení, poruchy kůže jako je lupénka nebo keratózy působením světla, oděrky kůže a jiná onemocnění nebo infekce, například bakteriální, virové nebo houbové infekce, například infekce herpetickým virem. Vynález je zvláště vhodný pro
- 15 léčení onemocnění, poruch nebo abnormalit, kde se vytvářejí drobná poškození, na která mohou být prostředky přímo nanášeny (termín poškození se zde používá v širším smyslu a zahrnuje i tumory apod.). Vnitřní a vnější povrchy těla, které mohou být léčeny podle vynálezu, zahrnují kůži a jiné epitelální a serózní povrchy, včetně například sliznice, výstelky orgánů například respiračního, gastrointestinálního a urogenitálního traktu, žlázy s vývody, které se vyprazdňují na
- 20 tyto povrchy (např. játra, vlasové folikuly s mazovými žlázami, mléčné žlázy, slinné žlázy a semenné vajíčky). Navíc ke kůži zahrnují tyto povrchy například výstelku pochvy, endometria a urothelia. Tyto povrchy mohou zahrnovat také dutiny, vytvořené v těle po vyříznutí nemocné nebo karcinomové tkáně, například mozkové dutiny po odstranění tumorů, jako jsou gliomy.
- 25 Příklady takových povrchů tedy jsou : (i) kůže a spojivky; (ii) sliznice úst, hrtanu, jícnu, žaludku, střev, rekta a análního kanálu; (iii) výstelky nosních průchodů, nosních vedlejších dutin, nazofaryngu, trachey, bronchů a bronchiol; (iv) výstelky močových cest, močového měchýře a močové trubice; (v) výstelky pochvy, děložního krčku a dělohy; (vi) parietální a viscerální pohrudnice; (vii) výstelky peritoneální a pánevní dutiny a pochvy orgánů, obsažených v těchto
- 30 dutinách; (viii) dura mater a meningy; (ix) jakékoliv tumory v pevných tkáních, které mohou být zpřístupněny fotoaktivací světlu, například buď přímo při chirurgickém zákroku, nebo optickým vláknem, vloženým pomocí jehly.

- 35 Prostředky podle vynálezu mohou mít v oboru běžné složení s jedním nebo více fyziologicky přijatelnými nosiči nebo pomocnými látkami. Sloučeniny je možno podávat místně, orálně nebo systémově. Výhodné jsou místní prostředky, které zahrnují gely, krémy, masti, spreje, omývací roztoky, masti na rány, náplasti, mýdla, prášky, pesary, aerosoly, kapky a jakékoliv jiné v oboru běžné farmaceutické formy.

- 40 Masti a krémy mohou být například vytvořeny pomocí vodného nebo olejového základu s přídavkem vhodných zahušťovacích a/nebo gelujících prostředků. Omývací roztoky mohou být vytvořeny ve vodném nebo olejovém základu a budou obecně také obsahovat jeden nebo více emulgačních, dispergujících, suspendujících, zahušťujících nebo barvicích prostředků. Prášky mohou být vytvořeny pomocí jakéhokoliv vhodného práškového základu, Kapky mohou být
- 45 vytvořeny ve vodném nebo nevodném základu, který obsahuje také jeden nebo více dispergujících, rozpouštěcích nebo suspendujících prostředků. Aerosolové spreje se pohodlně nanášejí z tlakových balení s použitím vhodného hnacího plynu.

- 50 Prostředky mohou být alternativně ve formě přizpůsobené pro orální nebo parenterální podání, například intradermální, subkutánní, intraperitoneální nebo intravenózní injekcí. Alternativní farmaceutické formy tedy zahrnují prosté nebo potahované tablety, kapsle, suspenze a roztoky, obsahující aktivní složku, popřípadě spolu s jedním nebo více běžnými nosiči a/nebo diluenty, například s obilným škrobem, laktózou, sacharózou, mikrokrytalickou celulózą, stearamem hořečnatým, polyvinylpyrroludonem, kyselinou citronovou, kyselinou vinnou, vodou, směsí
- 55 voda/ethanol, voda/glycerol, voda/sorbitol, voda/polyethylenglykol, propylenglykolem, stearyl-

alkoholem, karboxymethylcelulózou nebo mastnými látkami, jako je tuhý tuk nebo jejich vhodné směsi.

- 5 Koncentrace výše popisovaných sloučenin v prostředcích závisí na povaze sloučeniny, složení, způsobu podávání a pacientovi a může být měněna nebo upravována podle potřeby. Obecně jsou však vhodné koncentrace v rozmezí 1 až 50 % hmotnostních. Pro terapeutické použití byly nalezeny jako vhodné koncentrace 10 až 50 % hmotnostních, například 15 až 30 % hmotnostních.

- 10 Po podání na povrch se vystaví ošetřená plocha světlu pro dosažení fotochemoterapeutického účinku. Doba po podání, po které dojde k vystavení světlu bude záviset na povaze sloučeniny a na formě podání. Obecně bude řádově 0,5 až 48 hodin, například 1 až 10 hodin.

Obecně bude použito ozáření v dávce 40 až 200 J/cm², např. 100 J/cm².

- 15 Vlnová délka světla použitého pro ozáření může být zvolena pro dosažení výraznějšího fotochemoterapeutického účinku. Obecně, pokud se při fotochemoterapii používají porfyriny, ozářejí se světlem s vlnovou délkou přibližně absorpčního maxima porfyriu. Například tedy v případě dřívějšího použití ALA při fotochemoterapii karcinomu kůže byly používány vlnové délky v oblasti 350 až 640 nm, zvláště 610 až 635 nm. Volbou širšího rozmezí vlnových délek ozáření, které zasahují mimo absorpčními maximum porfyriu, může však být fotosenzitizační účinek zvýšen. Aniž by bylo nutno vázat se teorií, je to pravděpodobně způsobeno skutečností, že když se Pp a jiné porfyriny vystaví světlu s volnými délkami uvnitř jejich absorpčního spektra, rozpadají se na různé fotoprodukty včetně zvláště fotoprotoporfyriu (PPp). PPp je chlorin a má výrazný fotosenzitizační účinek; jeho absorpční spektrum se rozprostírá směrem k delším vlnovým délkám nad vlnové délky, při kterých absorbuje Pp, tj. až do téměř 700 nm (Pp neabsorbuje téměř žádné světlo nad 650 nm). Při běžné fotochemoterapii používané vlnové délky tedy neexcitují PPp a není tedy dosaženo výhody jeho dalšího fotosenzitizačního účinku. Bylo zjištěno, že zvláště účinné je osvětlení vlnovými délkami světla v rozmezí 500 až 700 nm. Zvláště důležité je, aby záření obsahovalo vlnové délky 630 a 690 nm.

- 30 Sloučeniny podle vynálezu tedy mohou být použity pro fotochemoterapeutické léčení poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních poruch těla zahrnující podávání výše uvedeného prostředku postiženým povrchům a vystavení uvedených povrchů světlu, s výhodou světlu s vlnovými délkami v oblasti 300 až 800 nm, například 500 až 700 nm.

- 35 Způsoby ozáření různých oblastí těla, například lampami nebo lasery, jsou v oboru dobře známy (viz například Van den Bergh, Chemistry in Britain, květen 1986, str. 430–439).

- 40 Sloučeniny pro použití v rámci vynálezu mohou být v prostředku spolu a/nebo podávány spolu s jinými fotosenzitizačními prostředky, např. ALA nebo Photofrinem nebo s jinými aktivními složkami, které mohou zvýšit fotochemoterapeutický účinek. Mohou být například s prospěchem zahrnuty chelatační prostředky, aby došlo ke zvýšení akumulace Pp; chelatace železa chelatačními prostředky zabrání jeho inkorporaci do Pp za vytvoření hemu působením enzymu ferochelatázy, což vede k vytváření Pp. Fotosenzitizační účinek se tedy zvýší.

- 45 Zvláště vhodná v tomto ohledu jsou chelatační činidla na bázi aminopolykarboxylové kyseliny, včetně kteréhokoliv z chelatačních činidel, popsanych v literatuře pro detoxifikaci kovů nebo pro chelataci paramagnetických kovových iontů v zobrazovacích kontrastních prostředcích pro magnetickou rezonanci. Zvláště je třeba zmínit EDTA, CDTA (kyselina cyklohexandiamintetraoctová), DTPA a DOTA. Výhodnou sloučeninou je EDTA. Pro dosažení chelatačního účinku na železo mohou být použity desferiocamin a jiné siderofory, například ve spojení s chelatačními činidly na bázi aminopolykarboxylové kyseliny, jako je EDTA.

- 55 Chelatační prostředek může být vhodně použit v koncentraci 1 až 20 % hmotnostních, například 2 až 10 % hmotnostních.

Dále bylo zjištěno, že příznivý účinek při zvýšení fotochemoterapeutického účinku mohou mít prostředky napomáhající pronikání z povrchu, zvláště dialkylsulfoxidy, jako je dimethylsulfoxid (DMSO). To se popisuje detailně v naší související přihlášce No. PCT/GB 94/01951.

5 Prostředkem napomáhajícím penetraci do povrchu může být jakákoliv prostředek napomáhající penetraci do kůže, popsany ve farmaceutické literatuře, například HPE-101 (firma Hisamitsu), DMSO nebo jiné dialkylsulfoxidy, zvláště n-decylmethylsulfoxid (NDMS), dimethylsulfacetamid, dimethylformamid (DMFA), dimethylacetamid, glykoly, různé deriváty pyrrolidonu
10 (Woodford a další, J. Toxicol. Cut & Ocular Toxicology, 1986, 5: 167 až 177), a Azone® (Stoughtona další, Drug Dpv. Ind. Pharm. 1983, 9: 725 až 744) nebo jejich směsi.

DMSO však má řadu výhodných účinků a výrazně se mu dává přednost. Navíc k účinků a výrazně se mu dává přednost. Navíc k účinku napomáhajícímu penetraci do povrchu (DMSO je
15 zvláště účinný při zvětšení hloubky pronikání aktivního prostředku do tkáně) má tedy DMSO antihistaminové a protizánětlivé účinky. Navíc bylo zjištěno, že DMSO zvyšuje aktivitu enzymů ALA-syntázy a ALA-dehydrogenázy (enzymy, které vytvářejí a kondenzují ALA na porfocilinogen) a tím zvyšuje tvorbu aktivní formy, Pp. Prostředek pro zvýšení pronikání z povrchu může být výhodně přítomen v rozmezí koncentrací od 2 do 50 % hmotnostních,
20 například přibližně 10 % hmotnostních.

Podle léčeného stavu a podle povahy prostředku mohou být sloučeny pro použití v rámci vynálezu podávány společně s takovými dalšími případnými prostředky, například v jediném
25 prostředku, nebo mohou být podávány postupně nebo odděleně. V mnoha případech může být ovšem získán zvláště výhodný fotochemoterapeutický účinek předchozím působením látky podporující povrchovou penetraci v odděleném kroku, před podáním sloučenin pro použití v rámci vynálezu. Dále může být v některých situacích prospěšné předchozí ošetření látkami pomáhajícími penetraci do povrchu, následované podáváním fotochemoterapeutického prostředku ve spojení s látkou napomáhající penetraci do povrchu. Pokud se látka pomáhající penetraci do
30 povrchu použije pro předběžné ošetření, může být použita ve vysokých koncentracích, například až do 100 % hmotnostních. Jestliže se použije takového kroku předběžného ošetření, fotochemoterapeutický prostředek může být dále podáván až několik hodin po předběžném ošetření, například v intervalu 5 až 60 minut po předběžném ošetření.

35 Z dalšího pohledu tedy vynález poskytuje produkt, obsahující sloučeninu jak byla popsána výše nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl spolu s alespoň jednou látkou podporující penetraci do povrchu a popřípadě jedním nebo více chelatačními prostředky jako kombinovaný prostředek pro současné, oddělené nebo postupné použití při léčení poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních povrchů těla, které jsou vnímavé vůči fotochemoterapii.

40 Alternativně dalšího hledisko vynálezu také poskytuje kit pro použití při fotochemoterapii poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních tělesných povrchů, který obsahuje:

- a) první nádobku, obsahující výše popsanou sloučeninu nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl,
45
- b) druhou nádobku, obsahující alespoň jeden prostředek podporující penetraci do povrchu; a popřípadě
- c) jeden nebo více chelatačních prostředků, obsažených buď v uvedené první nádobce, nebo ve
50 třetí nádobce

Tam, kde se prostředek napomáhající penetraci do povrchu aplikuje v odděleném kroku předběžného ošetření, může být nanášen ve vyšších koncentracích, například až do
55 100 % hmotnostních.

Je zřejmé, že způsob léčení s použitím výše popsaných sloučenin nezbytně fluorescence léčené poruchy nebo abnormality. Zatímco intenzita této fluorescence může být použita pro odstranění abnormálních buněk, umístění fluorescence může být použito pro zviditelnění velikosti, rozsahu a umístění abnormality nebo poruchy. To je možné díky překvapivé schopnosti esterů ALA lokalizovat se přednostně do nenormální tkáně.

Takto identifikovaná abnormalita nebo porucha nebo na místě vyšetření potvrzená může být léčena alternativními terapeutickými postupy, například chirurgickým nebo chemickým způsobem, nebo způsobem léčení podle vynálezu pokračujícím vytvářením fluorescence nebo další aplikací sloučenin podle vynálezu na vhodné místo. Je zřejmé, že diagnostické postupy mohou vyžadovat nižší úroveň fluorescence pro zviditelnění, než které se používají při terapeutickém ošetření. Obecně jsou tedy výhodné koncentrace 1 až 50 %, například 1 až 5 % hmotnostních. Místa, metody a způsoby podávání byly vzhledem k terapeutickým použitím uvažovány dříve a jsou aplikovatelné také na zde popsaná diagnostická použití. Sloučeniny pro použití v rámci vynálezu mohou být také použity pro diagnostické způsoby *in vitro*, například pro vyšetření buněk, obsažených v tělesných tekutinách. vyšší míra fluorescence spojená s nenormální tkání může být výhodným znakem abnormality nebo poruchy. Tento způsob je vysoce citlivý a může být použit pro časnou detekci abnormalit nebo poruch, například karcinomu močového měchýře nebo plic vyšetřením epitelálních buněk ve vzorcích moči nebo sputa. S užitkem mohou být navíc k moči a sputu použity pro diagnózu další tělesné tekutiny, včetně krve, semene, slin, spinální tekutiny apod. Mohou být rovněž vyhodnocovány vzorky tkání nebo preparáty, například tkáň z biopsie nebo vzorky kostní dřeně. Předkládaný vynález se tedy rozšiřuje na použití sloučenin podle vynálezu nebo jejich solí pro diagnózu výše uvedenými způsoby pro fotochemoterapii, a výrobky a kity pro provádění uvedené diagnózy.

Další aspekt vynálezu se týká způsobu diagnózy *in vitro* abnormalit nebo poruch testováním vzorku tělesné tekutiny nebo tkáně pacienta, přičemž uvedený způsob zahrnuje alespoň následující kroky:

- i) smísení uvedené tělesné tekutiny nebo tkáně s výše popsanou sloučeninou,
- ii) vystavení uvedené směsi světlu,
- iii) určení míry fluorescence, a
- iv) porovnání míry fluorescence s kontrolními hodnotami.

Vynález bude detailněji popisován v následujících neomezuujících příkladech, ke kterým se vztahují připojené obrázky, jejich popis se uvádí dále.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje intenzitu fluorescence (relativní jednotky proti vlnové délce (nm) PpIX v normální kůži myši po místním podání

- (A) volného ALA
- (B) methylesteru ALA
- (C) ethylesteru ALA
- (D) propylesteru ALA

po 0,5, 1, 1,5, 2,5, 3, 3,5 a 14 hodinách po podání;

- Obr. 2 ukazuje distribuci PpIX měřenou jako intenzitu fluorescence (relativní jednotky proti vlnové délce (nm)) v mozku, dermis, uchu, játrech a svalu 14 hodin po místním podáním na normální kůži myši:
- 5 (A) volného ALA
(B) methylesteru ALA
(C) ethylesteru ALA
(D) propylesteru ALA;
- 10 Obr. 3 ukazuje fluorescenci PpIX (intenzita fluorescence, relativní jednotky proti vlnové délce (nm)) v kůži myši 15 min, 1, 4 a 10 hodin po intraperitoneální injekci methylesteru ALA (150 mg/kg);
- Obr. 4 ukazuje fluorescenci PpIX (intenzita fluorescence, relativní jednotky proti vlnové délce (nm)) (A) 1,5 hodiny a (B) 4 hodiny po místním podání methylesteru ALA na lézi karcinomu bazálních buněk (BCC) kůže pacienta člověka (– tumor; – – – normální kůže);
- 15
- Obr. 5 ukazuje fluorescenci PpIX (intenzita fluorescence, relativní jednotky proti vlnové délce (nm)) (A) 1,5 hodiny a (B) 4 hodiny po místním podání ethylesteru ALA karcinomu bazálních buněk (BCC) kůže pacienta člověka (– tumor; – – – normální kůže);
- 20
- Obr. 6 ukazuje fluorescenci PpIX (intenzita fluorescence, relativní jednotky proti vlnové délce (nm)) (A) 1,5 hodiny a (B) 4 hodiny po místním podání propylesteru ALA karcinomu bazálních buněk (BCC) kůže pacienta člověka (– tumor; – – – normální kůže);
- 25
- Obr. 7 ukazuje fluorescenci PpIX (intenzita fluorescence, relativní jednotky proti vlnové délce (nm)) (A) 1,5 hodiny a (B) 4 hodiny po místním podání ALA karcinomu bazálních buněk (BCC) kůže pacienta člověka (– tumor; – – – normální kůže);
- 30
- Obr. 8 ukazuje měření tvorby PpIX po místním podání methylesteru ALA v lidském BCC a obklopující normální kůži CDD mikroskopii biopsií (A) grafické vyjádření intenzity fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie;
- Obr. 9 ukazuje měření produkce PpIX po místní aplikaci ALA u lidského BCC a sousedící normální pokožky CDD mikroskopii biopsií (A) grafické vyjádření ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie;
- 35
- Obr. 10 ukazuje fluorescence PpIX (intenzita fluorescence v relativních jednotkách proti vlnové délce (nm)) 24 hodin po místním podání methylesteru ALA na poškození BCC a na normální kůži pacienta člověka.
- 40
- Obr. 11 ukazuje fluorescence PpIX (intenzita fluorescence v relativních jednotkách proti vlnové délce (nm)) 24 hodin po místním podání ALA na poškození BCC a na normální kůži pacienta člověka.
- 45
- Obr. 12 ukazuje měření produkce PpIX 4,5 h po místní aplikaci methylesteru ALA u lidského BCC CDD mikroskopii biopsií (A) grafické znázornění ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie.
- 50
- Obr. 13 ukazuje měření produkce PpIX 4,5 h po místní aplikaci methylesteru ALA u lidské normální kůže CCD mikroskopii biopsií (A) grafické znázornění ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie.

Obr. 14 ukazuje měření produkce PpIX 24 h po místní aplikaci methylesteru ALA u lidského BCC CCD mikroskopii biopsií (A) grafické znázornění ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie.

- 5 Obr. 15 ukazuje měření produkce PpIX 24 h po místní aplikaci methylesteru ALA u lidské normální kůže CCD mikroskopii biopsií (A) grafické znázornění ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie.

- 10 Obr. 16 ukazuje měření produkce PpIX 24 h po místní aplikaci volné ALA u lidské BCC CCD mikroskopii biopsií (A) grafické znázornění ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie.

- 15 Obr. 17 ukazuje měření produkce PpIX 24 h po místní aplikaci volné ALA u lidské normální kůže CCD mikroskopii biopsií (A) grafické znázornění ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie.

- 20 Obr. 18 ukazuje měření produkce PpIX 4,5 h po místní aplikaci volné ALA a 20 % DMSO u lidského BCC CCD mikroskopii biopsií (A) grafické znázornění ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie.

- Obr. 19 ukazuje měření produkce PpIX 4,5 h po místní aplikaci volné ALA a 20 % DMSO u lidské normální kůže CCD mikroskopii biopsií (A) grafické znázornění ukazující intenzitu fluorescence proti hloubce (μm) a (B) mikrofotografie.

- 25 Obr. 20 ukazuje časový průběh (intenzita fluorescence v relativních jednotkách proti času (hodiny)) fluorescence, indukované methylesterem ALA (PpIX) v kůži myši po místní aplikaci methylesteru ALA samotného (—●—), methylesteru ALA + DMSO (—▲—), methylesteru ALA + desferioxaminu (DF) (—■—) nebo methylesteru ALA + DF a DMSO (—▼—). Každý bod je střední hodnota měření od alespoň tří myší;

- 30 Obr. 21 ukazuje fluorescenční fotografie kůže myši 1 h po místní aplikaci volné ALA samotné (A), methylesteru ALA (B), ethylesteru ALA (C) a propylesteru ALA (D), na kterých je vidět fluorescence epidermis (Ep), epiteliálních vlasových folikulech a mazových žlázách (šipky), ale ne v dermis (De). Původní zvětšení je 250 x.

- 35 Obr. 22 je graf ukazující relativní objem tumoru proti času (dny) po ošetření lidského karcinomu tlustého střeva WiDr, transplantovaného podkožně nahé myši ALA nebo methylesterem ALA + DF; (—▲—) kontrola; (—▼—) samotný DF; (—■—) ALA + DF + DMSO; (—●—) methylester ALA + DF + DMSO.

- 40 Obr. 23 ukazuje poměry fluorescence mezi poškozením BCC a okolní normální kůží po místní aplikaci ALA nebo jejích esterů.

45 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

- 50 Příprava hydrochloridu methyl-5-aminolevulátu

Do 500 ml skleněného reaktoru s obsahem 200 ml methanolu byl přidán 1 g hydrochloridu kyseliny 5-aminolevulové a 1 kapka koncentrované HCl. Reakční směs potom byla přes noc míchána při 60 °C. Postup esterifikace byl sledován ^1H -NMR. Přebytek methanolu byl odstraněn

destilací a produkt byl pod vakuem dále sušen při 30 až 40 °C za poskytnutí hydrochloridu methyl-5-aminolevulátu. Struktura byla potvrzena pomocí $^1\text{H-NMR}$ v DMSO-d_6 .

5 Příklad 2

Příprava hydrochloridu ethyl-5-aminolevulátu (ethylesteru ALA)

Jeden gram hydrochloridu kyseliny 5-aminolevulové byl přidán do 200 ml suchého ethanolu, obsahujícího 1 až 2 kapky koncentrovaného chlorovodíku v 250 ml skleněném reaktoru, opatřeném míchadlem, zpětným chladičem a teploměrem. Esterifikace byla prováděna přes noc pod zpětným chladičem (70 až 80 °C). Po ukončení reakce byl ethanol odstraněn pod vakuem. Nakonec byl produkt sušen pod vysokým vakuem při 30 až 40 °C za poskytnutí 0,94 g hydrochloridu ethyl-5-aminolevulátu. Potvrzení struktury bylo provedeno pomocí $^1\text{H-NMR}$ v DMSO-d_6 .

Příklad 3

20 Příprava hydrochloridu n-propyl-5-aminolevulátu (propylesteru ALA)

Ve 100 ml suchého n-propanol, obsahujícího 1 až 2 kapky koncentrovaného chlorovodíku bylo v 250 ml skleněném reaktoru opatřeném míchadlem, zpětným chladičem a teploměrem rozpouštěno 0,5 g hydrochloridu kyseliny 5-aminolevulové. Reakční směs byla při 70 až 80 °C
25 míchána přibližně 20 hodin. Po přeměně veškeré kyseliny 5-aminolevulové ne její n-propylester (sledováno pomocí $^1\text{H-NMR}$) byl přebytek propanolu odstraněn a produkt sušen pod vysokým vakuem (< 100 Pa) při teplotě 40 až 50 °C. Reakce poskytla 0,49 g hydrochloridu propyl-5-aminolevulátu. Struktura byla potvrzena $^1\text{H-NMR}$ v DMSO-d_6 .

30

Příklad 4

Příprava hydrochloridu n-hexyl-5-aminolevulátu (hexylesteru ALA)

35 2 g hydrochloridu kyseliny 5-aminolevulové bylo rozpuštěno ve 25 g suchého n-hexanolu s přidáním 5 až 6 kapkami koncentrovaného chlorovodíku v 50 ml skleněném reaktoru, opatřeném zpětným chladičem a teploměrem. Reakční směs byla udržována přibližně 3 dny při 50 až 60 °C. Přebytek n-hexanolu byl odstraněn pod vakuem a produkt nakonec sušen pod vysokým vakuem za poskytnutí 2,4 g hydrochloridu n-hexyl-5-aminolevulátu. Struktura byla
40 potvrzena spektroskopií $^1\text{H-NMR}$ v DMSO-d_6 .

Příklad 5

45 Příprava hydrochloridu n-heptyl-5-aminolevulátu (heptylester ALA)

Ke 30 g n-heptanolu, obsahujícím 5 kapek koncentrovaného chlorovodíku bylo ve 100 ml skleněném reaktoru, opatřeném míchadlem, zpětným chladičem a teploměrem, přidáno 0,5 g hydrochloridu kyseliny 5-aminolevulové. Po rozpuštění veškeré kyseliny 5-aminolevulové byla
50 reakční směs míchána při 70 až 80 °C přibližně 48 hodin. Po převedení kyseliny 5-aminolevulové ne její n-heptylester (sledováno pomocí $^1\text{H-NMR}$) byl odstraněn přebytek alkoholu a produkt sušen pod vysokým vakuem (< 100 Pa) při 70 °C. Reakce poskytla 1,5 g hydrochloridu n-heptyl-5-aminolevulátu. Struktura byla potvrzena pomocí $^1\text{H-NMR}$ v DMSO-d_6 .

55

Příklad 6

Příprava hydrochloridu n-oktyl-5-aminolevulátu (oktylester ALA)

- 5 1 g hydrochloridu kyseliny 5-aminolevulové byl přidán do 30 g suchého n-oktanolu obsahujícího 5 až 6 kapek koncentrovaného chlorovodíku v 50 ml skleněném reaktoru, opatřeném zpětným chladičem, míchadlem a teploměrem, Reakční směs byla míchána přibližně dva dny při 65 až 70 °C. Přebytek n-oktanolu byl odstraněn pod vakuem a produkt byl nakonec sušen pod vysokým vakuem za poskytnutí 1,5 g hydrochloridu n-oktyl-5-aminolevulátu.
- 10 Struktura byla potvrzena spektroskopií ^1H -NMR v DMSO- d_6 .

Příklad 7

- 15 Farmaceutický prostředek

- Smísením aktivní složky, tj. ALA, methylesteru ALA, ethylesteru ALA nebo propylesteru ALA (připravených podle příkladů 1-3) s krémovou bází „Unguentum Merck“ (dostupnou od firmy Merck), která se skládá z oxidu křemičitého, parafinového oleje, bílé vazelíny, cetostearolu, poly-
- 20 sorbanu 40, glycerolmonostearátu směsi rostlinných mastných kyselin Miglyol® 812, polypropylenglykol a čištěné vody, byly připraveny 20 % krémy. Byly rovněž připraveny odpovídající krémy obsahující navíc 3 až 20 % DMSO.

- 25 Příklad 8

Stanovení produkce protoporphyrinu IX v kůži myši CCD mikroskopií biopsií

- Komerční krém typu olej ve vodě, obsahující (v koncentraci 20 % hmotnostních) jednu
- 30 z chemikálií (volná ALA, methylester ALA, ethylester ALA a propylester ALA, viz příklad 1) byl místně aplikován na normální kůži nahé myši nu/nu po dobu 0,5, 1, 3 a 6 hodin a potom byla provedena biopsie, která byla vyhodnocena pomocí mikroskopické fluorescenční fotometrie s použitím termoelektricky chlazené CCD kamery (charge coupled device). Výsledky ukazují, že volná ALS a její tři esterové deriváty jsou absorbovány kožní tkání, esterifikované deriváty ALA
- 35 se v kůži deesterifikují a 0,5 h po místní aplikaci se přeměňují na protoporphyrin IX (PpIX). Intenzita fluorescence PpIX v kůži stoupla s dobou aplikace a maximální fluorescence byla ve všech případech pozorována přibližně 6 hodin (poslední sledovaný čas) po nanesení.

- 40 Příklad 9

Měření produkce protoporphyrinu IX v kůži myši systémem, založeným na optickém vlákně

- Cílem této studie byl výzkum vytváření fluorescence porfyrinů, indukované esterifikovaným
- 45 esterem ALA v normální kůži nahé myši *in vivo* po místním nebo systémovém podání esterových derivátů ALA.

Materiály a metody

- 50 Chemikálie. Methyl-, ethyl- a propylestery kyseliny 5-aminolevulové (ALA) ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{C}-\text{OOCH}_2-\text{CH}_2\text{COO}-\text{R}$; R může být CH_3 , $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) byly připraveny podle popisu v příkladech 1 až 3 laboratoří Norsk Hydro Research Center (Porsgrunn, Norsko). Volný hydrochlorid ALA a desferioxamin mesylát (DF) byly získány od firmy Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo, USA). Dimethylsulfoxid (DMSO) byl získán od firmy Janssen Chimica
- 55 (Geel, Belgie). Komerční krémy olej-voda (Unguentum Merck, Darmstadt, Německo),

obsahující 20 % hmotnostních jednoho z esterových derivátů ALA, 20 % hmotnostních volné ALA, 20 % hmotnostních methylesteru ALA + 5 % hmotnostních DF, 20 % hmotnostních methylesteru ALA + 20 % hmotnostních DMSO, nebo 20 % hmotnostních methylesteru ALA + 5 % hmotnostních DF a 20 % hmotnostních DMSO byly čerstvě připraveny před použitím. Všechny krémy byly vyrobeny lékárnou v nemocnici Norwegian Radium Hospital. Pro intraperitoneální injekce byla ALA a její methylester čerstvě rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. všechny další použité chemikálie byly komerčně dostupné s nejvyšší čistotou.

Zvířata. Samice bezthymové nahé myši Balb/c nu/nu byly získány ze zvěřince Animal Laboratory nemocnice Norwegian Radium Hospital a byly udržovány za specifických bezpatogenních podmínek. Na začátku experimentů byly myši staré 6 až 7 týdnů a vážily 18 až 24 g. V průběhu experimentu byly v kleci vždy tři myši, přičemž klec měla autoklávanané víko a byla umístěna v temné místnosti.

Postup ošetření. Jeden z krémů byl natřen u každé myši na normální kůži v oblasti pravého boku a překryt polopropustným obvazem (3M, před fluorescenčními měřeními in situ nebo mikroskopickým fluorescenčním zobrazováním po biopsiích. Na přibližně 2,25 cm² kůže bylo nanášeno přibližně 0,2 g krému. V případě i. p. injekce byla ALA nebo její methylester podána myši v dávce 150 mg/kg. Pro každé pokusné podmínky bylo použito alespoň tři myši.

Fluorescenčně-spektroskopická měření in situ. Bylo použito fluorescenčního spektrometru Perkin Elmer LS-50, vybaveného fotonásobičem citlivým k červené barvě (Hamamatsu R 928). Jako zdroj světla v přístroji použita pulzní xenonová oblouková lampa s fázovou detekcí, takže mohla být fluorescence snadno měřena. Část excitačního paprsku (pro fluorescenční měření nastavena vlnová délka na 408 nm) byla pro aplikaci na pokusný subjekt pomocí ruční sondy odražena pomocí zrcátka do křemenného multimodového optického vlákna s průměrem jádra 600 μm (No. 3501 393, Dornier Medizintechnik, GmbH, Germering, Německo). Emise v oblasti vlnových délek 550 až 750 nm byla měřena pomocí v sondě umístěných vláken, určených pro shromažďování emisních informací.

Fluorescenční mikroskopie. Po místní aplikaci krémů na kůži myši byla v určitých časech (jak je uvedeno výše) provedena biopsie kůže a zmrazené části tkáně byly rozřezány kryostatem na tloušťku 8 μm. Byla provedena fluorescenční mikroskopie s použitím mikroskopu Axioplan (Zeiss, Německo) se 100 W rtuťovou lampou. Fluorescenční obrazy byly zaznamenány světlo-citlivou termoelektricky chlazenou CCD kamerou (rozlišení: 385 x 578 bodů s dynamickým rozsahem 16 bitů na bod) (Astromed CCD 3200, Cambridge, Anglie) v vytištěné obrázky byly pořízeny na videotiskárně (Sony multiscan video printer UP-930). Kombinace filtrů, použitá pro detekci fluorescence porfyrinu sestávala z excitačního filtru 390 až 440 nm, rozdělovače paprsku (beam splitter) 460 nm a emisního filtru > 600 nm.

Výsledky

Fluorescence PpIX byla měřena in situ systémem využívajícím optických vláken u normální kůže nahé myši 0,5, 1, 1,5, 2,5, 3, 3,5 a 14 hodin po místní aplikaci volné ALA nebo jednoho z jejích esterových derivátů, jak je popsáno výše. Jak je ukázáno v obr. 1, fluorescence PpIX se vytvořila již 1 hodinu po místní aplikaci u všech použitých derivátů, zatímco po místní aplikaci volné ALA byla fluorescence pozorována 1,5 hodin po aplikaci. Maximální intenzita fluorescence byla zjištěna ve všech případech 14 hodin po aplikaci, ale fluorescence PpIX indukovaná v kůži estery ALA byla silnější, než fluorescence z volné ALA. Navíc, jak lze vidět na obr. 2, 14 hodin po aplikaci nebyla detekována v jiných oblastech kůže a v nitřních orgánech včetně ucha, svalů, mozku a jater žádná fluorescence PpIX, indukovaná estery ALA. V případě volné ALA však byla pozorována silná fluorescence také v uchu stejně jako v jiných oblastech kůže. Po místní aplikaci byl tedy PpIX indukovaný estery ALA zjištěn v kůži místně, zatímco PpIX indukovaný volnou ALA byl distribuován nejen místně, ale také do jiných oblastí kůže. Autoři vynálezu proto navrhuji vysvětlení, že ALA je transportována do krve a potom se PpIX následně vytváří ve

všech orgánech, které obsahují enzymy dráhy syntézy hemu a/nebo že PpIX se vytváří v kůži a potom se transportuje krevním oběhem do jiných tkání. Druhá situace může vést k fotosenzitivitě kůže v oblastech, kde není ALA místně aplikována. Navíc po intraperitoneální injekci methylesteru ALA v dávce 150 mg/kg vznikla fluorescence PpIX v kůži myši 15 min po
 5 injekci a maximální hodnota byla nalezena přibližně po 4 hodinách, a fluorescence zmizela v průběhu 10 hodin po injekci (obr. 3). Kinetika je podobná kinetice fluorescence porfyrinů, indukovaných volnou ALA v kůži po i.p. injekci stejné dávky, avšak v případě esteru klesla intenzita fluorescence rychleji než v případě volné ALA.

10

Příklad 10

Měření vytváření protoporfyrinu IX v lidském karcinomu bazálních buněk (BCC) a okolní normální kůži systém založený na optických vláknech

15

Fluorescence PpIX v lézích BCC a okolní normální kůži u lidí byla měřena v různých časových intervalech po místní aplikaci 20 % volné ALA a jejích derivátů systémem, založeným na optických vláknech.

20

Obr. 4, 5, 6 a 7 ukazují, že ve srovnání s volnou ALA se v lézích BCC vytvářel PpIX indukovaný deriváty ALA rychleji, ve větším množství a se selektivnější lokalizací (tj. mnohem menší fluorescence v okolní normální kůži), zvláště v případě methylesteru ALA.

25

Příklad 11

Povrchová fluorescenční měření produkce PpIX u lidského BCC a okolní normální kůži in vivo CCD mikroskopií biopsií

30

78 letý kavkazský muž s mnohočetnými ulcero-nodulárními změnami BCC byl ošetřen komerčními krémy typu olej ve vodě, obsahujícími buď samotný ALA (20 % hmotnostních), nebo methylester ALA (20 % hmotnostních) (jak bylo popsáno v příkladu 7) a ošetřená místa byla na 24 hodin pokryta polopropustným obvazem. Po odstranění obvazů a krému byla měřena fluorescence in vivo na povrchu tumorové tkáně a sousedící normální kůže pomocí spektro-
 35 fluorometru. byly pořízeny vpichové biopsie stejných oblastí a vzorky byly ihned ponořeny do kapalného dusíku. Vzorky tkáně byly rozřezány kryostatickým mikrotomem na tloušťku 8 μ m. Obrázec rozmístění fluorescence porfyrinu v úsecích tkáně byl přímo pozorován pomocí fluorescenční mikroskopie. Stejně zmrazené úseky byly potom barveny rutinním barvením H&E pro histologickou indentifikaci. Stejně úseky byly potom barveny rutinním barvením H&E pro
 40 histologickou indentifikaci. Fluorescenční mikroskopie byla prováděna mikroskopem Axioplan (Zeiss, Německo). Fluorescenční zobrazení a fluorescenční měření byla prováděna na světlo citlivou termoelektricky chlazenou CCD kamerou (Astromed CCD 3200, Cambridge, Anglie) a jednotkou zpracování obrazu (Astromed/Visilog, PC 486DX2 66 MHz VL). Hlavním účelem těchto kvantitativních měření je přesné určení penetrace ALA-indukovaných porfyrinů z povrchu
 45 tkáně do spodních vrstev karcinomových poškození. Výsledky jsou ukázány v obrázku 8 a 9, kde je intenzita fluorescence vyjádřena jako funkce hloubky karcinomové změny.

50

Jak je vidět v obrázcích 8 a 9, po použití buď volné ALA, nebo jejího methylesteru dojde k homogenní distribuci fluorescence PpIX od horní části až je spodní části celkových změn BCC. To ukazuje na to, že z hlediska penetrace a produkce PpIX v lézi BCC je methylester ALA alespoň tak dobrý jako volná ALA. Navíc po místní aplikaci methylesteru ALA nebyla viditelná v okolní normální kůži žádná fluorescence, což ukazuje na to, že PpIX indukovaný methylestrem ALA se vysoce selektivně vyskytuje pouze v poškození BCC.

5 Fluorescence in vivo po 24 hodinách ukázala pro vybrané tumory alespoň zdvojení intenzity fluorescence v případě methylesteru ALA ve srovnání s ALA a přírůstek rovněž v odpovídajících normálních tkáních, v tomto případě však pouze 50 %. Poměr mezi tumorovou a normální tkání byl pro ALA přibližně 1,2 : 1 a pro methylester ALA 2 : 1. Výsledky jsou ukázány v obrázcích 10 a 11.

10 Při kontrole 1 týden po ošetření byla ve všech ošetřených oblastech přítomna centrální nekrotická oblast, odpovídající tumoru. V sousední normální kůži vystavené krému a mírnému ozáření, bylo pozorováno vyznačené zarudnutí kůže v případě ALA, zatímco pro methylester ALA bylo pozorováno pouze mírné zarudnutí.

Příklad 12

15 Fluorescenční povrchová měření produkce PpIX u lidského BCC a okolní normální kůži in vivo CCD mikroskopii biopsií

20 Předkládaná data ukazují obrazce rozmístění a produkce porfyrinů (zejména protoporfyrinu 9 (PpIX) po místní aplikaci samotné ALA a jednoho z jejích derivátů (methylesteru) pro 4,5 a 24 hodin u nodulárních karcinomů bazálních buněk (BCC) a okolní normální kůži pacientů. Testy byly prováděny jak je popsáno v příkladě 11. Následující obrázky vždy ukazují jak (B) fluorescenční obrazy ukázány (A), křivky, ukazující intenzitu fluorescence jako funkci hloubky u poškození BCC nebo normální kůže.

25 Obrázek 12 ukazuje homogenní distribuci fluorescence PpIX vytvořené methylesterem ALA ve spodní vrstvě BCC 4,5 h po místní aplikaci. V okolní normální kůži je rovněž přítomna určitá fluorescence porfyrinu (obr. 13). Poměr intenzity fluorescence mezi BCC a normální kůží je přibližně 2. Navíc je absolutní množství fluorescence indukované methylesterem ALA po místní aplikaci pro 4,5 h vyšší než množství fluorescence indukované ALA a 20 % DMSO, jak je
30 ukázáno níže.

Obrázky 14 a 15 ukazují stejnoměrné rozdělení porfyrinové fluorescence, indukované místní aplikací methylesteru ALA, pro 24 hodin ve spodní vrstvě BCC a okolní normální kůži. Navíc je intenzita fluorescence porfyrinů indukovaných methylesterem ALA v BCC pro 24 hodin
35 přibližně dvakrát tak vysoká jako intenzita v BCC po místním podání samotné volné ALA, jak je ukázáno níže.

Obrázky 16 a 17 ukazují homogenní rozdělení porfyrinů indukovaných volnou ALA ve spodní vrstvě poškození BCC a okolní normální kůži 24 hodin po místním podání. Poměr intenzity
40 fluorescence mezi BCC a normální kůží je přibližně 1, což naznačuje nízkou selektivitu tohoto působení. navíc je vytváření porfyrinů v BCC pro ALA menší, než v případě methylesteru ALA.

Obrázky 18 a 19 ukazují homogenní rozdělení porfyrinů indukovaných ALA ve spodní vrstvě BCC a okolní normální kůži pro 4,5 h po místním podání volné ALA a 20 % DMSO. Poměr
45 intenzity fluorescence mezi BCC a normální kůží je pouze mírně vyšší než 1, což ukazuje, že DMSO pravděpodobně redukuje tumorovou selektivitu vytvářených porfyrinů. Navíc i v tomto případě se vytváří v BCC méně porfyrinů, než v případě methylesteru ALA.

50 Příklad 13

Výzkum účinku chelatačního prostředku desferioxaminu (DF) a/nebo DMSO na fluorescenci kůže

I. V různých časech po místním podání methylesteru ALA byl zjišťován účinek DF a/nebo DMSO na vytváření fluorescence v normální kůži myši in situ. Měření byla prováděna, jak se popisuje v příkladu 9.

5 Výsledky

Místní nanesení samotného krému obsahujícího pouze DMSO neukázalo v normální kůži myši žádnou fluorescence; určitá fluorescence PpIX však byla přítomna po aplikaci samotného DF. DF nebo DF + DMSO (známý prostředek pro zvyšování penetrace kůži) výrazně zvýšil vytváření PpIX, indukované methylesterem ALA.

II. Fluorescenční zobrazení kůže, ošetřené třemi deriváty (provedeno jak je popsáno v příkladu 9) ukázalo fluorescence porfyrinů indukovaných esterovým derivátem v epidermis, epiteliálních vlasových folikulech a mazových žlázách 1 hodinu po místní aplikaci (obr. 21). Intenzita fluorescence porfyrinů stoupala po nanesení s časem.

Souhrn

V naší nemocnici byl v průběhu uplynulých let ošetřen větší počet pacientů s karcinomy bazálních buněk (BCC), u kterých bylo provedeno místní ošetření PDT na bázi ALA; u více než 90 % povrchových BCC nastala úplná regrese. Nodulární BCC však měly nízkou kompletní odezvu kvůli špatnému zadržování ALA a z toho vyplývající nízké produkce porfyrinu indukovaného ALA v hlubokých vrstvách poškození. Aby bylo dosaženo zlepšení této techniky, namísto volné ALA bylo použito esterových derivátů ALA. V současnosti získaná data uváděná v tomto příkladu a v příkladu 9 jak prostřednictvím fluorescenčních spektroskopických měření in situ, tak i fluorescenční mikroskopii tkáňových biopsií, že všechny tři studované esterové deriváty byly absorbovány, deesterifikovány a konečně v epidermis, epiteliálních vlasových folikulech a mazových žlázách nahé myši, přeměněny na porfyriny při vyšší produkci porfyrinu, než je tomu v případě volné ALA. To je v souladu s předcházejícími příklady týkajícími se studia lidských nodulárních karcinomů bazálních buněk, které ukazuje, že v poškozeních se vytvářela fluorescence porfyrinů indukovaných estery ALA rychleji, s vyšší intenzitou a s homogennějším rozdělením než fluorescence porfyrinů, indukovaná volnou ALA.

Předkládané studie také ukazují, že u normální kůže myši po místní aplikaci má DF významný vliv na zvýšení produkce PpIX, odvozeného z methylesteru ALA. Je zajímavé, že silná fluorescence porfyrinů indukovaných volnou ALA byla nalezena v oblastech kůže mimo oblast, na kterou byl krém místně nanesen (obr. 2). To ukazuje, že volná ALA je po místní aplikaci transportována do krve a porfyriny se následně vytvářejí ve všech orgánech obsahujících enzymy dráhy syntézy hemu, nebo se porfyriny na počátku vytvářejí v kůži a/nebo játrech a potom se transportují krevním oběhem do jiných tkání. To může vést k fotocitlivosti kůže i v oblastech, kde volná ALA nebyla aplikována místně. Naproti tomu žádný ze studovaných esterových derivátů neindukoval fluorescence v jiných částech kůže.

45 Příklad 14

Účinky methylesteru ALA nebo ALA, DF a DMSO PDT na růst tumoru u lidského karcinomu tlustého střeva WiDr transplantovaného nahé myši

Nahé myši byly subkutánní injekcí do oblasti pravého boku transplantovány buňky lidského karcinomu tlustého střeva WiDr. Na místo tumoru byly nanесeny následující krémy, vytvořené podle popisu v předcházejících příkladech: 10 % DF samotný; 20 % ALA + 10 % DF + 20 % DMSO; nebo 20 % methylester ALA + 10 % DF + 20 % DMSO a o 14 hodin později bylo provedeno ozáření laserem (632 nm, 150 mW/cm², 15 min). Jako kontrola sloužila oddělená skupina zvířat se stejným modelem tumoru, ale bez místní aplikace krému. Odpovědi ošetřených

tumorů byly vyhodnoceny jako regrese tumoru/čas nového růstu. Když tumory dosáhly objemu pětinasobného než v den ozáření světlem, myši byly usmrceny. Výsledky jsou ukázány na obr. 22 (Úsečky znamenají standardní chybu střední hodnoty (SEM), vztaženou na 3 až 5 jednotlivých zvířat v každé skupině). Výsledky ukazují, že tumorům ošetřeným methylesterem ALA + DF + DMSO trvalo dosažení pětinasobného objemu než byl objem b den právě před ozářením světlem 34 dnů, zatímco v případě volné ALA + DF + DMSO trval růst na pětinasobnou velikost ošetřeným tumorům 24 dnů. Methylester ALA je tedy při zpomalování nového růstu tumoru účinnější než ALA.

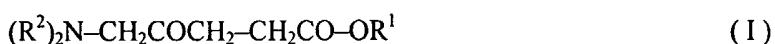
Příklad 15

Selektivita esterů ALA (methyl, hexyl, heptyl a oktyl) pro nenormální tkáň

Výše popsanými metodami byly vyšetřovány poměry fluorescence v PpIX mezi změnami BCC a okolní normální kůže po místním podání ALA nebo jejích esterů (20 %, 4 hodiny). Výsledky jsou ukázány na obr. 23 a je z nich zřejmé, že všechny estery mohou indukovat PpIX v poškozeních BCC selektivněji než volná ALA, zvláště v případě methylesteru ALA a hexylesteru ALA.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Estery kyseliny 5-aminolevulové vzorce I,



kde R^1 znamená alkyl popřípadě substituovaný skupinami hydroxy, alkoxy, acyloxy, alkoxykarbonyloxy, amino, aryl, oxo nebo fluoro a popřípadě přerušeny atomy kyslíku, dusíku, síry nebo fosforu; a R^2 znamená atom vodíku; přičemž jakákoli přítomná alkylová skupina obsahuje až do 10 atomů uhlíku a arylovou skupinou je fenyl;

nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli pro použití při fotochemoterapii nebo diagnóze.

2. Estery kyseliny 5-aminolevulové podle nároku 1, kde R^1 znamená nesubstituovanou alkylovou skupinu.

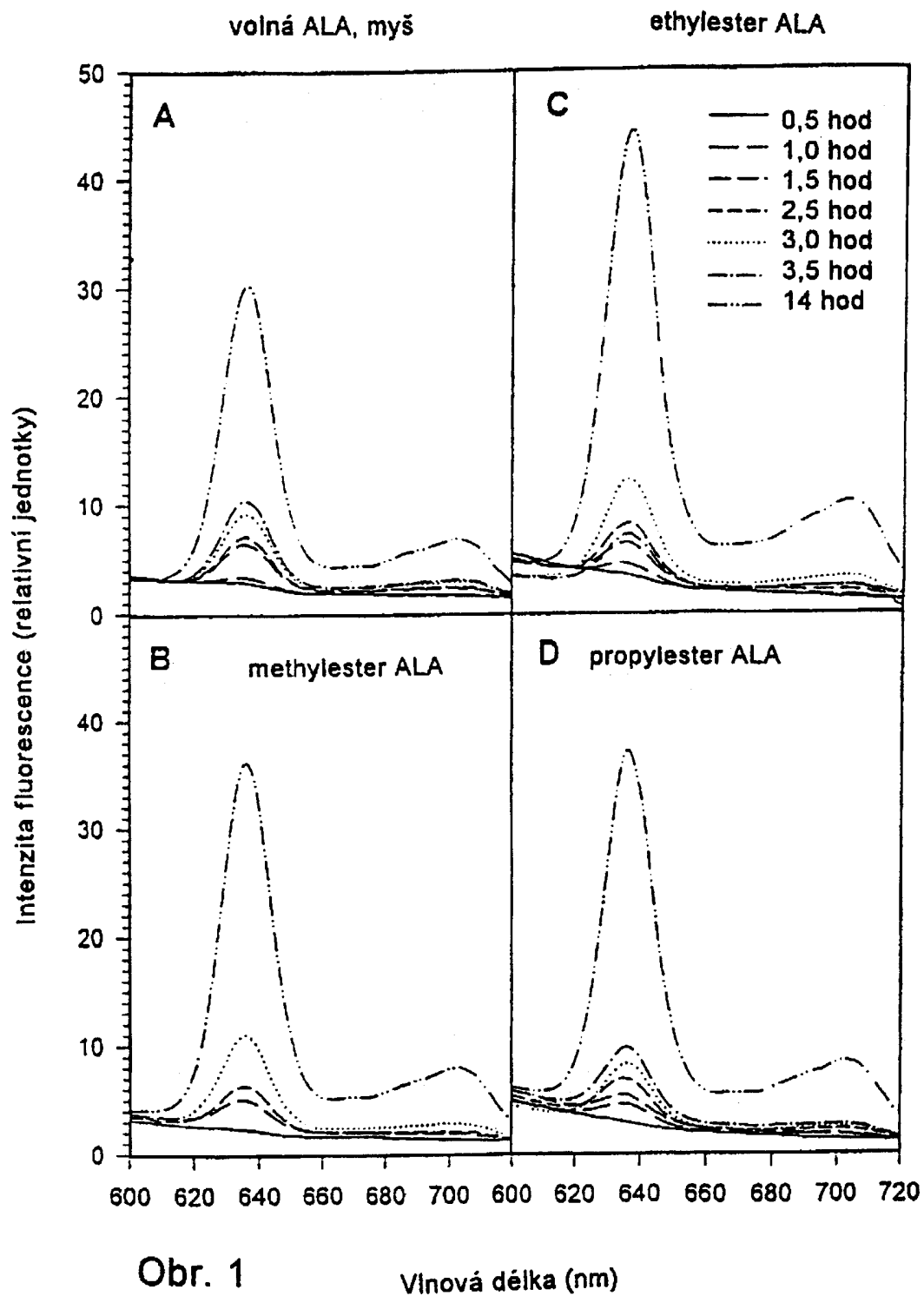
3. Estery kyseliny 5-aminolevulové podle některého z nároku 1 nebo 2, kterými jsou methylester kyseliny 5-aminolevulové, ethylester kyseliny 5-aminolevulové, propylester kyseliny 5-aminolevulové, hexylester kyseliny 5-aminolevulové, heptylester kyseliny 5-aminolevulové nebo oktylester kyseliny 5-aminolevulové nebo jejich soli.

4. Farmaceutický prostředek pro diagnózu nebo fotochemoterapii poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních povrchů těla, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje ester kyseliny 5-aminolevulové podle některého z nároků 1 až 3 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl spolu s alespoň jedním farmaceutickým nosičem nebo pomocnou látkou.

5. Použití esterů kyseliny 5-aminolevulové podle některého z nároků 1 až 3 nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu terapeutického prostředku pro použití při fotochemoterapii nebo diagnostického prostředku pro použití v diagnostice.

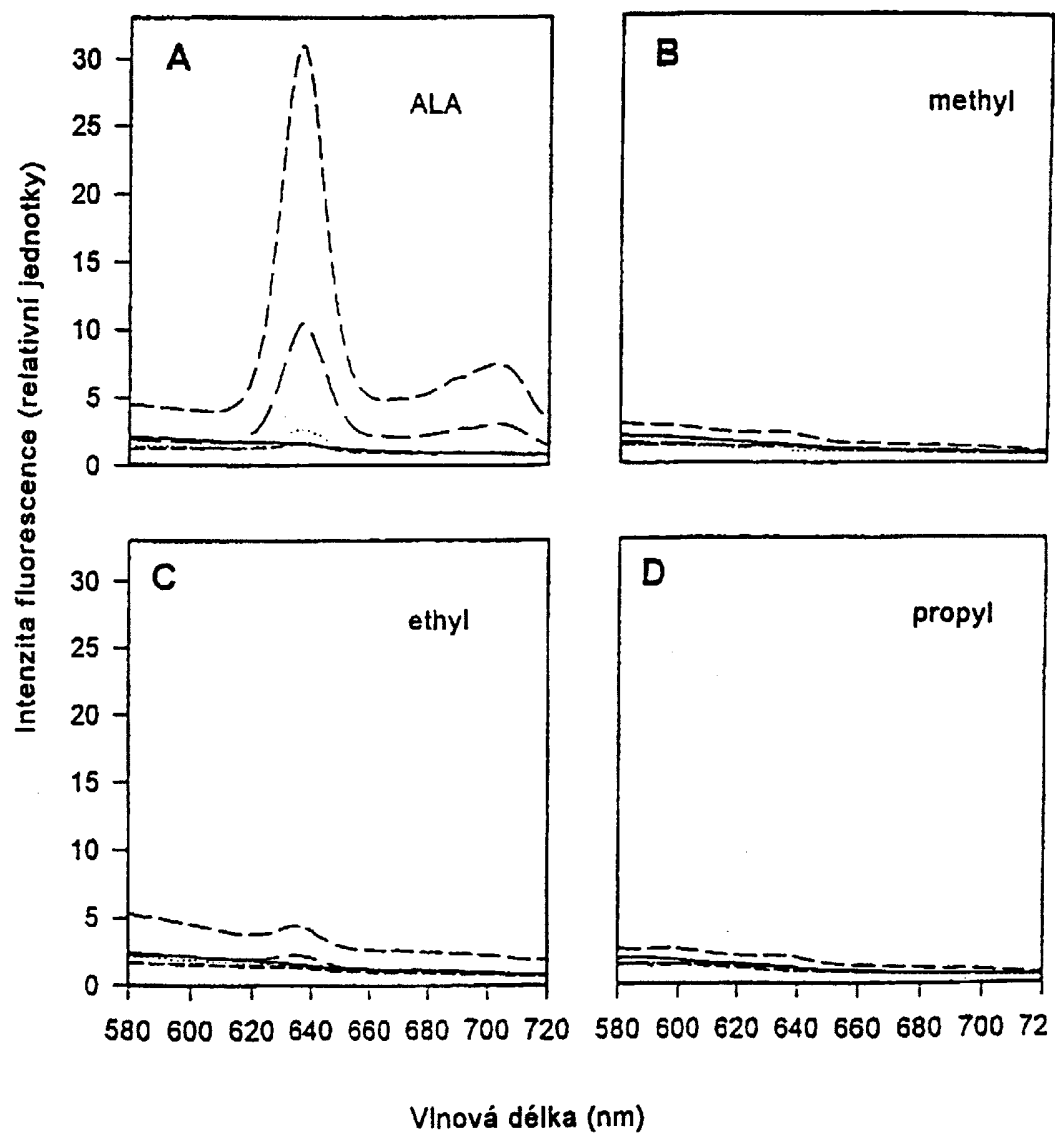
6. Použití podle nároku 5, kde fotochemoterapie nebo diagnóza se provádí u poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních povrchů těla, které odpovídají na fotochemoterapii.
7. Farmaceutický prostředek pro diagnózu nebo fotochemoterapii poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních povrchů těla, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje ester kyseliny 5-aminolevulové podle některého z nároků 1 až 3 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl spolu s alespoň jedním prostředkem napomáhajícím penetraci do povrchu a popřípadě s jedním nebo více chelatačními prostředky, jako kombinovaný prostředek pro současné, oddělené nebo postupné použití při léčení nebo diagnóze poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních povrchů těla, vnímavých k fotochemoterapii.
8. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že prostředkem napomáhajícím penetraci do povrchu je dimethylsulfoxid.
9. Způsob diagnózy abnormalit nebo poruch in vitro testováním vzorku tělesné tekutiny nebo tkáně pacienta, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje alespoň následující kroky:
- i) tělesné tekutiny nebo tkáně se smísí s esterem kyseliny 5-aminolevulové podle některého z nároků 1 až 3,
 - ii) získaná směs se vystaví světlu,
 - iii) stanová se míra fluorescence, a
 - iv) míra fluorescence se porovná s kontrolními hodnotami.
10. Kit pro použití při diagnóze nebo fotochemoterapii poruch nebo abnormalit vnějších nebo vnitřních povrchů těla, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje:
- a) první nádobku, obsahující ester kyseliny 5-aminolevulové podle některého z nároků 1 až 3 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl,
 - b) druhou nádobku, obsahující alespoň jeden prostředek podporující penetraci do povrchu; a popřípadě
 - c) jeden nebo více chelatačních prostředků, obsažených buď v uvedené první nádobce, nebo ve třetí nádobce.

23 výkresů



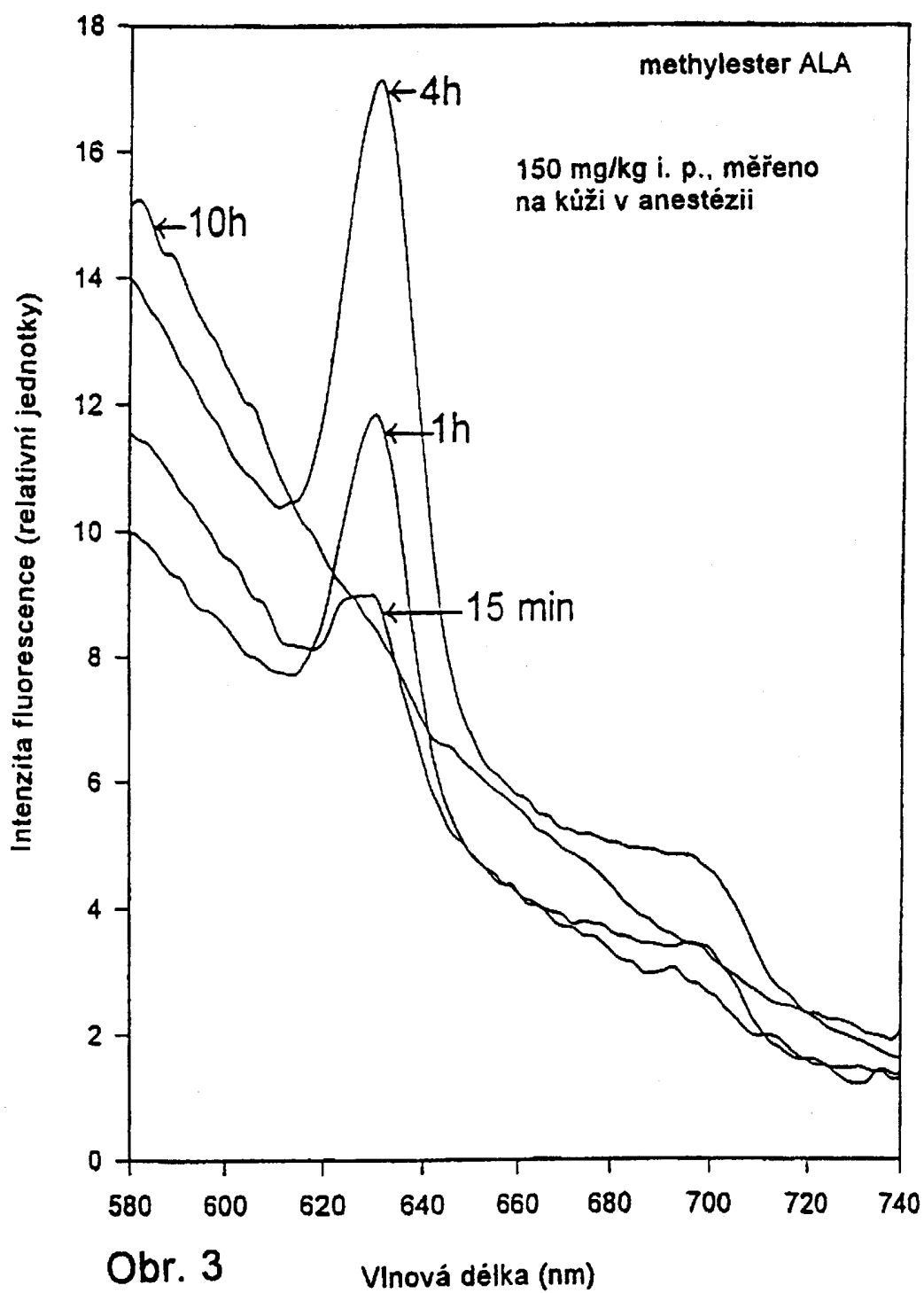
Obr. 1

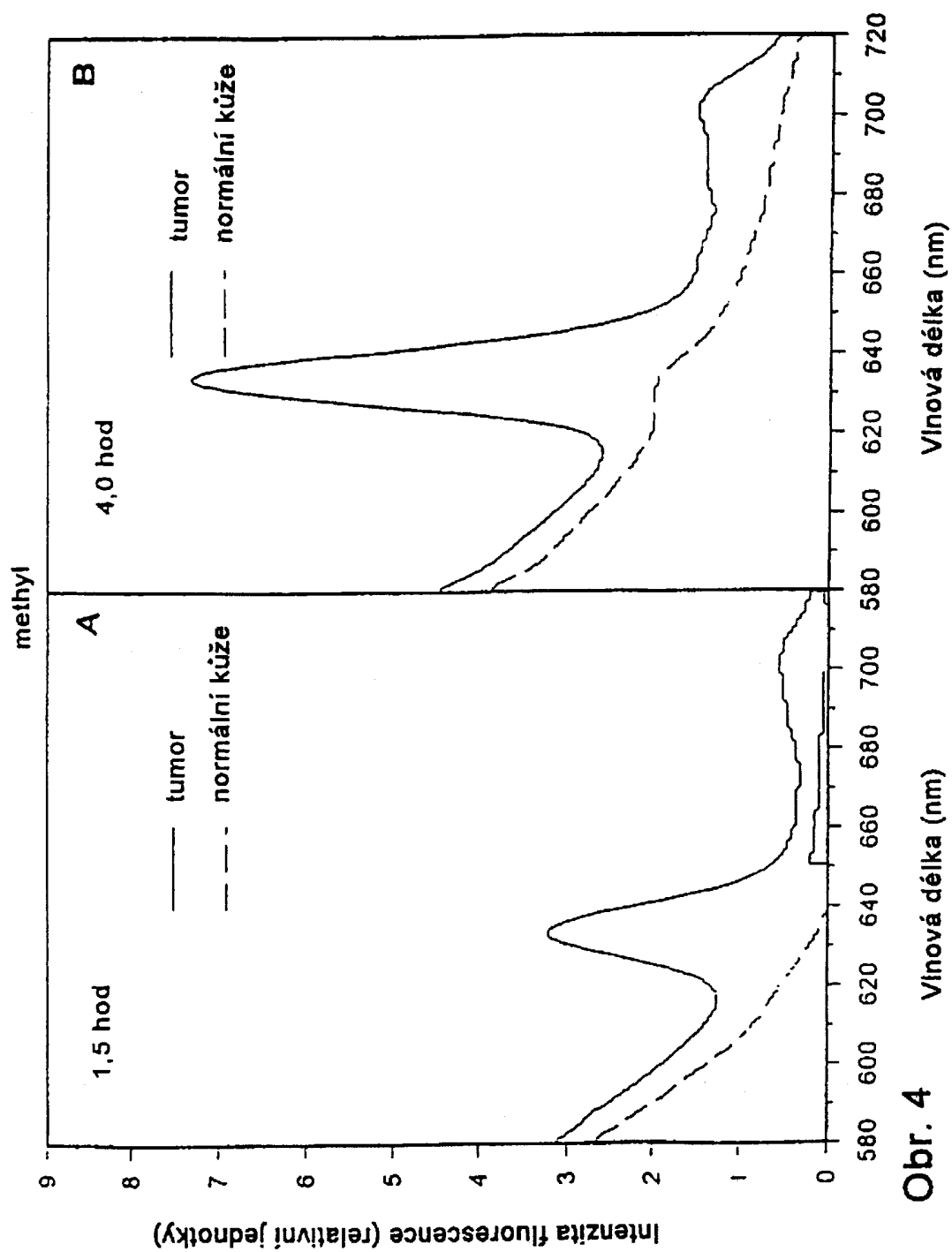
Vlnová délka (nm)



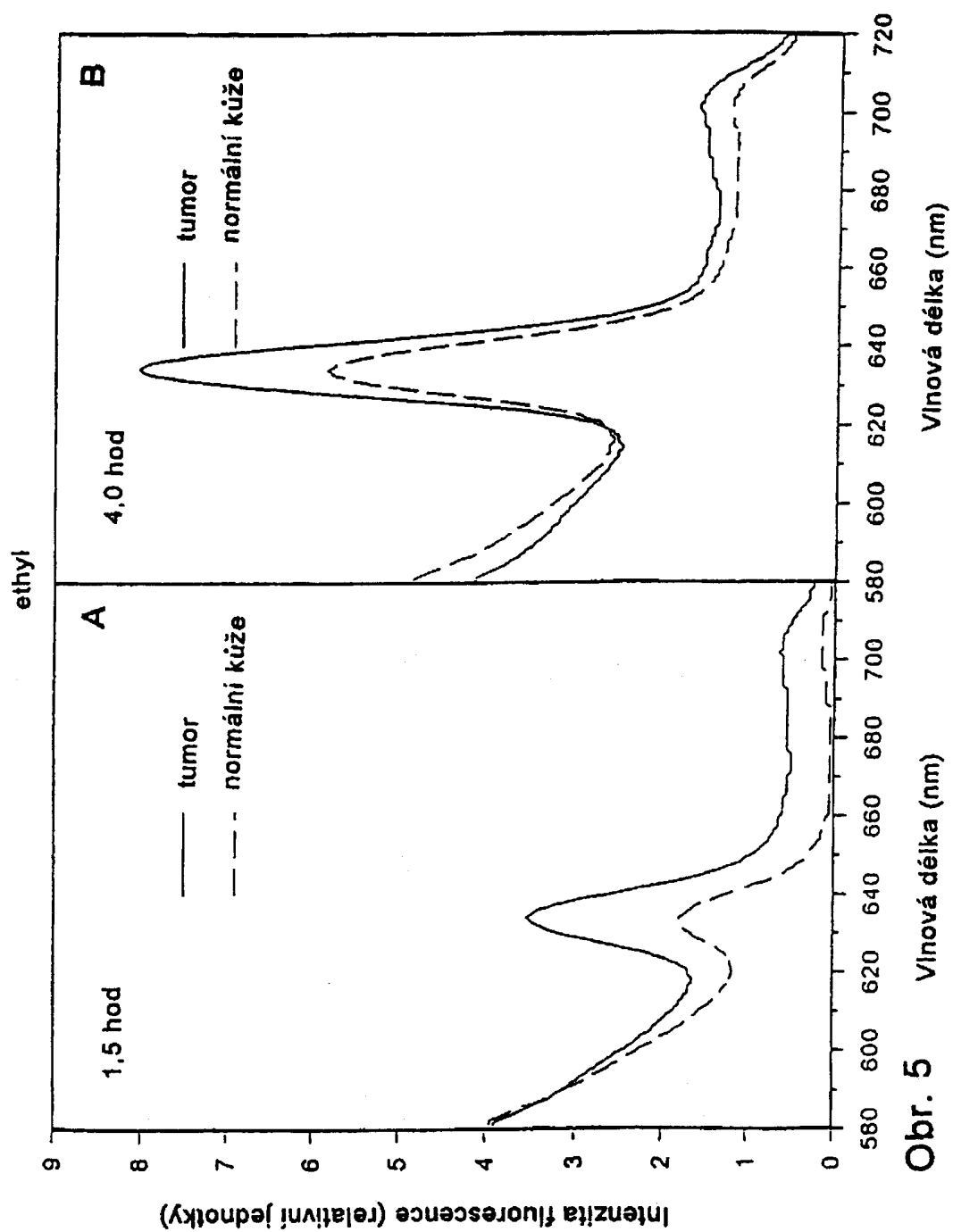
Obr. 2

— mozek
 - - - dermis
 - - - ucho
 - . - játra
 . . . sval

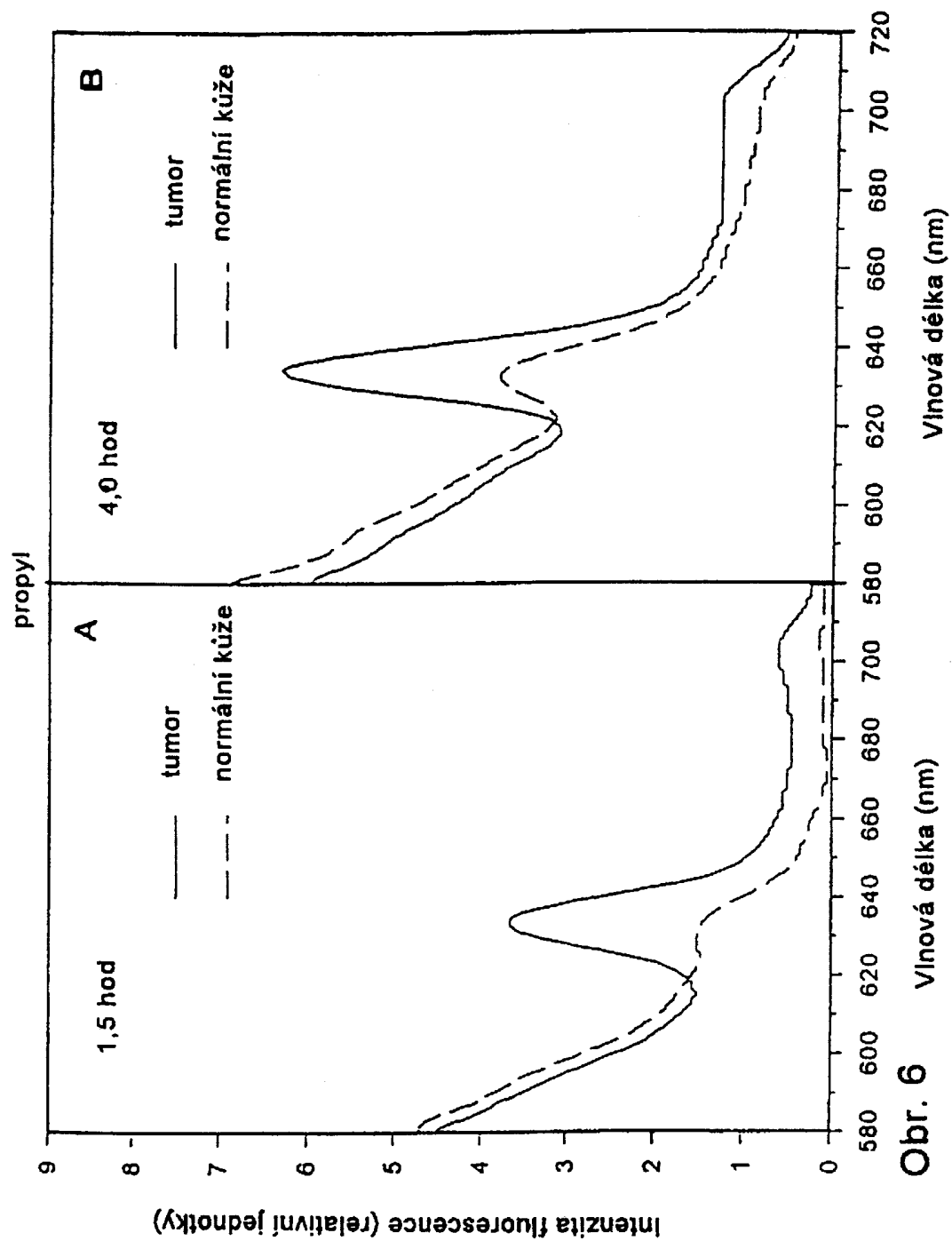


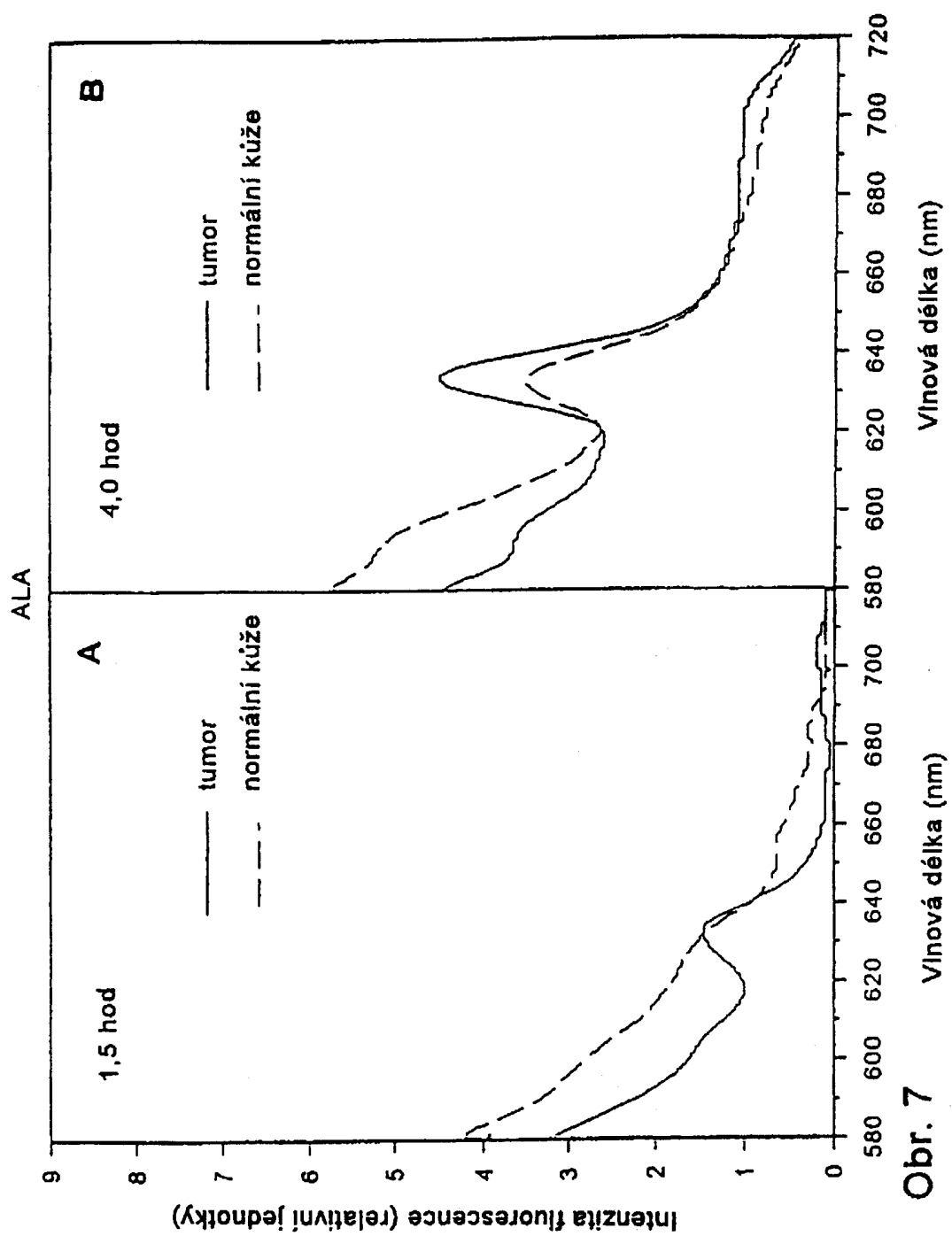


Obr. 4

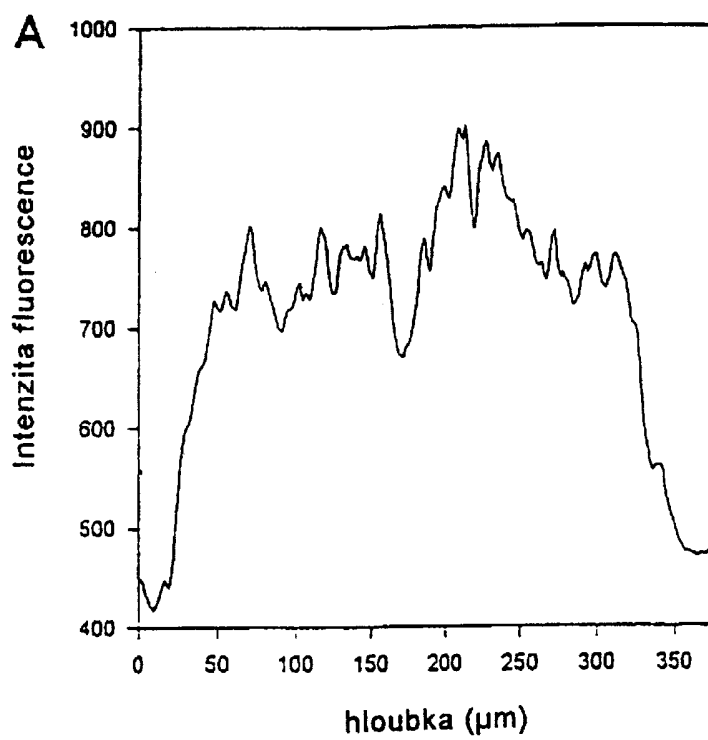


Obr. 5





Obr. 7

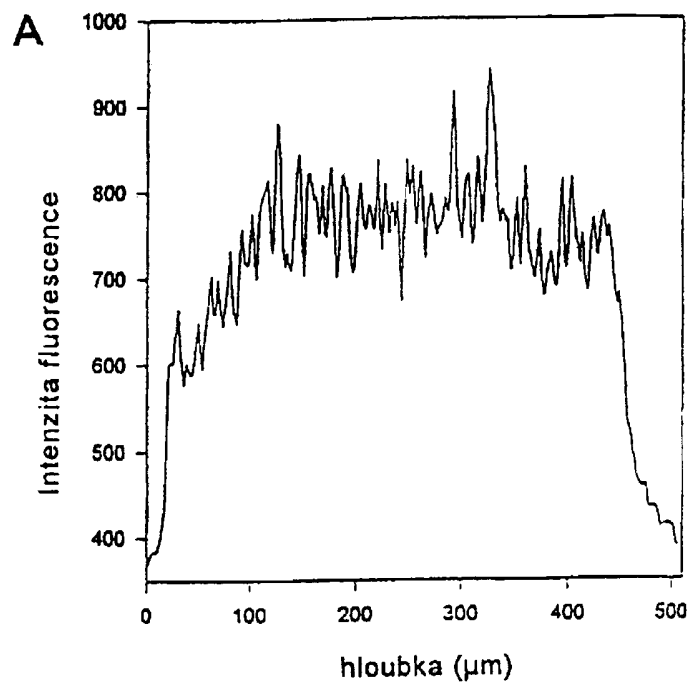


B



volná ALA

Obr. 8



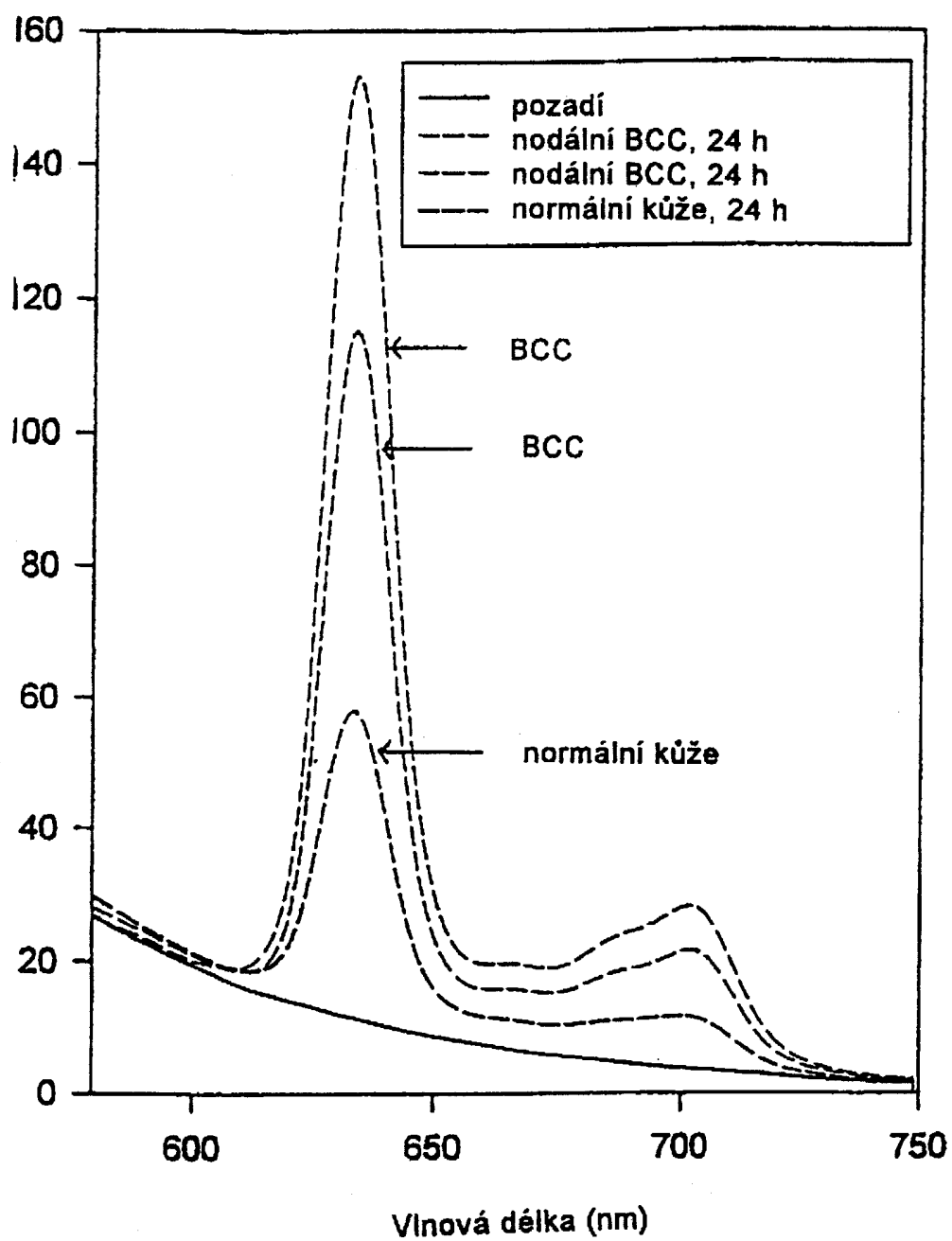
B



methylester ALA

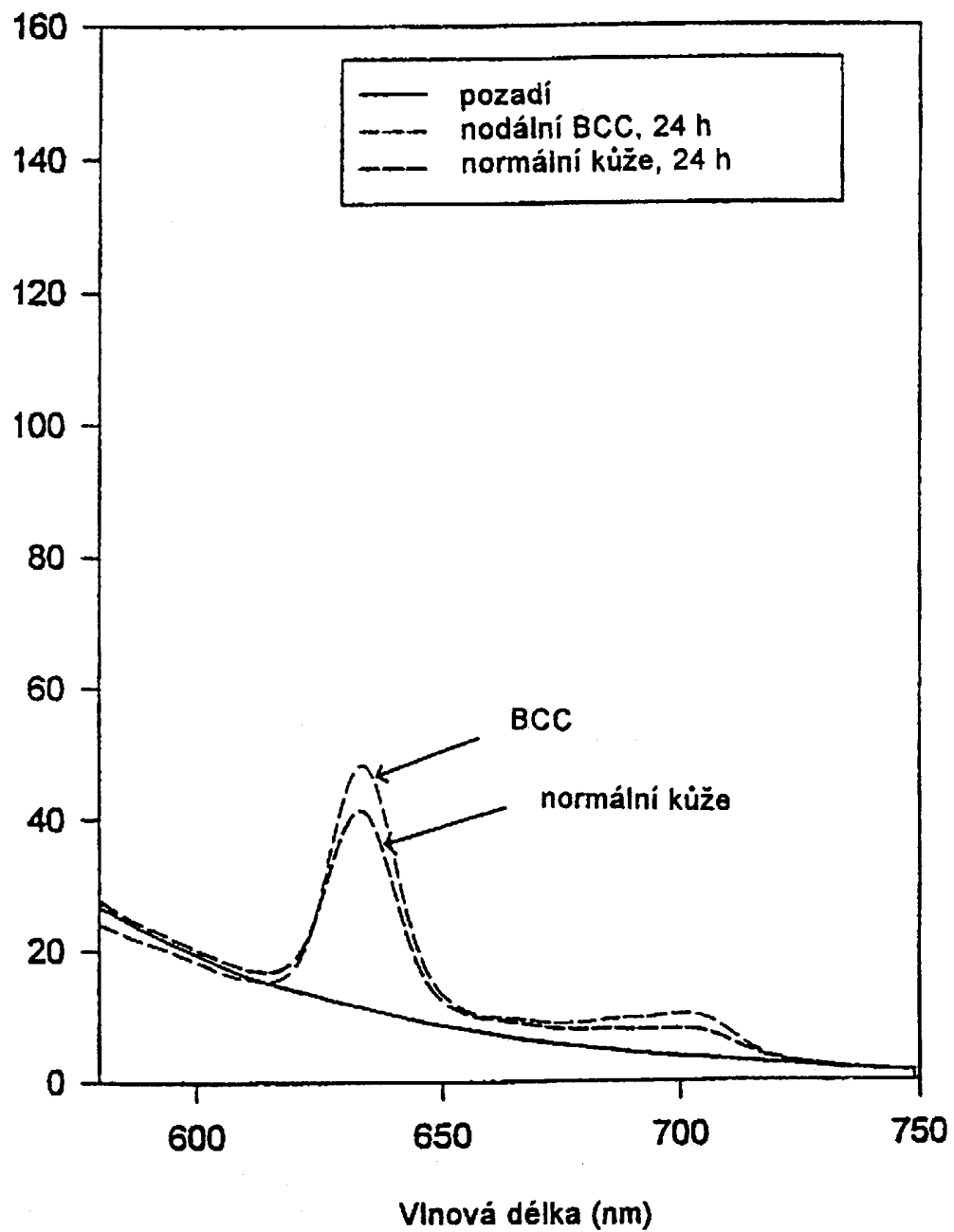
Obr. 9

BCC, methyl-ALA, 24 hodin



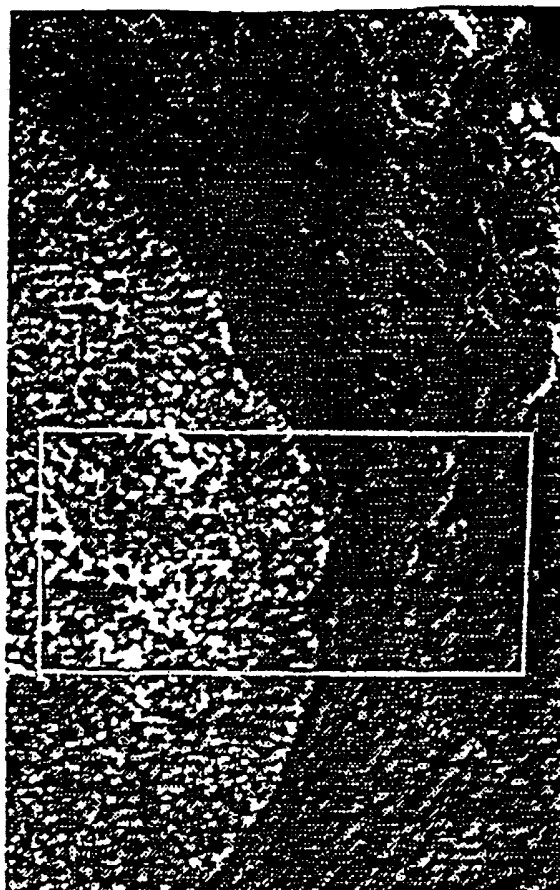
Obr. 10

BCC, ALA, 24 hodin



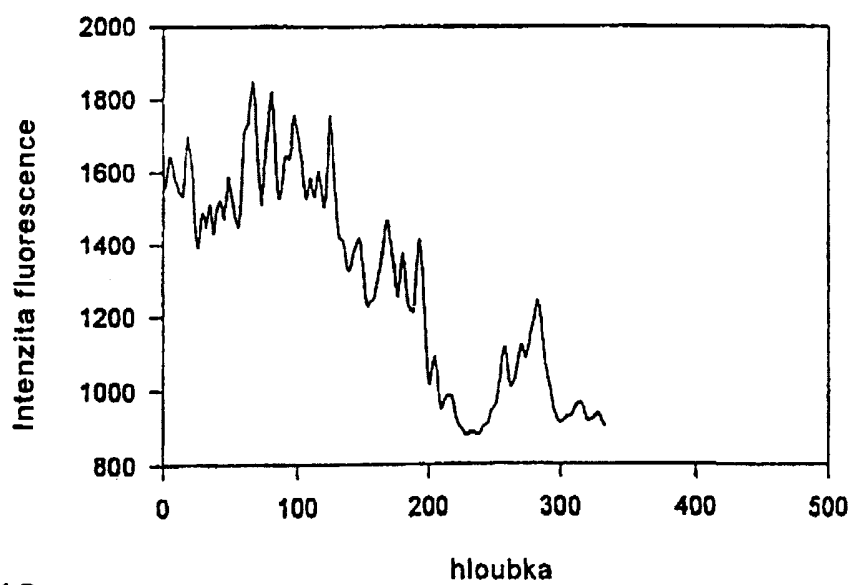
Obr. 11

B



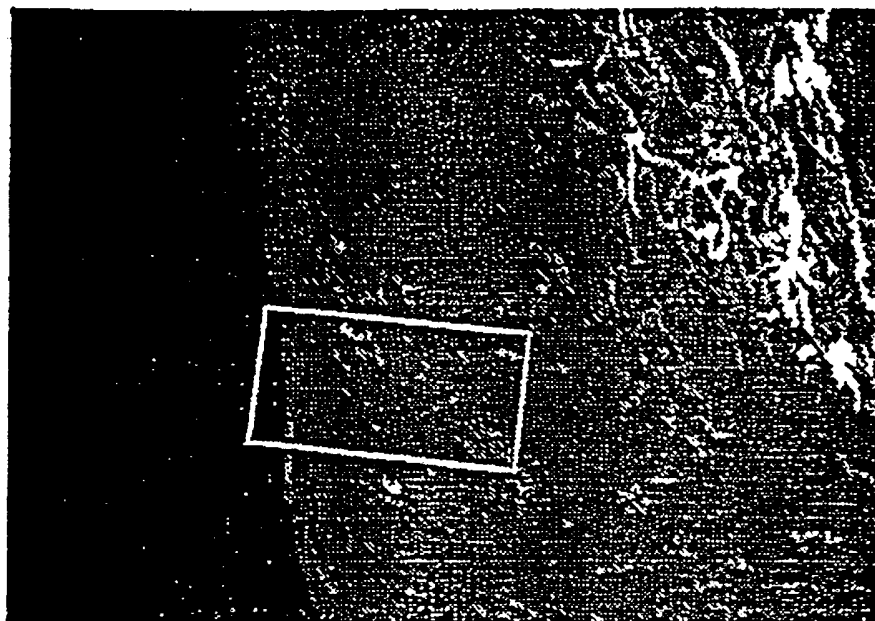
155-20

A



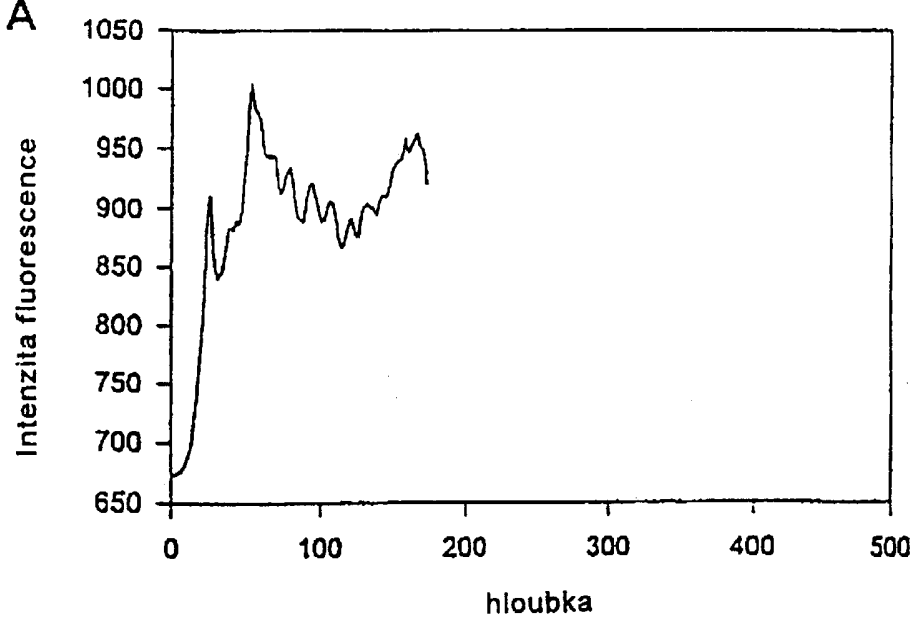
Obr. 12

B



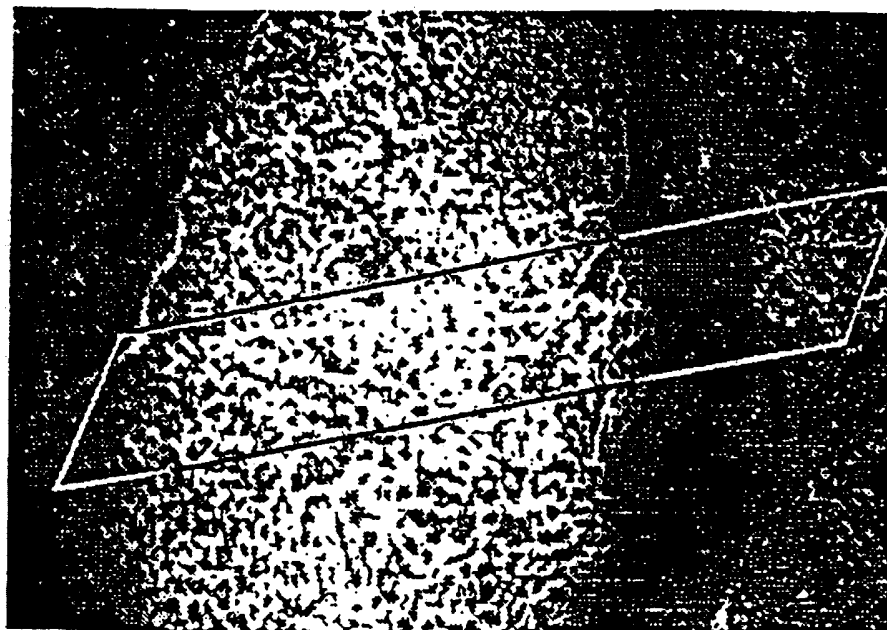
156-1

A



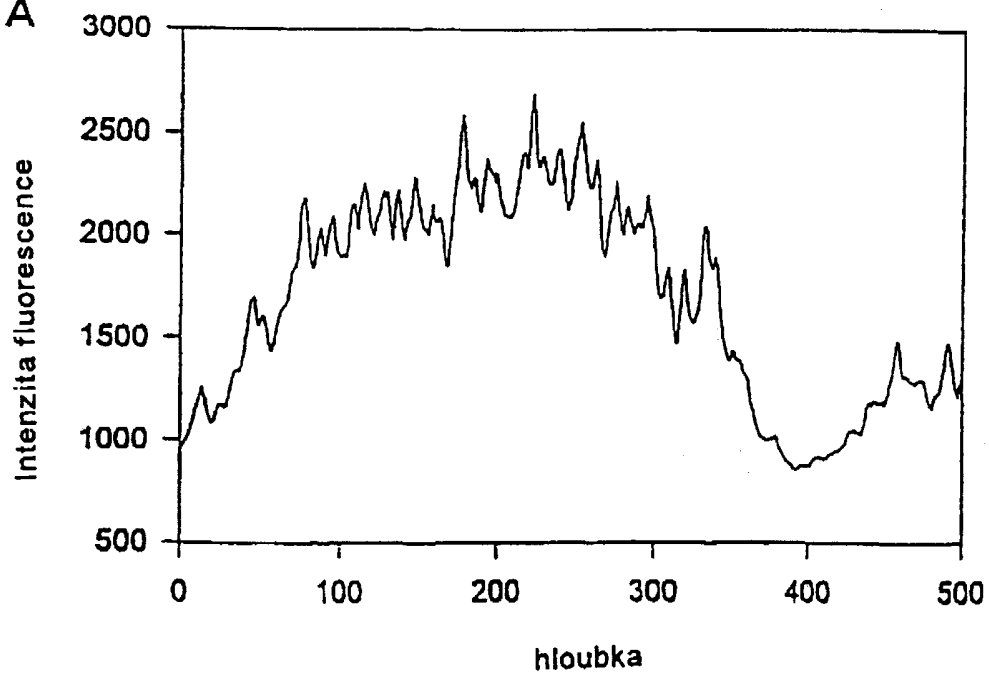
Obr. 13

B



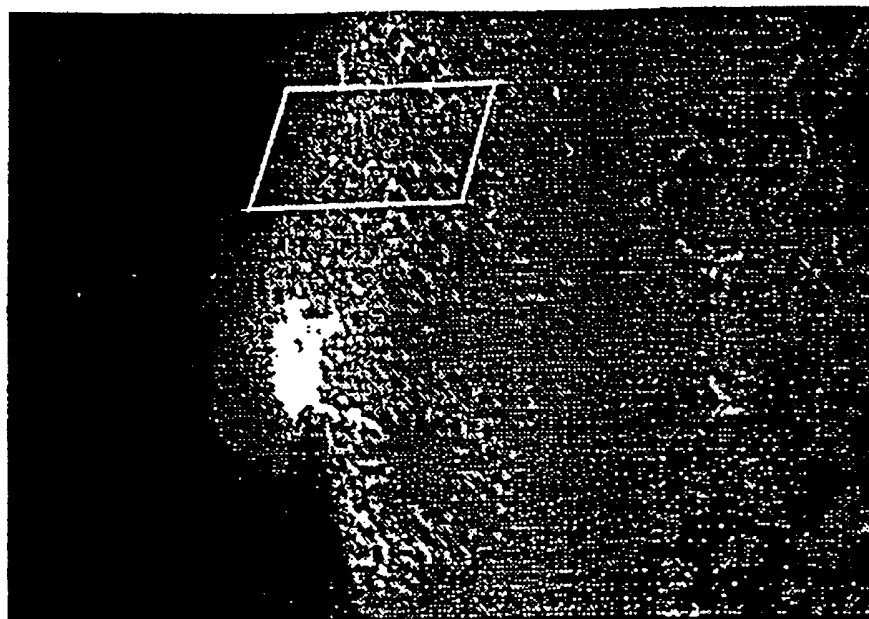
153-11

A



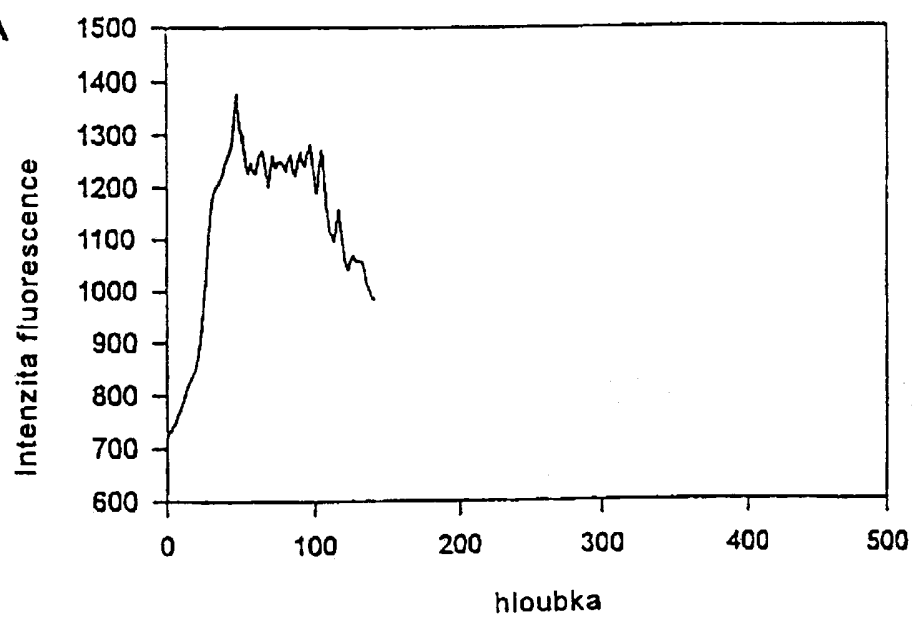
Obr. 14

B



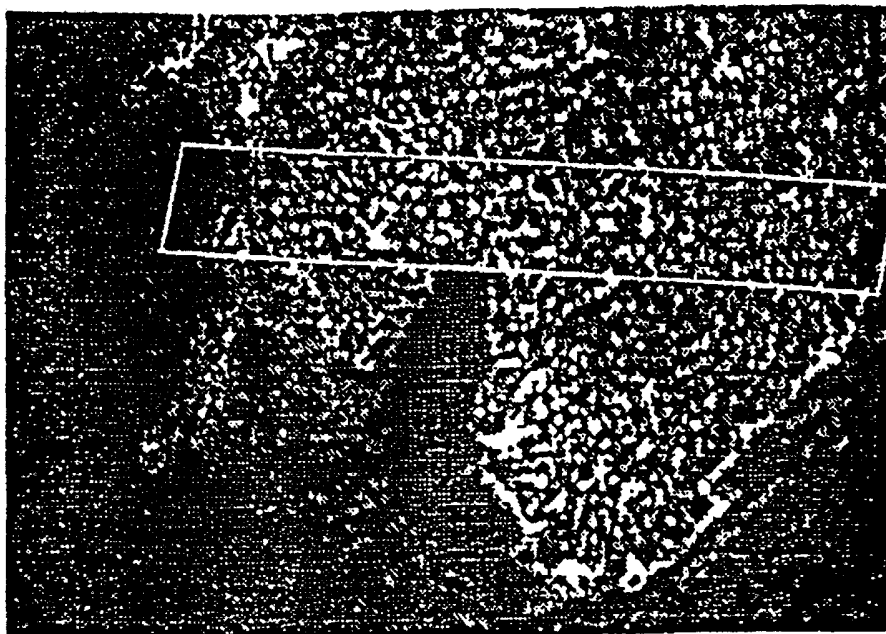
158-1

A



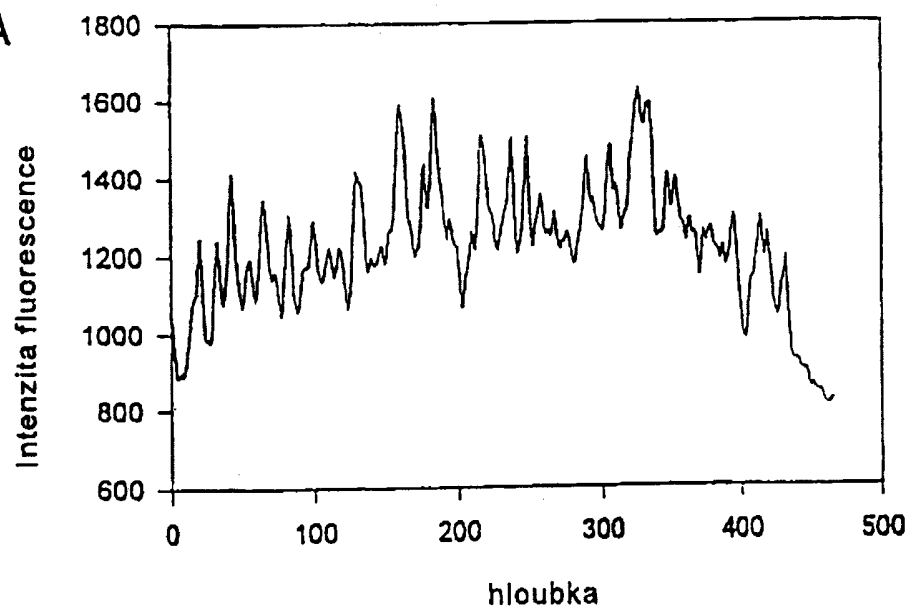
Obr. 15

B

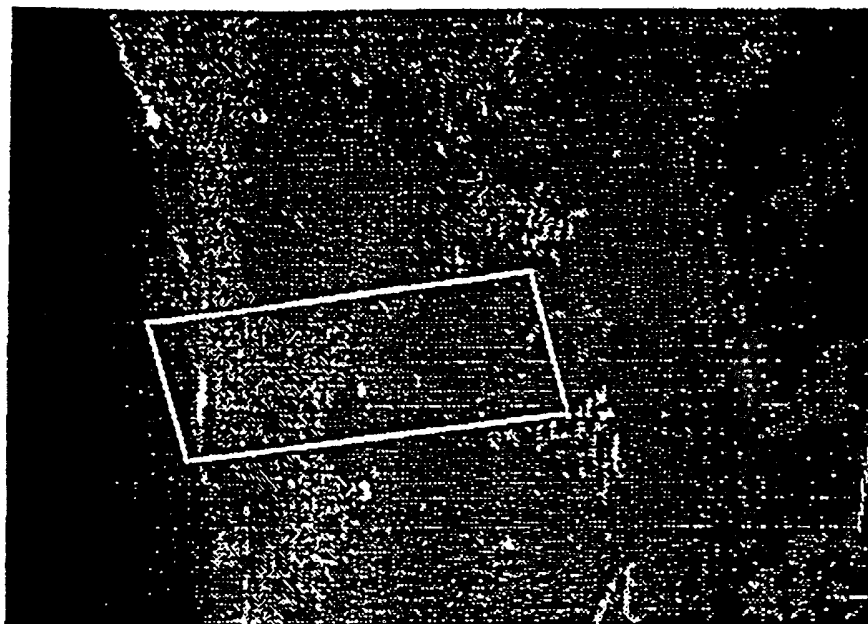


159-4

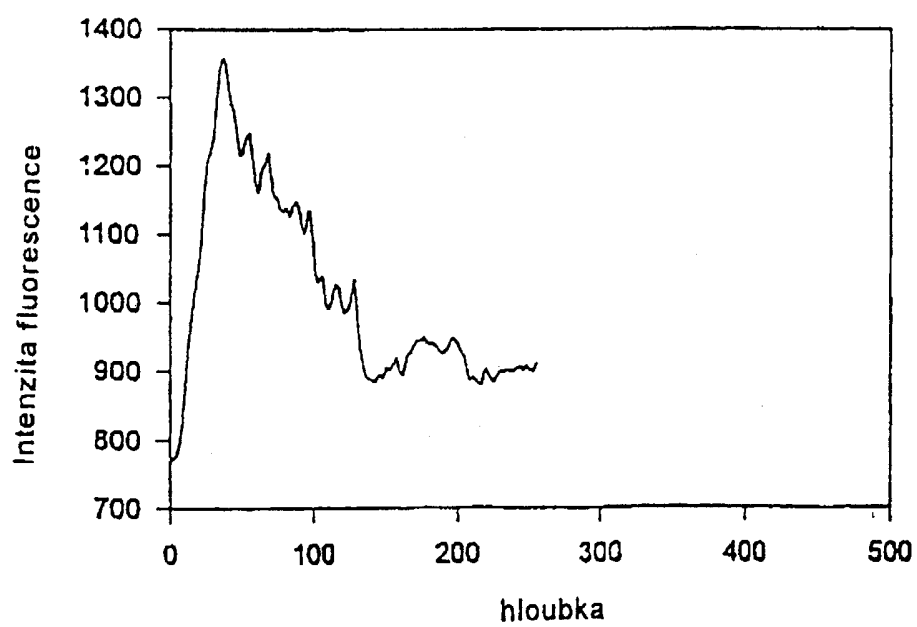
A



Obr. 16

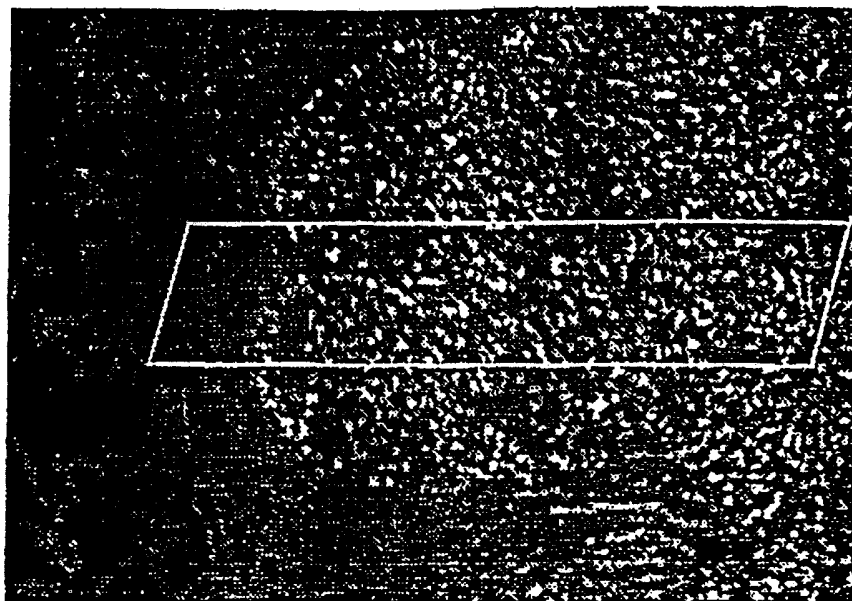
B

160-1

A

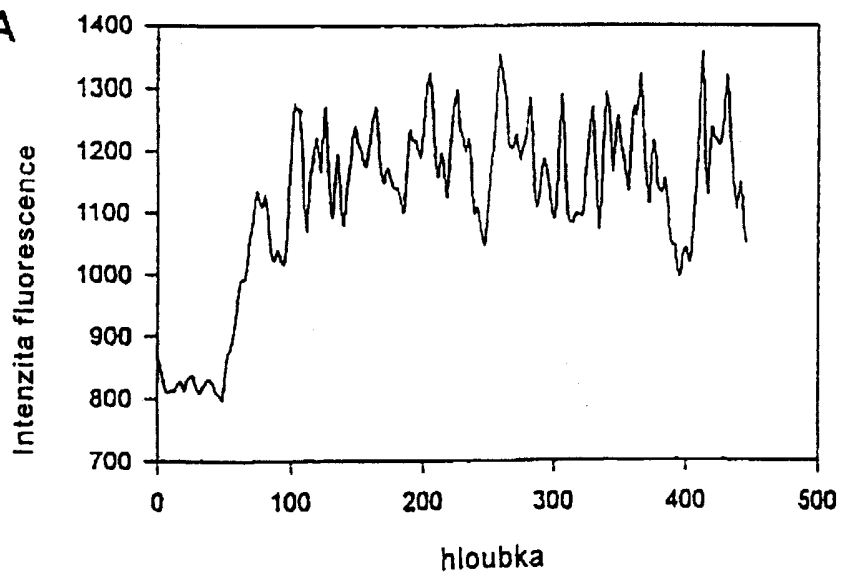
Obr. 17

B



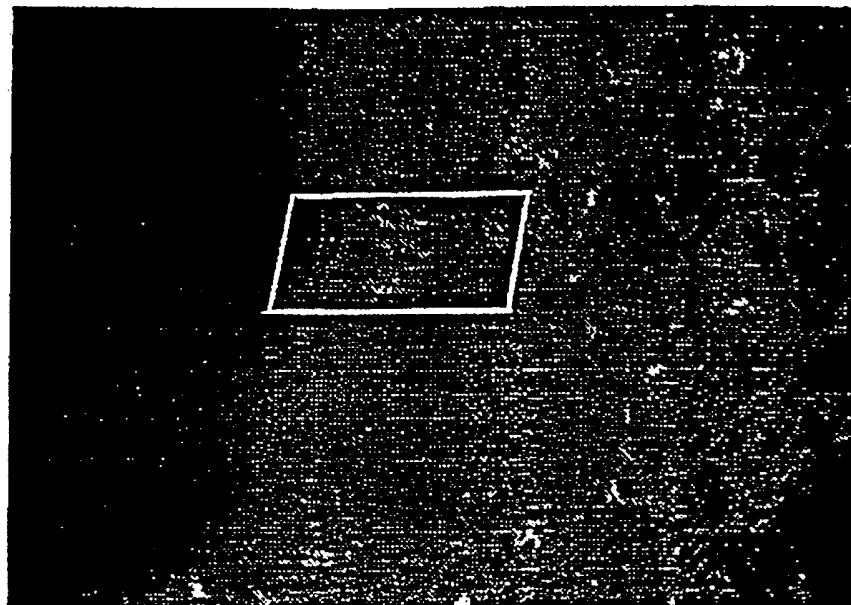
161-6

A

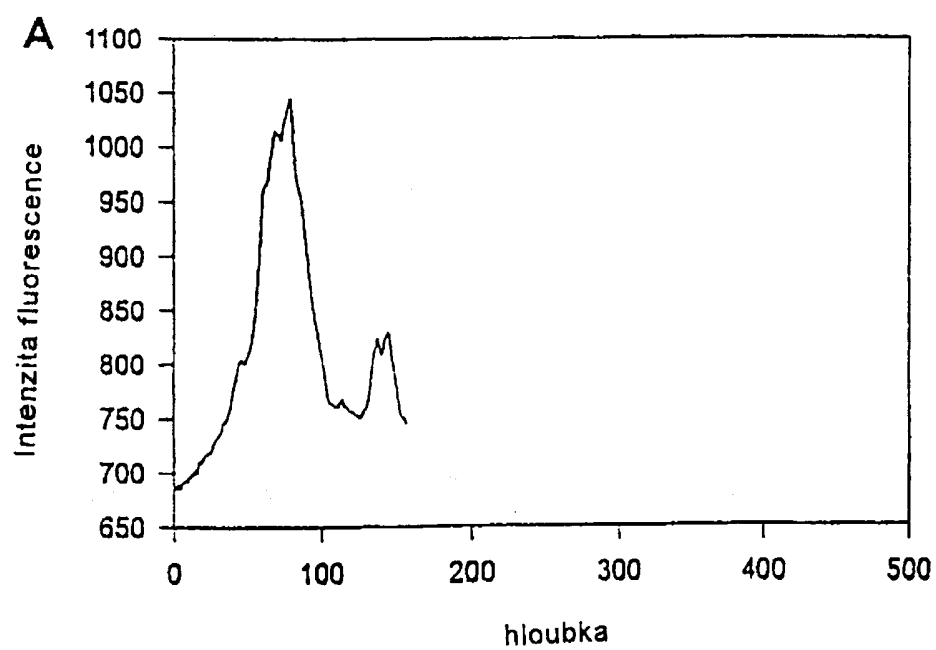


Obr. 18

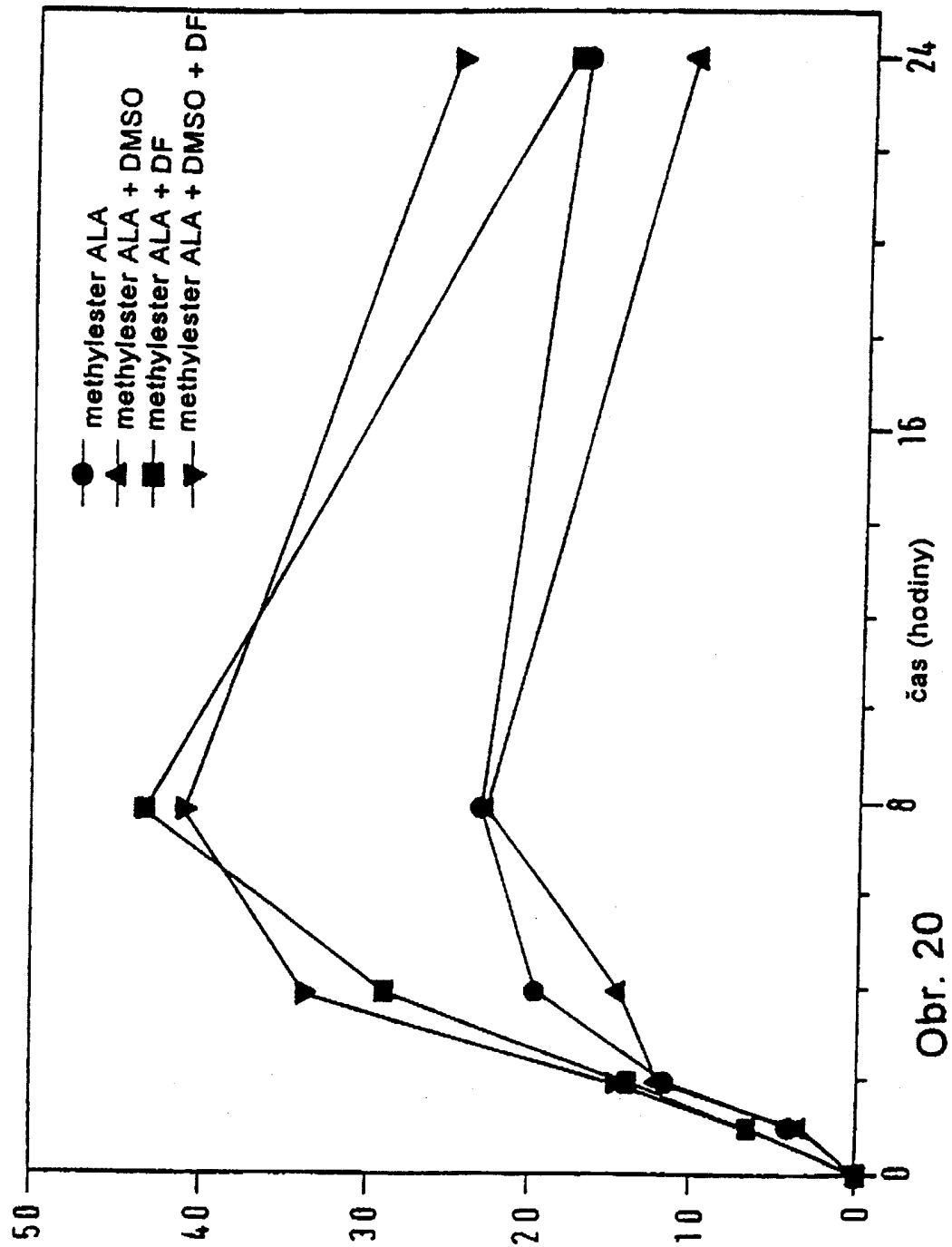
B

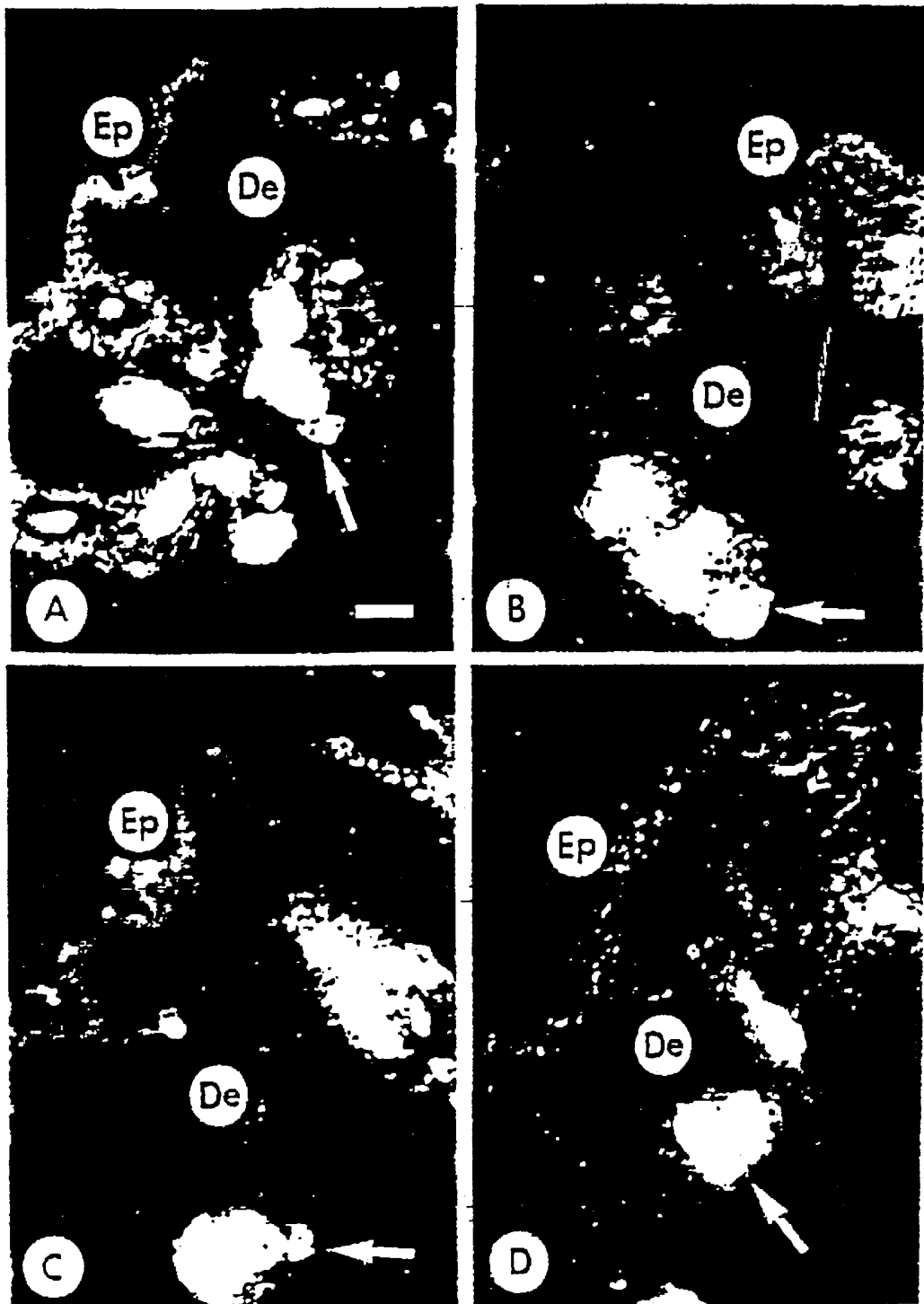


162-1



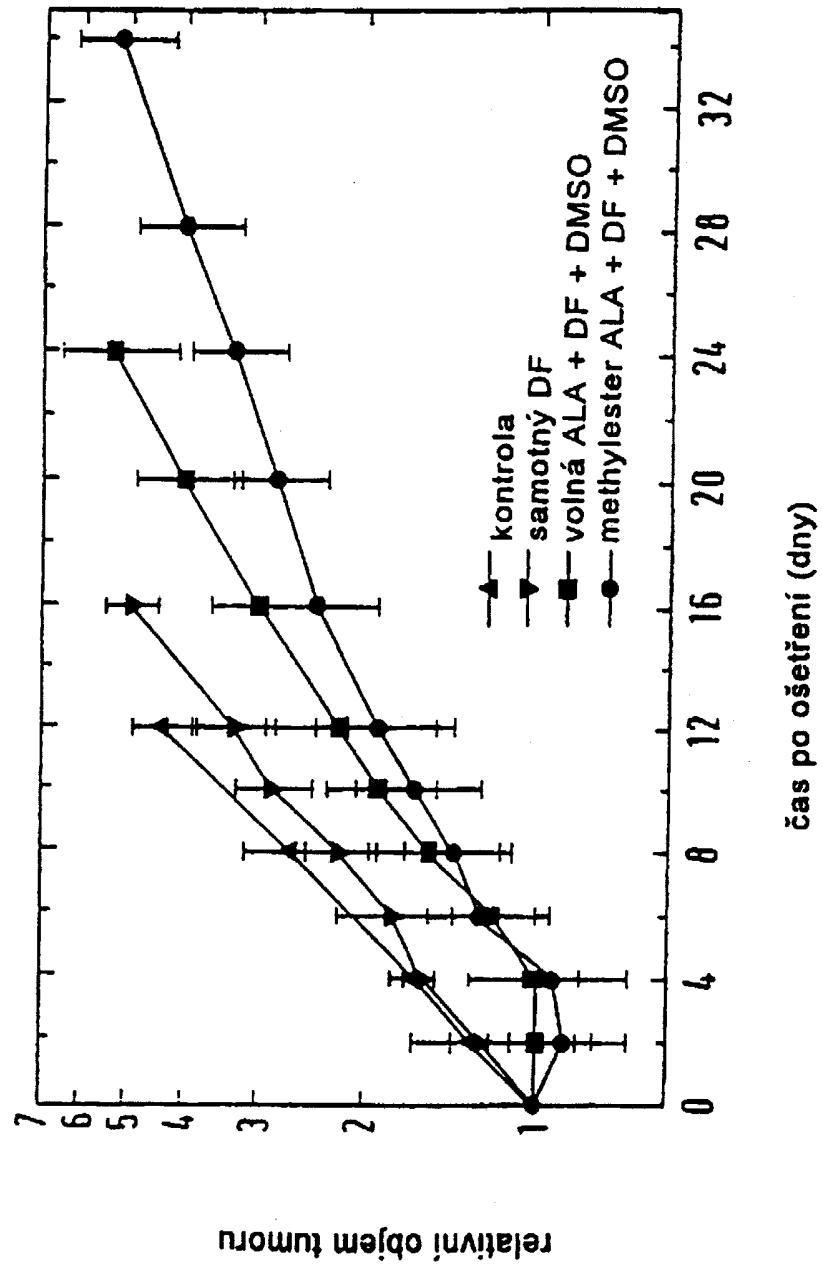
Obr. 19

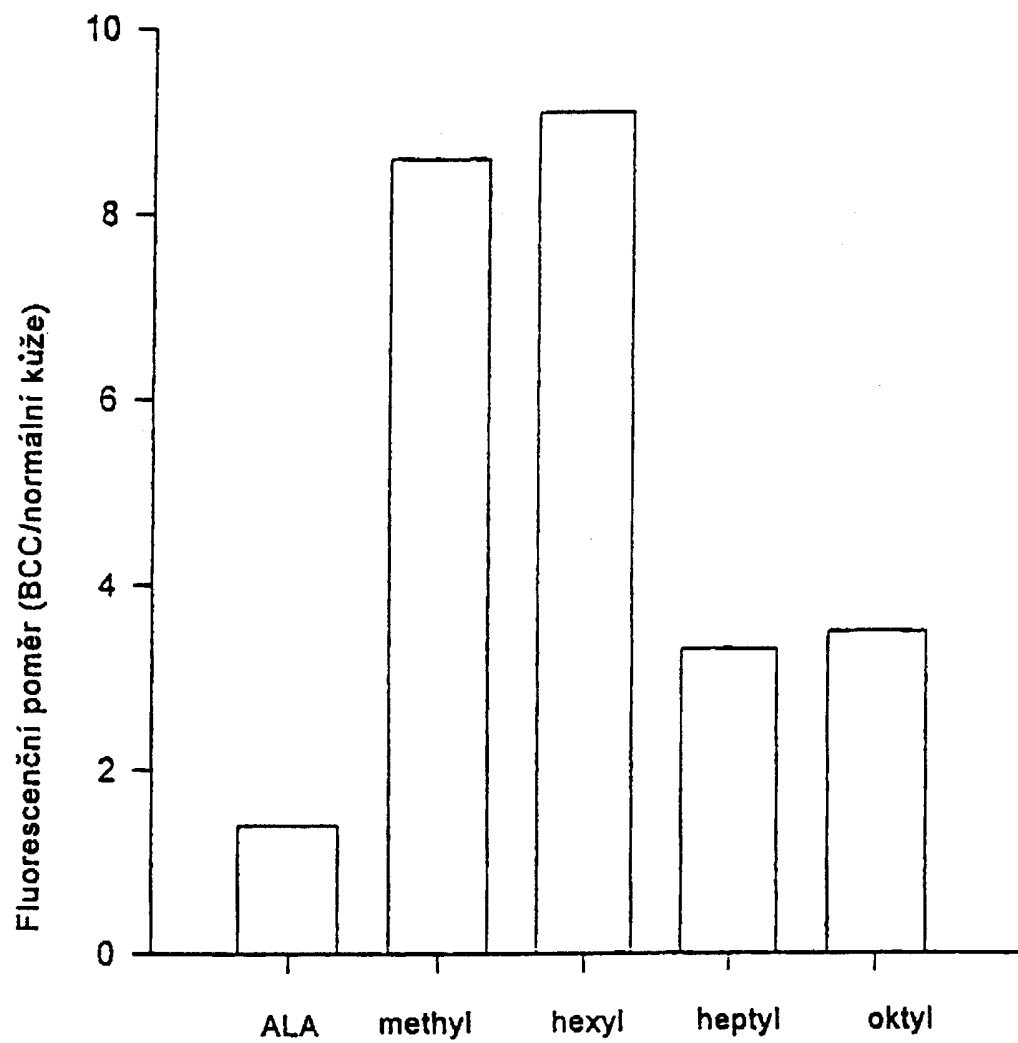




Obr. 21

Obr. 22





Obr. 23