

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

295 734

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

A 61 K 41/00

A 61 P 29/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-2822**
(22) Přihlášeno: **14.01.1998**
(30) Právo přednosti: **11.02.1997 US 1997/797963**
02.10.1997 US 1997/942883
(40) Zveřejněno: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)
(47) Uděleno: **05.08.2005**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **12.10.2005**
(Věstník č. 10/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/IB1998/000181**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/034644**

(73) Majitel patentu:

QLT INC., Vancouver, CA
THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA,
Vancouver, CA
Novartis Ophthalmics AG, Hettlingen, CH

(72) Původce:

Richter Anna M., Vancouver, CA
Levy Julia G., Vancouver, CA
Hariton Claude A. A., Sillery, CA
Huber Gustave, Raftz, CH
Stewart William C., James Island, SC, US
Fsadni Mario Giulio, Bulach, CH

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS Praha, a.s., Jivenská 1273/1, Praha 4,
14021

(54) Název vynálezu:

**Léčivo pro omezení nebo prevenci účinků
zánětů v tkáni**

(57) Anotace:

Použití fotosenzibilizačního prostředku pro výrobu léčiva pro omezení nebo prevenci účinků zánětu vznikajícího v poraněné tkáni uvedením poraněné tkáně nebo tkáně před poškozením do kontaktu s fotosenzibilizačním prostředkem a vystavením tkáně světlu o vlnové délce absorbované fotosenzibilizačním prostředkem.

CZ 295734 B6

Léčivo pro omezení nebo prevenci účinků zánětů v tkáni

Oblast techniky

5

Vynález se obecně týká oblasti farmakoterapie a použití fotodynamické terapie (photodynamic therapy, „PDT“) k oslabování nebo prevenci zánětů v důsledku poranění tkáně, ať už vnitřního, například při chirurgickém zákroku, nebo náhodného, jako jsou tržné rány, poranění kloubů a šlach, a při léčbě obětí popálenin. Ve výhodném provedení se vynález týká použití „nízkých dávek“ PDT k léčbě oční tkáně, kde dochází k zánětům vlivem manipulace s oční tkání, zejména pokud zánět představuje komplikaci při zotavování pacienta po nezbytném zákroku. Běžné aplikace zahrnují zánětlivé onemocnění očí a různé typy oční chirurgie nebo laserového zákroku, jako je transplantace a filtrační oční chirurgie, používaná obvykle při léčbě glaukomu. Ve zvláště výhodném provedení se vynález týká prodloužení přežití filtrační vzduchové bubliny pro zlepšení výsledku filtrační chirurgie.

15

Dosavadní stav techniky

20 Zánět obecně:

Čtyři hlavní příznaky, obvykle související se zánětem, jsou 1) zarudnutí, 2) otok, 3) teplo a 4) bolest, a případným pátým hlavním příznakem bývá ztráta funkce napadené části. Zatímco poranění spouští složitou řadu dějů, z nichž k mnohým dochází současně a jsou navzájem různým způsobem svázány, je známo, že při vyvolání zánětu se významným způsobem podílejí malé cévy. Zánět je ve skutečnosti jedním z cenných obranných mechanismů těla a obvykle se soudí, že má tři fáze: degenerativní fázi, vaskulární fázi a fázi hojení; viz Klein, „Defense Reactions in Action“, *Immunology, The Science of Self–Nonself Discrimination*, kap. 14, 577–84 (1982).

25

Konkrétně dochází v degenerativní fázi k otoku napadených buněk, primárně epidermálních buněk a fibroblastů, přičemž se vakuolizuje jejich cytoplasma a jejich jádra se zvětšují a fragmentují. Některé z destiček v poškozených cévách dezintegrují a uvolňují serotonin a jiné mediátory, působící na zakončení sympatického nervu.

30

Vaskulární fáze je charakterizována změnami cév, intenzivní migrací a aktivitou tzv. zánětlivých buněk (granulocyty – zejména neutrofilů, lymfocyty, monocyty a makrofágy) a mizení degenerovaných buněk a zbytků buněk. Dochází k zaplavení, ucpání a přeplnění kapilární sítě a postkapilárních žilek při aktivní hyperémii. Protože vzrůstá také počet kapilár, je pozorováno načervenalé zbarvení zanícené tkáně, nazývané také „zarudnutí“. Zvětšený průtok krve také způsobuje, že teplota zanícené tkáně, nazývané také „zarudnutí“. Zvětšený průtok krve také způsobuje, že teplota zanícené oblasti se přibližuje teplotě aortální krve, teplejší oproti okolní normální tkáni, což dává pocit tepla.

35

40

Při poranění uvolňuje poškozená tkáň látky, známé jako příbuzné histaminu, nazývané H substance, které jsou směsí histaminu a serotoninu, uvolněného z rozpadlých žírných buněk tkáně. H substance způsobují aktivní dilataci cév a endoteliální buňky dilatované cévy se navzájem oddělují, čímž se zvětšují mezery mezi nimi. Endotelová výstelka cév se postupně pokrývá leukocyty, přičemž dochází k vytlačování části tekutiny do okolní tkáně. Tekutina bohatá na proteiny, která uniká z cévy do okolní tkáně, způsobuje otok tkáně. Unikající tekutina obsahuje rovněž látky, které neutralizují bakteriální toxiny a napomáhají destrukci původce zánětu.

45

50

Leukocyty, zejména neutrofilů a monocyty, se pohybují v cévách, dokud nenaleznou vhodnou skupinu, kterou by mohly přejít do perivaskulárních struktur a prostorů tkáně. Leukocyty napadají mrtvé a umírající buňky, tráví je intracelulárně pomocí fagocytosy nebo extracelulárně

pomocí proteolytických enzymů, které uvolňují po své smrti z lysozymů. Má se za to, že stimuly pro migraci leukocytů přicházejí z poraněné tkáně ve formě chemotaktických faktorů.

5 Jinými typy buněk, silně ovlivněných poraněním tkáně, jsou krevní destičky. Krátce po poranění dochází k přilnutí destiček, jednotlivých nebo ve shlucích, ke stěnám cév. Současně se začínají objevovat fibrinová vlákna, tvořící jemné síto, které pomáhá buňky zachycovat. Vzniklá sraženina spojuje navzájem okraje porušené tkáně.

10 Intra- a extracelulárním trávením nekrotické tkáně neutrofilů a monocytů vzniká tekutina, která se spojuje se serózním materiálem vytlačovaným z cév. Vznikne-li absces, je dutina vystlána pyrogenní membránou, která u ran infikovaných bakteriemi brání šíření a množení patogenních mikroorganismů do krve.

15 V prvních dvou fázích zánětlivého procesu dojde buď ke zničení cizího tělesa, například je-li tímto tělesem organismus, nebo k uvolnění okolní tkáně, je-li cizím tělesem například úlomek. Ve fázi hojení začíná zánět ustupovat, jednotlivé cévy a vaskulární systémy se stávají opět normálními a začíná hojení rány. Proces hojení má tři hlavní děje: 1) tvorbu nové pojivové tkáně proliferujícími fibroblasty, 2) regeneraci epitelu a 3) vybudování nových kapilár.

20 Již před ústupem zánětu se do poraněné oblasti začínají stahovat fibroblasty z okolní normální tkáně, kde obvykle existují v klidovém stavu. Pohybují se améboidním pohybem podél vláken fibrinu a rozptylují se po oblasti hojení. Jakmile jsou fixovány v určité poloze v poraněné tkáni, začínají syntetizovat a vylučovat kolagen, který se uspořádává do vláken. Vlákna se orientují s podélnou osou ve směru největšího namáhání. Jak získávají kolagenové svazky na pevnosti, 25 fibroblasty postupně degenerují a pevně se na tyto svazky uchycují, a tak se poraněná oblast přeměňuje na tkáň jizvy.

30 Současně s tvorbou tkáně jizvy začínají intaktní epidermální buňky na okraji rány proliferovat a pohybují se jako jedna vrstva ke středu poraněné oblasti. Jak zánět ustupuje, vzrůstá potřeba přímé dodávky krve a do rány začínají vrůstat nové cévy.

35 Je známo, že v molekulárním pohledu na zánět je spolu navzájem složitým způsobem v interakci množství účinných sloučenin. Mezi buňky poškozené poraněním patří žírné buňky, které uvolňují mediátory spouštějící časnou fázi vasodilatace, doprovázenou oddělováním buněk endotelu a obnažením kolagenových vláken v subendoteliální vrstvě. Vlákna v mezibuněčných mezerách, která se tvoří v cévách, zachycují krevní destičky a spouštějí uvolňování mediátorů z těchto buněk.

40 Kromě krevních destiček interagují obnažená kolagenová vlákna také s bílkovinami plasmy, které pronikají póry stěny rozšířené cévy, včetně spouštěcího faktoru kaskády srážení krve. Tyto proteiny iniciují rovněž kaskádu kinin-bradykinin, produkující bradykinin, který se účastní vasodilatace, zvyšování průchodnosti cév a chemotaxi.

45 Čtvrtý molekulární systém, komplementární kaskáda, může být aktivován několika stimuly: poškozenými cévami, proteolytickými enzymy uvolňovanými z poškozených buněk, membránovými složkami přítomných bakterií a komplexy antigen-protilátka. Některé z aktivovaných složek komplementu působí jako chemotaktické faktory, odpovědné za přístup leukocytů do zraněné oblasti. Jiné usnadňují fagocytózu a účastní se buněčné lýze.

50 Oční zánět

55 Glaukom je oční onemocnění, při kterém vysoký nitrooční tlak způsobuje poruchu vidění jednotlivce. V normálním oku je epiteliálními buňkami řasnatého tělíska, které je umístěno kolem vnitřního obvodu duhovky (směrem dovnitř oční bulvy), produkována tekutina. Funkce této tekutiny zahrnují vyživování buněk v oku a udržování pozitivního tlaku v oční bulvě, který je nezbytný

ný k udržení správného prostorového rozložení zrakových orgánů nutných pro tvorbu obrazu, podobně jako je tomu u nosné konstrukce kamerového tělesa u fotografického přístroje.

5 Tekutina je normálně z oka odstraňována filtrací přes trabekulární tkáň, což je kruhové těleso umístěné po obvodu v úhlu mezi duhovkou a rohovkou v přední části oka. Tekutina typicky odchází mikroskopickými otvory v trabekulární tkáni do Schlemmova kanálu a pak do kolekto-
rových kanálů, které ji vedou do episklerálních cév a ven z oka. V patologii glaukomu je odtok
10 tekutiny z oka snížen, což má za následek ostrý vzrůst nitroočního tlaku, poškození vnitřních tkání oka a nakonec úplnou ztrátu zraku.

10 Terapeutický cíl při léčbě glaukomu je vždy tentýž, tj. snížení nitroočního tlaku, a to buď snížením produkce tekutiny, nebo zvýšením jejího odtoku nebo „filtrace“ ven z oka. Existuje mnoho způsobů, jak tohoto cíle dosáhnout, ale na prvním místě je vždy medikace. Není-li medikace při
15 regulaci zvýšeného nitroočního tlaku úspěšná, používají se jiné, invazivnější metody, jako je ošetření laserem nebo chirurgický zákrok.

20 Laserové metody zahrnují trabekuloplastiku, při níž se používá laseru k vypálení otvorů v trabekulární tkáni. Chirurgické metody zahrnují 1) trabekulotomii, kde se používá kovová sonda nebo „trabekulotom“ k vytvoření otvoru mezi Schlemmovým kanálem a přední komorou oka po zhruba jedné třetině obvodu normálního výtokového úhlu, 2) trabekulektomii, při níž se provede řez trabekulární tkání, a 3) iridektomii, při níž se vyřezávají části duhovky. Sklerostomie zahrnuje řez bělimou buď laserem, nebo chirurgickým nástrojem. Trabekulektomie, iridektomie i sklerostomie jsou spojeny s vytvořením filtračního „puchýřku“, tj. váčku, do něhož se svádí
25 přebytečná oční tekutina a tak se urychluje její odchod z oka.

30 Chirurgická náprava filtrace při glaukomu je obvykle doporučována pro pacienty, kteří mají progresivní glaukomatózní poškození, a pro ty, kteří při své současné úrovni očního tlaku nesou významné riziko postupu onemocnění. U pacientů s vážným poškozením se zlepši dlouhodobá prognóza, je-li možno nitrooční tlak (intraocular pressure, IOP) snížit na méně než 20 mm Hg a udržovat jej pod touto úrovní. Filtrační chirurgie se tedy silně doporučuje u pacientů s pokročilým poškozením a očním tlakem nad 18 až 20 mm Hg.

35 Tato chirurgie obecně spadá do dvou kategorií: 1) postupy v celé tloušťce nebo 2) postupy v chráněném kanálku. Typický postup v chráněném kanálku, který je z obou jednodušší, zahrnuje:

- a) odtažení víčka,
- b) penetraci limbu (průsvitná tkáň, která představuje přechod mezi neprůhlednou bělimou a čírou rohovkou) za účelem vytvoření otvoru do přední komory (ohrazeného barevnou duhovkou a čírou rohovkou pokrývající duhovku) z vnějšku přední části oka,
- 40 c) odhrnutí vnějších vrstev spojivky v místě pod duhovkou a vyříznutí trojúhelníkového bělimového laloku se základnou trojúhelníku na limbu,
- d) vniknutí do přední komory ze základny trojúhelníkového bělimového laloku,
- e) vyříznutí části vespod ležící trabekulární tkáně pro vytvoření spojovacího kanálku,
- 45 f) vyříznutí malé části duhovky skrze kanálek,
- g) uzavření bělimového laloku šitím,
- h) uzavření spojivky šitím a
- i) injekční aplikaci fyziologicky přijatelné tekutiny, jako je základní solný roztok (basic salt solution, BSS) do přední komory vnějším otvorem procházejícím limbem, který byl vytvořen v kroku b), pro vyzdvižení váčku podél limbu za účelem ověření, že kanálek není ucpaný
50 a že váček neuniká.

Postup v celé tloušťce se liší v tom, že se pro spojení přední komory se subkonjunktiválním prostorem přes limbus vytvoří přímý otvor bez bělimového laloku. Po odtažení vnějších vrstev spojivky se kanálek vytvoří sklerotomií (vyříznutí okraje tkáně z bělimy na limbu), tepelnou sklerostomií (vyříznutí mělké drážky v bělimě rovnoběžné s povrchem limbu), laserovou sklerostomií nebo trepanací; viz Stewart, „Filtering Surgery – Techniques and Operative Complications“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 10, 333–61 (1990).

Po chirurgickém výkonu se pravidelně kontroluje stav filtračního váčku. Zpočátku je kanálek obvykle dosti vysoko nad bělimou. Oči mnoha pacientů vykazují první den po operaci začínající oblast avaskularity ve spojivce, obvykle kolem místa kanálku. Avaskulární oblast je identifikována jako lokalizovaný úbytek kapilár a cévek. Při vyšetření přední komory však může být přítomno menší zarudnutí ukazující na zánět. IOP v prvním týdnu po operaci je obvykle nižší než 5 mm Hg, ale může být i v rozmezí 6 až 10 mm Hg. Po počátečním vyšetření se u pacienta obvykle zahajuje léčba kombinací antibiotik a steroidů; viz Stewart, „Postoperative Complications of Filtering Surgery“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 11, 363–90 (1990).

Ve druhém až čtvrtém týdnu po operaci se snižuje zánět spojivky a váčku a přední komora se s poklesem zarudnutí „uklidňuje“. Jako důsledek zajizvení se také váček obvykle poněkud zmenšuje. Navíc váček obvykle dále vyazuje avaskulární oblast, jejíž velikost se může zvětšit. IOP ve druhém až čtvrtém týdnu po operaci obvykle stoupne na 10 mm Hg nebo více; viz Stewart, „Postoperative Complications of Filtering Surgery“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 11, 363–90 (1990).

Po čtyřech týdnech po operaci bez komplikací má obvykle spojivka pouze malý nebo žádný zánět. Dobře fungující váček si typicky uchovává avaskulární oblast a může být umístěn buď minimálně, nebo v dostatečné výšce nad bělimou. IOP se navíc během této doby stabilizuje, ideálně mezi 10 a 15 mm Hg. Topické postoperativní steroidy se pomalu snižují v závislosti na velikosti zánětu ve filtračním váčku a přední komoře. Pokud zůstává váček vaskulární a zánětlivý, dávky steroidů se obvykle udržují a někdy zvyšují pro uspišení zmizení zánětu jakéhokoli předního segmentu, a tudíž omezení tvorby jizev; viz Stewart, „Postoperative Complications of Filtering Surgery“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 11, 363–90 (1990).

Během časně pooperační doby po filtrační chirurgii mohou u pacienta bohužel nastat různé komplikace, z nichž jednou je selhání váčku. U mnoha pacientů dochází během 1 až 6 pooperačních měsíců k selhání váčku a nakonec váček oční tlak nekontroluje. Klinicky mají špatně fungující váčky malý objem, nejsou dost vysoko a dochází u nich alespoň k částečné vaskularizaci a IOP se opět zvýší nad normální rozsah; viz Stewart, „Postoperative Complications of Filtering Surgery“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 11, 363–90 (1990).

Úspěch filtrační chirurgie závisí na tom, jak dlouho po chirurgickém zákroku zůstane váček funkční. Selhání váčku u pacientů obvykle vzniká buď po ucpání místa kanálku, nebo po zajizvení rozhraní mezi spojivkou a bělimou. Je-li blokováno místo kanálku, je možno použít jednu z několika metod laserové terapie. I když se tak však otevře kanálek, může být odtok vody omezen v důsledku předchozího zajizvení váčku do bělimy. Pokud tyto postupy selžou a IOP pacienta nelze omezit maximální medikací, může být nutno provést další filtrační chirurgii v jiném místě. Zůstává-li kanálek otevřený, ale váček je malý, je zvýšený IOP pravděpodobně důsledkem zajizvení mezi spojivkou a bělimou, což je nejobvyklejší příčina selhání váčku; viz Stewart, „Postoperative Complications of Filtering Surgery“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 11, 363–90 (1990).

Manipulace s očními tkáněmi, zvláště spojivkou, při filtrační chirurgii nutně způsobuje zánět a nakonec zajizvení. Obecně čím je manipulace větší, tím je kratší doba přežití váčku. Protože filtrační chirurgie u pacientů s vysokým rizikem glaukomu často vyústí v selhání jako výsledek pooperačního zjizvení, zdá se, že v tomto procesu hrají kritickou roli fibroblasty; viz Katz a spol., „Mitomycin C versus 5-Fluorouracil in High-risk Glaucoma Filtering Surgery“, *Ophthalmology*,

102–9, 1263–68 (1995). Jedním z primárních důvodů selhání při filtrační chirurgii glaukomu je přítomnost fibroblastů v subkonjunktivální tkáni (Berlin a spol., „The Role of Laser Sclerostomy in Glaucoma Surgery“, *Current Opinion in Ophthalmology*, 6:102–114 (1995)) a když operace selže, je to obvykle proto, že ve filtračním místě došlo k proliferaci fibroblastů a zajizvení (Mora a spol., „Trabeculectomy with Intraoperative Sponge 5-Fluorouracil“, *Ophthalmology*, 103:963–70 (1996)).

U tzv. „vysoce rizikových“ pacientů, kde dochází k velkému procentu selhání váčku vlivem fibrózy, někdy pomáhá střídání chirurgie s léčbou pro prodloužení přežití filtračního váčku. Ke snížení zánětu a zajizvení bylo navrženo mnoho metod, které prodlužují funkci filtračního váčku vytvořeného filtrační chirurgií, jako je jednoduchá masáž oka prsty, prováděná periodicky po dobu asi čtyř týdnů po operaci.

Byly vyzkoušeny rovněž farmakologické metody k omezení zajizvování pomocí inhibice zánětlivé odpovědi a prevence tvorby kolagenu v určitých stupních jeho syntézy. Pro lepší prevenci zajizvení váčku inhibicí zánětlivé odpovědi a proliferace fibroblastů se často používají kortikosteroidy, buď topicky jako kapky, nebo jako subkonjunktivální injekce; viz Stewart, „Filtering Surgery – Techniques and Operative Complications“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 10, 333–61 (1990). V topickém podávání steroidů se obvykle pokračuje, dokud nezanikne zánět předního segmentu; viz Stewart, „Postoperative Complications of Filtering Surgery“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 11, 363–90 (1990). Typický program léčby by mohl předepisovat postoperativní topickou aplikaci každé tři hodiny s rychlým snižováním během 20 dní apod.; viz Araujo a spol., „A Ten-year Follow-up on a Prospective, Randomized Trial of Postoperative Corticosteroids after Trabeculectomy“, *Ophthalmology*, 102:1753–59 (1995).

5-Fluorouracil („5-FU“) je fluorovaný pyrimidinový analog s antimetabolickou aktivitou (kompetitivní inhibitor thymidylátsynthasy), který také vykazuje antifibrotický účinek při snižování proliferace fibroblastů, a tak brání vzniku jizev filtračního váčku. 5-FU se typicky používá v případech se špatnou prognózou chirurgie. Při kontrole po 2 letech vykázal 5-FU úspěšnost při filtrační chirurgii mezi 60 a 70 %. 5-FU se obvykle podává v řadě subkonjunktiválních injekcí.

Kromě nepříjemnosti a nepohodlí častých a opakovaných pooperačních injekcí byly u subkonjunktiválního 5-FU hlášeny četné vážné komplikace, zahrnující epiteliální defekty, subepiteliální zjizvení, rohovkové vředy, únik z poraněné spojivky, únik z váčku, suprachoroidální krvácení, odchlípení rohovky a endoftalmitis. I když tedy 5-FU může prodloužit životnost váčku, zůstává díky obecné toxicitě tohoto prostředku vysoký i výskyt epiteliálních defektů rohovky, zjizvení a vaskularizace; viz Stewart, „Filtering Surgery – Techniques and Operative Complications“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 10, 333–61 (1990), dále Khaw a spol., „Five-minute Treatments with Fluorouracil, Floxuridine, and Mitomycin Have Long-term Effect on Human Tenon's Capsule Fibroblasts“ *Arch. Ophthalmol.*, 110:1150–54 (1992), Kupin a spol., „Adjunctive Mitomycin C in Primary Trabeculectomy in Phakic Eyes“, *Am. J. of Ophthalmology*, 119:30–39 (1995), a Katz a spol., „Mitomycin C versus 5-Fluorouracil in High-risk Glaucoma Filtering Surgery“, *Ophthalmology*, 102:9, 1263–69 (1995), dále Kay a spol., „Delivery of Antifibrolast Agents as Adjuncts to Filtration Surgery – Part II: Delivery of 5-Fluorouracil and Bleomycin in a Collagen Implant: Pilot Study in the Rabbit“, *Ophthalmic Surg.*, 17:796–801 (1986), a Khaw a spol., „Effects of Inoperative 5-Fluorouracil or Mitomycin C on Glaucoma Filtration Surgery in the Rabbit“, *Ophthalmology*, 100:367–72 (1993).

Někteří autoři uvádějí, že otoku rohovky vlivem neúmyslné nitrooční expozice je možno zabránit použitím nižší koncentrace 5-FU, například 0,5 ml 10 mg/ml 5-FU, při obvyklých subkonjunktiválních injekcích; viz Chalfin a spol., „Corneal Endothelial Toxic Effect Secondary to Fluorouracil Needle Bleb Revision“, *Arch. Ophthalmol.*, 113:1093–94 (1993). Jiní uvádějí, že použití 5-FU může být bezpečnější a účinnější při intraoperativní aplikaci s použitím houby nasáklé 50 mg/ml sloučeniny a jejím kontaktem s místem váčku po krátkou dobu; viz Mora a spol., „Trabeculectomy with Intraoperative Sponge 5-Fluorouracil“, *Ophthalmology*,

103:963–970 (1996). I tehdy jsou však v některých případech nutné dodatečné postoperativní injekce, které jsou stále spojeny s nežádoucím vysokým výskytem poškození epitelu rohovky.

5 Desoxyribosylovaný cukr fluoruracilu, floxuridin, je při dlouhodobé inhibici očních fibroblastů asi 100krát účinnější než fluoruracil a může být proto podáván v jedné dávce. Rozdíl v případě usmrcení buněk místo jejich inhibice je však relativně malý. Proto je v případě použití floxuridinu nebezpeční expozice normálních tkání relativně vysokým dávkám potenciálně cytotoxických látek; viz Khaw a spol., „Five-minute Treatments with Fluorouracil, Floxuridine, and Mitomycin Have Long-term Effects on Human Tenon's Capsule Fibroblasts“, *Arch Ophthalmol.*, 110:1150–54 (1992).

15 Podobné účinky byly pozorovány u mitomycinu nebo mitomycinu C („MMC“). Protože je účinnější než 5-FU, může být mitomycin rovněž podán v jedné intraoperativní aplikaci, typicky s dobou kontaktu asi 1 až 5 min s následným hojným výplachem. MMC je alkylační antiproliferativní prostředek, izolovaný z fermentačního filtrátu určitého druhu *Streptomyces*. Jedná se o antifibrotické antineoplastické antibiotikum, které brání zajizvení filtračních váčků tím, že inhibuje proliferaci fibroblastů. Je obvykle účinné při snižování postoperativní subkonjunktivální fibrózy, a tudíž vede k prodloužení doby přežití filtračních váčků a ke snížení IOP.

20 MMC je však ve vysokých koncentracích také cytoidní a vyvolává až u 1/3 ošetřených pacientů nežádoucí oční hypotonii (IOP nižší než 5 nebo 6 mm Hg). Dalšími nežádoucími vedlejšími účinky jsou únik ranou ve spojivce, odchlípení cévnatky a hypotonická makulopatie s asi 25% pravděpodobností pozdního nástupu úniků z váčku; viz Khaw a spol., „Five-minute Treatments with Fluorouracil, Floxuridine, and Mitomycin Have Long-term Effects on Human Tenon's Capsule Fibroblasts“, *Arch Ophthalmol.*, 110:1150–54 (1992), Zacharia a spol., „Ocular Hypotony after Trabeculectomy with Mitomycin C“, *Am. J. of Ophthalmology*, 116:314–26 (1993), Kupin a spol., „Adjunctive Mitomycin C in Primary Trabeculectomy in Phakic Eyes“, *Am. J. of Ophthalmology*, 119:30–39 (1995), Katz a spol., „Mitomycin C versus 5-Fluorouracil in High-risk Glaucoma Filtering Surgery“, *Ophthalmology*, 102:9, 1263–69 (1995), Shin a spol., „Adjunctive Subconjunctival Mitomycin C in Glaucoma Triple Procedure“, *Ophthalmology*, 102:10, 1550–58 (1995), Nouri-Mahdavi a spol., „Outcomes of Trabeculectomy for Primary Open-angle Glaucoma“, *Ophthalmology*, 102:12, 1760–69 (1995) a Mora a spol., „Trabeculectomy with Intraoperative Sponge 5-Fluorouracil“, *Ophthalmology*, 103:963–70 (1996). Jedna skupina výzkumníků zaznamenala po topickém ošetření MMC během trabekulektomie dokonce zvýšený výskyt skleritidy doprovázené intenzivní bolestí a zarudnutím 35 bělmy; viz Fourman, „Scleritis after Glaucoma Filtering Surgery with mitomycin C“, *Ophthalmology*, 102:10, 1569–71 (1995), dále Liang a spol., „Comparison of Mitomycin C and 5-Fluorouracil on Filtration Surgery Success in Rabbit Eyes“, *J. Glaucoma*, 1:87–93 (1992).

40 Další vědci popsali použití laserové sklerostomie spolu s aplikací buď 5-FU, nebo MMC. Zatímco použití 5-FU, aplikovaného během dvou týdnů po laserovém ošetření, bylo popsáno jako úspěšné, viz Berlin a spol., „The Role of Laser Sclerostomy in Glaucoma Surgery“, *Current Opinion in Ophthalmology*, 6:11, 102–114 (1995), bylo předpokládáno, že použití MMC aplikovaného různými kanály (subkonjunktivální injekce, subkonjunktivální gelová pěna, topické kapky nebo absorpční houbička) spolu s laserovým ošetřením může být ještě účinnější. Byly však také zaznamenány obvyklé komplikace, tj. korneální toxicita, únik z rány, chronická hypotonie, odchlípení cévnatky a hypotonická makulopatie.

50 K inhibici síťování kolagenových vláken se používá beta-aminopropionitril („BAPN“) a D-penicilamin, které mohou napomoci udržovat kolagen po filtrační chirurgii v nezralém stavu a tak omezit zajizvování váčku. Počáteční zpráva o postoperativní aplikaci topické masti BAPN uvádí, že u 74 % pacientů byl IOP udržen pod 22 mm Hg. Studie na zvířatech s použitím jak BAPN, tak D-penicilaminu však vykázaly pouze omezenou účinnost; viz Stewart, „Filtering Surgery – Techniques and Operative Complications“, *Clinical Practice of Glaucoma*, kap. 10, 55 333–61 (1990).

Diskuzi k bleomycinu viz Khaw a spol., „Effects of Inoperative 5-Fluorouracil or Mitomycin C on Glaucoma Filtration Surgery in the Rabbit“, *Ophthalmology*, 100:367-72 (1993). Diskuzi k polymerům impregnovaných cytosinarabinosidem viz Lee a spol., „Effects of Cytosine Arabinoside-impregnated Bioerodible Polymers on Glaucoma Filtration Surgery in Rabbits“, *J. Glaucoma*, 2:96-100 (1993).

Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, „PDT“) je známa jako uznávaná metoda léčby nádorů, která může být použita pro mnoho účelů, jako je léčba solidních tumorů (například patenty US 4 932 934 a 5 283 255), rozrušování cílů v krvi, jako jsou leukemické buňky, imuno-reaktivní buňky patent US 5 776 966, patent US 5 807 881, patent US 5 789 433 a patent US 5 868 695) a nežádoucí mikroorganizmy (patent US 5 360 734), prevence restenózy (patent US 5 422 362); diagnostika a léčba určitých neovaskulárních očních poruch (patent US 5 707 986, patent US 5 798 349 a patent US 5 756 541); odstraňování aterosklerotických plátů (patent US 5 834 503) a prevence odmítnání transplantátů (mezinárodní přihláška zveřejněná pod číslem WO 96/21 466).

PDT spočívá v lokální nebo systémové aplikaci fotosensitivního prostředku absorbujícího světlo, obvykle porfyrinového derivátu, který se selektivně hromadí v cílových tkáních. Při ozáření viditelným světlem o aktivační vlnové délce vznikají v buňkách obsahujících fotosenzibilizátor reaktivní kyslíkaté látky, které podporují odumírání buněk. Například při léčbě nádorů se má za to, že proces fotosenzibilizace vede ke vzniku singletového kyslíku, což je aktivovaný derivát molekulárního kyslíku, který může oxidativně reagovat s různými specifickými místy v buňkách a ve tkáních. V důsledku toho dochází k ireversibilnímu poškození nádorových buněk na subcelulární úrovni, zejména v buněčné membráně a mitochondriích. Destrukce nádorů in vivo je výsledkem složité souhry několika faktorů ovlivňujících kostru pojivové tkáně, která fyzicky podepírá trámčinu nádoru a vaskulární tkáň, která vyživuje nádor; viz Zhou, „Mechanisms of Tumor Necrosis Induced by Photodynamic Therapy“, *J. of Photochem. and Photobiol., B: Biology*, 3, 229-318 (1989).

Je zřejmé, že fotosenzibilizátory jsou přednostně pohlcovány nádorovou tkání a hromadí se v ní a že určitá nekróza buněk nádorové trámčiny je selektivně a přímo vyvolávána PDT. Při nekrotizačním procesu v nádoru vyvolaném PDT však také dochází k vaskulárnímu poškození a následné anoxii nádorových buněk. Zejména v tomto posledním případě se nekróza nádorů vyvolaná PDT považuje za výsledek akutní zánětlivé reakce na fyziologické změny ve vaskulární stěně. Rychlý pokles dávky krve, stejně jako nástup otoku v nádoru, vede k hypoxii nebo dokonce k anoxii neoplastických buněk poškozených světlem, které nakonec podléhají nekróze. Celkový destrukční proces je násoben uvolňováním vasoaktivních nebo tkáň rozkládajících látek, jako je histamin, proteasy a kyselá fosfatázy ze světlem poškozených žírných buněk a neutrofilů v trámčině nádoru, které jsou také spojeny se zánětlivými procesy; viz Zhou, „Mechanisms of Tumor Necrosis Induced by Photodynamic Therapy“, *J. of Photochem. and Photobiol., B: Biology*, 3, 299-318 (1989).

Uznává se, že akutní zánětlivá fáze, obvykle vyvolávaná pomocí PDT při schválených postupech léčby nádorů, je dvojsečná zbraň. Studium experimentálních modelů nádorů ukázalo, že po aplikaci PDT proniká do extracelulárních buněk exsudát bohatý na proteiny a neutrální lipidy a hromadí se u „stěny“ z perinekrotických živých buněk („hypoxické buňky“), které jsou nalepovány na „duchy“ nekrotických buněk. Z hlediska pozitivní perspektivy léčby nádorů může zánětlivý exsudát napomoci dopravě fotosenzibilizátorů vázaných na proteiny do vnitřních oblastí nádoru, kterých by jinak bylo obtížné dosáhnout. Na druhé straně může toto proudění zánětlivého exsudátu také přinášet kyslík a jiné živiny a tak pomáhat vyživovat buňky účastnící se procesů hojení ran. Výskyt zánětlivého stavu spojeného s PDT se proto považuje za životní

skutečnost, která často komplikuje léčbu rakovinných nádorů; viz Freitas, „Inflammation and Photodynamic Therapy“, *J. Photochem. and Photobiol., B: Biology*, 8: 340–41 (1991).

5 PDT byla podrobena výzkumům za účelem dosažení antifibrózního účinku v souvislosti s filtrační chirurgií glaukomu s použitím cínethyltiopurpurinu („SnET2“) jako fotosenzibilizátoru. Konkrétně byli králíci, kteří dostávali subkonjunktivální injekce SnET2, podrobena filtrační chirurgii s následným pooperačním ozářením světlem; viz Hill a spol., „Photodynamic Therapy with Tin Ethyl Etiopurpurin as an Alternative Anti-fibrotic Treatment Following Glaucoma Filterin Surgery“, *Photochem. Photobiol.*, 61 dod., 68S, TPM–E9 (1995), a Hill a spol.,
10 „Photodynamic Therapy (PDT) for Antifibrosis in a Rabbit Model of Filtration Surgery“, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 36:4 S877 (1995). V těchto předchozích pracích však autoři neuvádějí žádné kontrolní údaje, takže je obtížné zjistit, nakolik ošetření podle Hilla a spol. skutečně prodloužilo životnost filtračního váčku oproti neošetřeným váčkům.

15 Hill a spol. kromě toho uvádějí, že po injekci fotosensitivního prostředku uběhly více než tři hodiny než byl vykonán chirurgický zákrok a ozařování, což mohlo poskytnout dost času k absorpci fotosenzibilizátoru tkáněmi souvisejícími s poraněním, ale mohlo také umožnit fotosenzibilizačnímu prostředku rozšířit se do jiných necílových oblastí oka. Protože autoři uvádějí, že vznikly velké přechodné oblasti avaskulární spojivky, přičemž avaskulární oblast byla omezena
20 na filtrační váček až po čtyřech týdnech od zákroku, je zřejmé, že ošetřením byly nežádoucím způsobem zasaženy velké oblasti oka. Vzhledem ke známému potenciálně destruktivnímu nekrotickému účinku PDT v jiných aplikacích existuje potřeba snížení nebo prevence zánětu takovým způsobem, aby bylo možno spolehlivě kontrolovat stupeň a rozsah farmakologické aktivity.

25

Podstata vynálezu

Nyní bylo překvapivě zjištěno, že při vhodném výběru fotosenzibilizačního prostředku, který je rychle absorbován poškozenými tkáněmi, ale v nepřítomnosti světla je netoxický, může mít PDT
30 předvídatelný a prospěšný protizánětlivý účinek, který je příznivý i pro choulostivé tkáně, jako je oblast oka. Je to zvláště překvapivé zjištění vzhledem k dřívějším poznatkům, že PDT je ve skutečnosti odpovědná za vyvolání zánětlivých odpovědí místo aby je snižovala nebo jim zamezovala.

35 Konkrétně bylo nyní zjištěno, že účinky zánětu vznikajícího v poranění tkáni mohou být omezeny nebo jim může být zabráněno aplikací nízkých dávek PDT.

Vynález se týká použití fotosenzibilizačního prostředku pro výrobu léčiva pro omezení nebo prevenci účinků zánětu vznikajícího v poranění tkáni uvedením poraněné tkáně nebo tkáně před
40 poškozením do kontaktu s fotosenzibilizačním prostředkem a vystavením tkáně světlu o vlnové délce absorbované fotosenzibilizačním prostředkem.

Použití podle vynálezu je zvláště výhodné, je-li poraněná tkáň vysoce citlivá vůči dalšími poškození nebo zánětu, jako je oční tkáň, protože příslušné fotosenzibilizátory nemají samy o sobě
45 v nepřítomnosti aktivačního záření antiproliferativní nebo cytotoxický účinek vůči jemným tkáním. Protože je dále většina fotosenzibilizačních prostředků netoxická pro lidskou tkáň, pokud nejsou aktivovány světlem, a protože fotosenzibilizační prostředek podle vynálezu je schopen poměrně rychlé penetrace do poškozené tkáně, dá se stupeň farmakologické účinnosti snadno kontrolovat jak rozsahem ozáření, tak buď rozsahem fyzikálního kontaktu s fotosenzibilizátorem,
50 nebo jeho koncentrací, například v krevním řečišti, v době ozáření. V důsledku toho se terapeutický účinek vynálezu reguluje snadněji než v případech známých farmakologických antifibrotických metod.

V dalším provedení se vynález týká použití fotosenzibilizačního prostředku pro přípravu léčiva
55 pro omezení nebo prevenci účinků zánětu vzniklého v poraněné tkáni, zahrnujícího

- a) asi 1 $\mu\text{g/ml}$ až asi 2 mg/ml fotosenzibilizačního prostředku schopného proniknout do poraněné tkáně nebo do tkáně před poraněním s důsledkem požadovaného stupně biodistribuce za méně než 1 hodinu a
- 5 b) farmaceuticky přijatelný nosič.

V dalším provedení se vynález týká nástroje pro omezení nebo prevenci účinků zánětu vzniklého v poraněné tkáni, zahrnujícího

- 10 a) fotosenzibilizační prostředek schopný proniknout do poraněné tkáně nebo do tkáně před poraněním s důsledkem požadovaného stupně biodistribuce za méně než 1 hodinu a
- b) absorpční aplikátor.

15 Přehled obrázků na výkresech

- Obr. 1 graficky znázorňuje procentický podíl přežití filtračních váčků u králíků v každé ze čtyř skupin.
- 20 Obr. 2 graficky znázorňuje rozdíly mezi skupinami s ohledem na rozsah váčku každý den vyšetření až do 12. pooperačního dne.
- Obr. 3 graficky znázorňuje rozdíly mezi skupinami s ohledem na výšku váčku každý den vyšetření až do 12. pooperačního dne.
- Obr. 4 graficky znázorňuje rozdíly v erythemu spojivky nad filtračním váčkem každý den vyšetření až do 12. pooperačního dne.
- 25 Obr. 5 znázorňuje vzorce typických zelených porfyrinů vhodných pro způsoby, přípravy a nástroje podle vynálezu.
- Obr. 6 znázorňuje strukturu čtyř sloučenin typu BPD zvláště vhodných jako fotosenzibilizační prostředky podle vynálezu.

30 Výraz „zánět“ se zde vztahuje na řadu změn, která probíhá v živém organismu po poranění. Poranění může být způsobeno fyzikálními prostředky, jako je nadměrné horko nebo chlad, tlak, ultrafialové nebo ionizující záření, řezné rány nebo oděrky; různými anorganickými nebo organickými chemickými látkami nebo biologickými činiteli jako jsou viry, bakterie a další parazité.

35 Fotosenzibilizační prostředek

„Fotosenzibilizační prostředek“ je chemická sloučenina, která, je-li vystavena světlu o vlnové délce, která může být fotosenzibilizátorem absorbována, absorbuje světelnou energii, což vede k žádoucímu fyziologickému účinku, například k řízenému protizánětlivému účinku. Fotosenzibilizační prostředky podle vynálezu mají výhodně absorpční spektrum v rozmezí vlnových délek mezi 350 a 1200 nm, přičemž toto spektrum může být známým způsobem upraveno na požadovanou penetraci, výhodně mezi asi 400 a 900 nm, zejména mezi 600 a 800 nm.

40

Další vlastnosti obecně fotosenzibilizátorů, která má praktický význam při provádění vynálezu, je relativní absence toxicity vůči buňkám v nepřítomnosti fotochemického efektu a snadná clearance z tkáni v nepřítomnosti cílově specifické interakce mezi jednotlivými buňkami a fotosenzibilizátorem.

45

Fotosenzibilizátorem podle vynálezu může být jakýkoli fotosenzibilizační prostředek vhodný pro fotodynamickou terapii („PDT“), který je schopen proniknout do poškozené tkáně, která má být ošetřena, a vyvolat požadovaný stupeň biodistribuce za méně než 1 hodinu. Zda je u potenciál-

50

ního fotosenzibilizátoru toto kritérium splněno, lze snadno a rychle zjistit tímto jednoduchým testem:

- 5 1. Připravit živou kulturu buněk (výhodně ze suspenzně pěstované kultury; vhodná je jakákoli buněčná linie).
2. Přidat testovaný fotosenzibilizátor k buňkám v koncentraci 1 až 3 $\mu\text{g/ml}$ v přítomnosti 10 % séra.
3. Odstranit odstředěním přebytečný fotosenzibilizační prostředek po různých dobách inkubace (například 5, 15, 30 a 60 min).
- 10 4. Promýt buňky fosfátem tlumeným fyziologickým roztokem a lyzovat je zmrazením a rozmrazením.
5. Stanovit koncentraci testovaného fotosenzibilizátoru v buněčných lyzátech na základě fluorescence proti vhodným standardům.

15 Zvláště účinná skupina fotosenzibilizátorů zahrnuje zelené porfyriny, které jsou podrobně popsány v patentu US 5 171 749 (Levy a spol.), vydaném 15. 12. 1992. Výraz „zelené porfyriny“ se vztahuje na porfyrinové deriváty, získané reakcí porfyrinového jádra s alkinem reakcí Diels–Alderova typu za vzniku monohydrobenzoporfyriu. Typicky se zelené porfyriny volí ze skupiny porfyrinových derivátů získávaných Diels–Alderovými reakcemi acetylenových derivátů s protoporfyriem za podmínek, které podporují reakci na pouze jedné ze dvou dostupných konjugovaných nearomatických dienových struktur přítomných v kruhových systémech protoporfyriu IX (kruhy A a B).

25 Několik struktur typických zelených porfyrinů je znázorněno na obr. 5. Diels–Alderova reakce vede nejprve ke vzniku cyklohexadienu – označovaného zde jako hydrobenzo – konjugovaného k pyrrolovému kruhu A nebo B, jak znázorňují vzorce 1 a 2 na obr. 5. Přesmyk π systému v hexadienovém kruhu vede ke vzniku sloučenin vzorce 3 a 4 a redukcí vzniknou sloučeniny vzorce 5 a 6. Z praktických důvodů se však sloučeniny vzorce 5 a 6 vyrábějí výše uvedenou Diels–Alderovou reakcí tak, že obvyklá acetylenová sloučenina je nahrazena odpovídajícím olefinem a vzniká více redukovaná verze výsledné struktury porfyrinového kruhu. Tyto sloučeniny jsou znázorněny vzorci 1 až 6, přičemž dusíky vnitřního kruhu okupuje vodík. Je však nutno mít na paměti, že je možno používat i formy, kde je jeden nebo oba tyto vodíky nahrazeny kovovým kationtem. Příprava zelených porfyrinových sloučenin vhodných pro provedení vynálezu je podrobně popsána v patentu US 5 095 030.

35 Z důvodu pohodlí se pro označení sloučenin vzorce 3 a 4 na obr. 5 obvykle používá zkratka termínu hydromonobenzoporfyriu – „BPD“. Sloučeniny vzorců 3 a 4 a jejich směsi jsou zvláště výhodné.

40 Jak je patrné z obr. 5, R^1 , R^2 , R^3 a R^4 jsou neinterferující substituenty, které významně neovlivňují účinnost sloučeniny ve způsobu a přípravku podle vynálezu. Konkrétně se výraz „neinterferující substituenty“ používá k označení substituentů, které nenarušují schopnost zeleného porfyriu působit jako fotosenzibilizátor schopný absorpce poškozenou tkáň a vyvolání farmakologického účinku za méně než 1 hodinu. Pro sloučeniny na obr. 5 a 6 obecně představují substituenty R^1 a R^2 každý nezávisle substituent odebírající elektrony nebo jakýkoli jiný aktivující substituent, který odebírá elektrony dostatečně na to, aby zvyšoval rychlost Diels–Alderovy reakce, která může probíhat jak na kruhu A, tak B, ale přednostně probíhá pouze v jednom kruhu. Jako příklady vhodných skupin R^1 a R^2 je možno uvést karbalkoxy (2–6C), alkyl (1–6C), sulfonyl nebo aryl(6–10C)sulfonyl, aryl(6–10C)kyan a CONR^5CO –, kde R^5 je aryl (6–10C) nebo alkyl (1–6C). Jedním ze substituentů R^1 a R^2 může být také vodík, pokud druhým je elektrony odnímající substituent o síle dostačující k usnadnění Diels–Alderovy reakce. Obvykle představují R^1 a R^2 karbalkoxyskupiny, výhodně methyl– nebo ethylkarboxyestery.

Výhodné jsou ty sloučeniny, kde R^1 a R^2 jsou stejné a představují karbalkoxy, zejména karbethoxy.

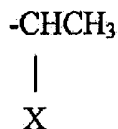
5 Zde používaný výraz „karboxy“ má obvyklý význam, tj. $-\text{COOH}$, zatímco „karbalkoxy“ představuje $-\text{COOR}$, kde R je alkyl. „Karboxyalkyl“ označuje substituent $-\text{R}'-\text{COOH}$, kde R' je alkylen a R je alkyl nebo alkanol. „Alkyl“ obecně představuje nasycenou uhlovodíkovou skupinu s přímým nebo rozvětveným řetězcem o 1 až 6 uhlíkových atomech, jako je methyl, n-hexyl, 2-methylpentyl, terc.butyl, n-propyl atd. „Alkylen“ je totéž co alkyl s tou výhradou, že tato skupina je dvojevazná a nikoli jednovazná. „Aryl“ představuje aromatickou cyklickou skupinu, jako je fenyl, naftyl, pyridyl apod. Arylová skupina podle vynálezu je popřípadě substituována 1 až 3 substituenty, které mohou být nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující halogen, jako je fluor, chlor, brom nebo jod, nižší alkyl (1-4C) a nižší alkoxy (1-4C). „Aryl-“ nebo „alkylsulfonylové“ skupiny mají vzorec $-\text{SO}_2\text{R}$, kde R je alkyl nebo aryl, jak jsou definovány výše.

15 R^3 nezávisle představuje ω -karboxyalkylovou skupinu (2-6C) nebo její sůl, amid, ester nebo acylhydrazon, a nebo znamená alkyl (1-6C). Výhodně představuje R^2 2-karboxyethyl nebo jeho alkyl- nebo alkanolester a R^4 je vinyl. Většinou z těchto provedení se však dává přednost z důvodu dostupnosti přírodních porfyrinů spíše než na základě úvah o biologické účinnosti. Jak je znázorněno na obr. 5, adukty vzniklé reakcí $R^1-\text{C}\equiv\text{C}-R^2$ s kruhovým systémem protoporfyrinu IX (kde R^3 je chráněná forma 2-karboxyethylu, jako je 2-karbomethoxyethyl nebo 2-karboethoxyethyl, a R^4 je $-\text{CH}=\text{CH}_2$) jsou sloučeniny vzorců 1 a 2. Sloučeniny vzorce 1 vznikají adicí na kruh A a sloučeniny vzorce 2 vznikají adicí na kruh B.

25 Výhodné výchozí látky pro zelené porfyriny podle vynálezu zahrnují v přírodě se vyskytující porfyriny, kde R^3 je buď $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CHRCONR}_2$, nebo $-\text{CH}_2\text{CHRCOOR}$, kde R je alkyl (1-6C) nebo zbytek „alkanolu (1-6C). Přesná povaha R^3 , pokud ovšem neobsahuje π -vazbu konjugovanou s kruhovou π -vazbou, obvykle není relevantní pro průběh Diels-Alderovy reakce nebo pro účinnost vzniklého produktu. R^3 tedy může znamenat kteroukoli z rozmanitých skupin, jako je například nižší alkyl (1-4C) a ω -karboxyalkyl (2-6C) a jeho estery a amidy. Substituent R^3 může být také substituován hydroxyskupinou, halogenem jako je fluor, chlor, brom nebo jod, nebo jinými nereaktivními substituenty.

35 Pokud R^3 představuje $-\text{CH}_2\text{CHR}-\text{COOR}$, ukázalo se výhodným esterifikovanou karboxyskupinu hydrolyzovat nebo parciálně hydrolyzovat. Typicky probíhá hydrolyza v poloze R^3 výhodně mnohem větší rychlostí než u esterových skupin R^1 nebo R^2 . Rozpustnost a biodistribuce u výsledných sloučenin mají navíc více žádoucí charakteristiky než u nehydrolyzované formy. Produkty hydrolyzy jsou dikyseliny nebo monokyseliny (nebo jejich soli).

40 Ve sloučeninách vzorce 1 a 2 představuje R^4 obvykle alespoň z počátku $-\text{CH}=\text{CH}_2$, ale tato vinylová skupina je snadno derivatizována na jiná provedení R^4 adicí nebo oxidací vinylového substituentu v kruhu B nebo A ve vzorci 1, resp. 2. R^4 tedy může znamenat kterýkoli z různých substituentů, které jsou konsistentní se vznikem snadnou adiční reakcí. Exemplární adiční činidlo může být například ve formě HX, kde H je adován na uhlík sousedící s kruhem, přičemž v poloze R^4 vznikne struktura



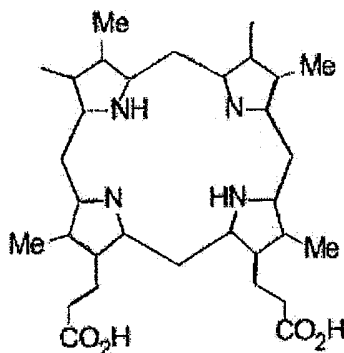
45

V jednom provedení je tedy jedním z adovaných substituentů vodík a druhý je vybrán ze skupiny zahrnující vodík, halogen, jako je fluor, chlor, brom nebo jod, hydroxy, nižší alkoxy, amino, amid, sulfhydryl nebo organosulfid. Například Markovnikovova adice vody poskytuje v relevantním kruhu strukturu substituentů analogickou hematoporfyrinovému kruhovému systému. Je také

možno vinylovou skupinu oxidovat a získat jako substituent v poloze R^4 skupinu $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$ nebo $-\text{COOH}$ nebo její soli nebo estery. Adiční nebo oxidační produkty samy mohou být také substituovány, jsou-li adovanými substituenty funkční odstupující skupiny. Například je-li substituentem Br, může být nahrazen takovými skupinami, jako je $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, kde R je výše uvedený alkyl (1-6C), halogen, $-\text{NH}_3$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$ apod.

Obecně tedy R^4 představuje jakýkoli substituent, v němž se snadno přemění vinylová skupina $-\text{CH}=\text{CH}_2$ odštěpením nebo adicí, a další substituenty vzniklé reakcí dobře odstupujících skupin s dalšími skupinami. Výhodně však R^4 představuje vinyl ($-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CHOR}^4$, kde R^4 je H nebo alkyl (1-6C), popřípadě substituovaný hydrofilním substituentem, jako je $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOR}^4$, jako je COOH nebo $-\text{COOCH}_3$, $-\text{CH}(\text{OR}^4)\text{CH}_3$, jako je $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ nebo $-\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{OR}^4)\text{CH}_2\text{OR}^4$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{SR}^4)\text{CH}_3$, jako je $-\text{CH}(\text{SCH}_3)\text{CH}_3$ a jeho disulfid, $-\text{CH}(\text{NR}^4)\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CN})\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{pyridiniumbromid})\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{COOR}^4)\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{COOCR}^4)\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2(\text{halo})\text{CH}_3$, jako je $-\text{CHBrCH}_3$, nebo $-\text{CH}(\text{halo})\text{CH}_2(\text{halo})$. Alternativně může být R^4 organická skupina s méně než 12 uhlíkovými atomy vzniklá přímou nebo nepřímou derivatizací vinylu. R^4 může také poskytovat další porfyrinový nebo příbuzný kruhový systém, jako je skupina obsahující 1 až 3 jádra dále definovaného tetrapyrrolového typu vzorce $-\text{L}-\text{P}$. Výhodně jsou sloučeniny, kde R^4 je $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{halo})\text{CH}_3$ nebo skupina obsahující 1 až 3 jádra dále definovaného tetrapyrrolového typu vzorce $-\text{L}-\text{P}$.

Zde používaný výraz „jádro tetrapyrrolového typu“ představuje čtyřkruhový systém se skeletem

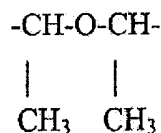


25 který je silně konjugovaný, nebo jeho sůl, ester, amid nebo acylhydrazon. Zahrnuje porfyrinový systém, což je ve skutečnosti kompletně konjugovaný systém, chlorinový systém, což je vlastně dihydroforma porfyrinu, a redukovaný chlorinový systém, což je tetrahydroforma konjugovaného porfyrinového systému. Je-li uveden konkrétně „porfyrin“, má se na mysli kompletně konjugovaný systém. Zelené porfyriny jsou ve skutečnosti dihydroforma porfyrinového systému.

30 V jednom provedení zahrnuje substituent R^4 alespoň jedno další jádro tetrapyrrolového typu. Výsledné sloučeniny podle vynálezu jsou dimery nebo oligomery, v nichž alespoň jeden kruhový systém tetrapyrrolového typu je zelený porfyrin. Vazba mezi skupinou zeleného porfyrinu v poloze R^4 a dalším kruhem tetrapyrrolového typu může být etherová, aminová nebo vinylická. Porfyrinové kruhové systémy mající dvě polohy dostupné pro substituci (v kruhu A i B) 35 odpovídající R^4 mohou být dále derivatizovány, jak je vysvětleno níže.

Jestliže R^4 znamená „ $-\text{L}-\text{P}$ “, je význam $-\text{L}-$ vybrán ze skupiny zahrnující

a)

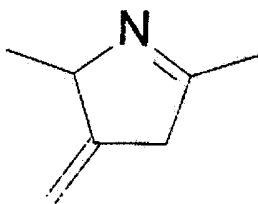


40

- b)
$$\begin{array}{c} \text{-CHNHCH-} \\ | \quad | \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$$
- c)
$$\begin{array}{c} \text{-CH=CH-CH-} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$$
- d)
$$\begin{array}{c} \text{-CH-CH=CH-} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$$
- e)
$$\begin{array}{c} \text{=CH-C-CH-} \\ || \quad | \\ \text{O} \quad \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{a}$$
- f)
$$\begin{array}{c} \text{-CH-C-CH=} \\ | \quad || \\ \text{CH}_3 \quad \text{O} \end{array}$$

5 a P je porfyrinová struktura nebo druhý zelený porfyrin vzorce 1 až 6, znázorněného na obr. 5, s tou výhradou, že jakákoli druhá skupina R^4 je nahrazena výše uvedenou skupinou.

(Je dále nutno zdůraznit, že má-li $-L-$ výše uvedený vzorec (e) nebo (f), má kruhový systém, na nějž je vázána dvojná vazba, resonanční systém odpovídající



10 v kruhu, na nějž je vázána dvojná vazba.)

15 Hydro-monobenzoporphyryny, které vznikají přímo výše popsanou Diels–Alderovou reakcí, mohou být izomerizovány na BPD sloučeniny vzorce 3 a 4 na obr. 5. Znázornění sloučenin 3 a 4 na obr. 5 neukazuje relativní polohu exocyklické methylové skupiny (kruh A ve vzorci 3 a kruh B ve vzorci 4) vzhledem k substituentu R^2 . Dostupné jsou oba izomery. Sloučeniny vzorce 3 a 4 jsou pro způsoby a přípravky podle vynálezu zvláště výhodné.

Diels–Alderovy produkty mohou být dále selektivně redukovány působením vodíku v přítomnosti katalyzátoru, jako je palladium na aktivním uhlí, za vzniku analogů s nasyceným kruhem, znázorněných vzorci 5 a 6 na obr. 5, které odpovídají příslušným Diels–Alderovým produktům kruhů A a B. Jak je vysvětleno výše, je však v praxi obvyklejší provádět Diels–Alderovu reakci s olefinickou výchozí látkou místo obvyklé acetylenické výchozí látky za účelem získání více redukované formy vzniklého porfyrinového kruhového systému. Popis uvedený výše pro sloučeniny vzorců 1 a 2, týkající se derivatizace přeměnou zbylého vinylového substituentu (R^4) a s ohledem na variabilitu R^3 , se vztahuje také na sloučeniny vzorců 3, 4, 5 a 6.

Výhodná provedení zelených porfyrinů podle vynálezu jsou ta, v nichž je Diels–Alderův produkt podroben přesmyku a částečně hydrolyzován. Ještě výhodnější jsou sloučeniny vzorců 3 a 4 (BPD), kde karbalkoxy skupiny v polohách R^3 byly také hydrolyzovány nebo částečně hydrolyzovány. Sloučeniny podle vynálezu, které obsahují $-\text{COOH}$ mohou být připraveny buď jako volná kyselina, nebo ve formě solí s organickými nebo anorganickými bázemi.

Obr. 6 znázorňuje čtyři zvláště výhodné sloučeniny podle vynálezu pokryté vzorci 3 a 4, které se souhrnně označují jako deriváty benzoporfyriu, tj. BPD–DA, BPD–DB, BPD–MA a BPD–MB. Jsou to hydrolyzované nebo částečně hydrolyzované formy přesmyknutých produktů vzorce 3 a 4, kde byla jedna nebo byly obě chráněné karboxylové skupiny R^3 hydrolyzovány. Esterové skupiny v R^1 a R^2 hydrolyzují relativně pomalu, takže konverze na formy znázorněné na obr. 6 probíhá snadno. Nejvýhodnější z těchto zelených porfyrinových sloučenin je BPD–MA.

Na obr. 6 je $R^3 -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOR}^{3'}$, kde $R^{3'}$ se v jednotlivých sloučeninách liší. Konkrétně v BPD–DA jsou R^1 a R^2 karbalkoxy, $R^{3'}$ je vodík a derivatizace je na kruhu A. BPD–DN je odpovídající sloučenina s derivatizací v kruhu B. BPD–MA představuje částečně hydrolyzovanou formu BPD–DA a BPD–MB částečně hydrolyzovanou formu BPD–DB. V těchto posledně uvedených sloučeninách je tedy R^1 a R^2 karbalkoxy, jedno $R^{3'}$ je vodík a druhé $R^{3'}$ je alkyl (1–6C).

Sloučeniny vzorců BPD–MA a BPD–MB mohou být homogenní, kde je hydrolyzován pouze karbalkoxyethyl kruhu C nebo karbalkoxyethyl kruhu D, nebo se může jednat o směsi hydrolyzátů substituentů kruhů C a D. Ve způsobech a přípravcích podle vynálezu mohou být kromě toho používány směsi kterýchkoli dvou nebo více sloučenin BPD–MA, –MB, –DA a –DB.

Je nutno upozornit, že mnohé ze sloučenin na obr. 5 obsahují alespoň jedno centrum chiralit a tudíž mohou existovat jako optické izomery. Způsob podle vynálezu může používat sloučenin s oběma konfiguracemi na chirálním uhlíku, ať jsou dodávány jako izoláty jediného stereoizomeru nebo jde o směsi enantiomerů a/nebo diastereomerů. Dělení směsi diastereomerů může probíhat jakýmkoli konvenčním způsobem. Směsi enantiomerů mohou být děleny jakoukoli obvyklou metodou, například reakcí s opticky aktivním přípravkem a rozdělením vzniklých diastereomerů.

Dále je nutno upozornit, že reakčními produkty mohou být nerozdělené směsi aduktů na kruhu A a B, například směsi sloučenin vzorců 1 a 2 nebo 3 a 4 nebo 5 a 6. Ve způsobech a přípravcích podle vynálezu mohou být používány jak rozdělené formy, například samotná sloučenina vzorce 3 nebo 4, nebo jejich směsi v jakémkoli poměru.

Dále mohou být používány dimerní formy zeleného porfyriu a dimerní nebo multimerní formy kombinací zelený porfyrin/porfyrin za účelem absorpce většího množství světla na mol. Dimerní a oligomerní sloučeniny podle vynálezu mohou být připravovány s použitím analogickým reakcí jako v případě dimerizace a oligomerizace porfyrinů jako takových. Zelené porfyriny nebo spojení zelený porfyrin/porfyrin mohou být získávána přímo nebo se může provádět kondenzace s následnou Diels–Alderovou reakcí jednoho nebo obou koncových porfyrinů za účelem konverze na odpovídající zelené porfyriny.

55

Farmaceutické přípravky

5 Fotosenzibilizující činidlo podle vynálezu je nejčastěji formulováno do farmaceutického přípravku smícháním fotosenzibilizačního činidla, typicky při teplotě okolí, vhodném pH a požadovaném stupni čistoty, s jedním nebo více fyziologicky přijatelnými nosiči, tj. nosiči, které jsou pro příjemce v použitých dávkách a koncentracích netoxické. Vhodné přípravky jsou ty určené pro systémové nebo topické podávání, včetně přípravků pro injekce, transmukosální aplikaci nebo transdermální aplikaci.

10 Přípraven podle vynálezu výhodně zahrnuje asi 1 µg/ml až asi 2 mg/ml fotosenzibilizačního prostředku v závislosti primárně na způsobu podávání. Pro topickou aplikaci se výhodně používá asi 0,1 až asi 2,0 mg/ml. Pro systémovou aplikaci, například intravenózní injekce, se koncentrace fotosenzibilizačního prostředku výhodně pohybuje od asi 0,3 do asi 0,5 mg/ml.

15 Fotosenzibilizační prostředek se výhodně podává v kapalném, gelovém nebo želatinózním pevném farmaceutickém přípravku, buď samotný s vodou, nebo spolu s jinými farmaceuticky přijatelnými excipienty, jaké jsou popsány například v Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pennsylvania (ed. Gennaro, 1990). Je-li farmaceutický přípravek obsahující fotosenzibilizátor kapalný, může se jednat o suspenzi nebo emulzi. Často jsou žádoucí zejména liposomální nebo lipofilní formulace. Fotosenzibilizační prostředek podle vynálezu může být v liposomech zabudován, nanesen na jejich povrchu nebo oběma způsoby. Vhodné metody pro přípravu liposomů jsou známy. Zabudování zelených porfyrinů v takovýchto přípravcích je popsáno například v patentu US 5 214 036 (Allison a spol.), vydaném 25. 5. 1993, a v patentu US 6 074 666 (Desai a spol.), vydaném 13. 6. 1995. Pokud se používají suspenze nebo emulze, jsou vhodnými excipienty voda, fyziologický roztok, dextróza, glycerol apod. Tyto farmaceutické přípravky mohou dále obsahovat menší množství netoxických pomocných látek, jako jsou smáčedla nebo emulgátory, antioxidanty, tlumiče pH apod.

30 Hodnota pH přípravku závisí hlavně na konkrétním použití a koncentraci fotosenzibilizátoru, ale výhodně se pohybuje od asi 3 do asi 8. Výhodně se fotosenzibilizátor udržuje na neutrálním pH (například asi 6,5 až asi 7,5), aby nedocházelo k jeho adhezi na nádoby, kam je ukládán, jak tomu bývá při hodnotách pH přibližujících se fyziologické hladině, a aby byla zajištěna aktivace fotosenzibilizátoru. Vhodným provedením je tedy formulace fotosenzibilizátoru v roztoku elektrolytu obsahujícím vyvážený solný pufr o pH 6,5, ale bez fetálního hovězího séra („FBS“). Důvodem vynechání FBS je jeho obsah antigenních složek, které by mohly aktivizovat zánětlivou reakci. Pokud dojde k adhezi fotosenzibilizačního prostředku na nádoby, v nichž je uchovávan farmaceutický přípravek jej obsahující, je možno popřípadě přidávat vhodnou neantigenní přísadu, jako je lidský sérový albumin, v množství, které neinterferuje s adhezí fotosenzibilizačního prostředku na ošetřovanou poraněnou tkáň.

40 Fotosenzibilizační prostředek může být kombinován s jedním nebo více imunosupresivy pro zvýšení protizánětlivého účinku na poraněnou tkáň. Zde používaný výraz „imunosupresivum“ se vztahuje na sloučeniny, které působí tak, že potlačují nebo maskují reakce T-lymfocytů. Patří sem sloučeniny, které potlačují produkci cytokinu, snižují nebo potlačují expresi autoantigenů nebo maskují antigeny MHC.

50 Jako příklady je možno uvést 2-amino-6-aryl-5-substituované pyrimidiny, azathioprin nebo cyklofosamid, bromokryptin, glutaraldehyd, antiidiotypické protilátky pro antigeny MHC, cyklosporin A, jeden nebo několik steroidů, výhodně kortikosteroidy a glukokortikosteroidy jako je prednison, methyl prednisolon a dexamethason, protilátky proti interferonu gamma, protilátky proti α faktoru tumorové nekrózy, protilátky proti β faktoru tumorové nekrózy, protilátky proti interleukinu-2, protilátky proti cytokinovým receptorům, například anti-IL-2 protilátky, heterologní anti-lymfocytový globulin, pan-T protilátky, výhodně OKT-3 monoklonální protilátky, protilátky k CD4, streptokináza, streptodornáza nebo RNA nebo DNA z hostitele.

55

- Toto imunosupresivum může doplňovat nebo být používáno v kombinaci ve stejném dávkování jako fotosenzibilizační prostředek nebo ve sníženém dávkování, a může být podáváno současně nebo zvlášť, systémově nebo lokálně. Účinné množství těchto dalších prostředků je do značné míry na terapeutické úvaze a závisí na množství fotosenzibilizačního prostředku přítomného ve formulaci, typu poranění, typu imunosupresiva, místě dodání, způsobu aplikace, režimu aplikace a dalších faktorech známých odborníkům. Nicméně je však množství imunosupresiva vhodné pro použití podle vynálezu typicky nižší než množství obvykle doporučené pro ošetření podobně poraněné tkáně.
- Používá-li se imunosupresivum, může být podáváno do poraněné tkáně jakýmkoli vhodným způsobem včetně parenterální aplikace, a je-li to žádoucí pro místní imunosupresi, intralesionálně, tj. topicky. Parenterální infuze zahrnuje intramuskulární, intravenózní, intraarteriální, intraperitoneální, subkutánní a subkonjunktivální aplikaci.
- Má-li se farmaceutický přípravek podle vynálezu aplikován topicky, například má-li být natírán na poraněnou tkáň, může být výhodné použít viskózní roztok, jako je gel, spíše než neviskózní roztok. Tento gel může být připraven například smísením roztoku fotosenzibilizačního prostředku s želatinačním prostředkem, jako je polysacharid, výhodně ve vodě rozpustný polysacharid, například kyselina hyaluronová, škroby a deriváty celulózy (jako je methylcelulóza, hydroxyethylcelulóza a karboxymethylcelulóza). Je-li v gelové formulaci přítomen polysacharid, je přítomné množství obvykle v rozmezí asi 1 až 90 % hmotn., výhodně asi 1 až 20 % hmotn. gelu. Příklady dalších vhodných polysacharidů pro tento účel a stanovení rozpustnosti polysacharidů lze nalézt v EP 267 017, zveřejněném 11. 5. 1988.
- Mezi vhodné povrchově aktivní látky patří poloxamerové povrchově aktivní látky, které představují řadu molekul, tvořených blokovými kopolymery ethylenoxidu a propylenoxidu, buď samotné, nebo ve směsi s fosfolipidem, jako je vaječný lecithin. Jiným příkladem emulze, komerčně dostupné od Green Cross, je Fluoso1-DA 20%, který obsahuje perfluordekalin a perfluortripropylamin, emulgované poloxamerovou povrchově aktivní látkou Pluronic F-68. Emulze perfluorovaných sloučenin a jejich účinky na savce jsou úplněji popsány v Bolland's a spol., J. Pharm. Pharmacol., 39:1021-24 (1987).

Farmaceutický přípravek podle vynálezu je výhodně sterilní. Sterility se snadno dosáhne sterilní filtrací přes membrány 0,2 μm . Po formulaci a sterilizaci nemusí být přípravek stálý vůči oxidační denaturaci. Pro skladování jsou však vhodné lyofilizované formulace pro rekonstituci, obsahující BPD.

Způsob uvádění tkáně do styku s fotosenzibilizátorem

- Omezování nebo prevence zánětů podle vynálezu se provádí relativně přímočarým způsobem uvedením poraněné tkáně (nebo tkáně, která má být poraněna nebo u které dochází k poranění) do styku s fotosenzibilizačním prostředkem za podmínek, které umožňují vznik silné asociace mezi fotosenzibilizačním prostředkem a cílovou tkání za současné minimalizace koncentrace fotosenzibilizátoru, a pokud je to možné, lokalizace oblasti kontaktu na cílovou poraněnou tkáň.
- Jsou-li buňky, které mají být chráněny, obsaženy v živém neporaněném živočichovi, může být fotosenzibilizátor podáván lokálně nebo systémově. Přitom může být aplikován injekčně, pokud konkrétní provedení injekce umožňuje rychlou clearanci fotosenzibilizátoru z organismu. Alternativně může být fotosenzibilizátor aplikován topicky nebo enterálně, například natřením nebo nastříkáním na povrch ošetřované tkáně, nebo pomocí náplastí nebo implantátů, které jsou nejčastěji odstranitelné po skončení předem stanovené kontaktní doby.

Jsou-li cílovou tkání, která má být chráněna před zánětem, choulostivé oční tkáně, dává se přednost topické aplikaci, při které je povaha kontaktu s okem lokalizovaná a zvětšuje tak bezpečnostní faktor. Ve zvlášť výhodném provedení se fotosenzibilizátor aplikuje nástrojem podle

vynálezu, který zahrnuje fotosenzibilizátor a absorpční aplikátor. Absorpční aplikátor zahrnuje jakýkoli absorbující materiál, který je sterilní nebo schopný sterilizace, který snadno uvolňuje fotosenzibilizátor při styku s poraněnými tkáněmi a který chemicky nereaguje s fotosenzibilizačním prostředkem. Příklady vhodných absorpčních aplikátorů jsou houby a ohebné tkaniny nepouštějící vlas. Výhodným absorpčním aplikátorem je houba, například typu Weck cell. Pokud se používá takový aplikátor, je výhodně nasycen farmaceutickým přípravkem podle vynálezu a topicky aplikován na cílové tkáň během nebo krátce po výskytu poranění, například během chirurgického postupu.

10 Stupeň uvádění do styku může probíhat za různých teplot pouze kromě těch, které jsou dost vysoké, aby docházelo k denaturaci nebo jinému poškození poraněné tkáně, nebo dost nízké, aby minimalizovaly příjem fotosenzibilizátoru buňkami. Výhodně se kontaktní stupeň provádí při teplotě v rozmezí asi 5 až asi 40 °C, výhodně asi 15 až asi 37 °C a zejména při teplotě okolí.

15 Dávkování

V provedení způsobu podle vynálezu se subjektu v jedné nebo několika dávkách podává určité množství fotosenzibilizátoru nebo směsi fotosenzibilizátorů. Fotosenzibilizační prostředky podle vynálezu se dávkují způsobem konzistentním s běžnou lékařskou praxí, přičemž se bere v úvahu charakter zánětu, kterému se má předcházet nebo který má být redukován, biologický druh a zdravotní stav subjektu, přítomnost jiného léčiva v těle subjektu, čistota a chemická forma fotosenzibilizátoru, způsob aplikace, očekávaná rychlost a stupeň absorpce a další faktory, známé odborníkům. Terapeuticky účinné množství fotosenzibilizátoru je množství, které při vystavení světlu významným způsobem účinně omezuje proliferaci fibroblastů, a tak zlepšuje zánětlivou odpověď a nežádoucí účinky, které mohou se zánětem souviset, jako je zvýšená vaskularita a/nebo tvorba jizevnaté tkáně.

Dávka fotosenzibilizačního prostředku se mění podle cílové tkáně, a podává-li se intravenózně nebo systémově, je omezena hmotností a optimální hladinou v krvi subjektu. Vhodné systémové množství v dávce je typicky menší než asi 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti, výhodně v rozmezí asi 0,25 až 0,75 mg/kg na dávku a zejména asi 0,15 až asi 0,50 mg/kg na dávku. Systémová dávka BPD jako fotosenzibilizátoru překračuje 0,3 mg/kg pouze za neobvyklých okolností. Tato dávkovací rozmezí je nutno považovat za doporučená a nikoli nutně jako omezující, protože se mohou také lišit individuální reakce jednotlivých subjektů.

35 V závislosti na fotosenzibilizačním prostředku a způsobu aplikace je možno stanovit ekvivalentní optimální systémovou hladinu v krvi, ale je to obtížné, protože fotosenzibilizátor výhodně velmi rychle z organismu mizí. Může tedy být dramatický rozdíl mezi koncentrací fotosenzibilizátoru v krvi v okamžiku injekce a koncentrací v době ozáření světlem. Například koncentrace BPD v okamžiku intravenózní injekce může být v rozmezí asi 1 až 10 mg/ml, zatímco v době vystavení světlu může být pouze v rozmezí 0,5 až 0,05 µg/ml. Jde-li o topickou aplikaci, není fotosenzibilizátor v krvi detekovatelný vůbec.

45 Provádí-li se aplikace topicky nebo systémově, definuje se dávka nejlépe pomocí koncentrace přípravku a délky doby kontaktu s cílovou tkání. Účinné rozmezí koncentrací pro fotosenzibilizační prostředek je obecně asi 0,1 až asi 10 mg/ml, výhodně asi 0,1 až asi 5 mg/ml a zejména si 0,25 až asi 2,0 mg/ml. Kontakt výhodně zahrnuje nanesení přípravku na jeden nebo více povrchů poraněné tkáně s farmaceutickým přípravkem podle vynálezu. Topický kontakt s fotosenzibilizátorem probíhá obecně alespoň po dobu 1 min, výhodně pod 5 min a zejména asi 1 až 2 min. Doba kontaktu závisí na takových faktorech, jako je koncentrace fotosenzibilizačního prostředku v přípravku, ošetřovaná tkáň a konkrétní typ přípravku.

55 Po předem stanovené době kontaktu s fotosenzibilizátorem se výhodně z oblasti ošetření odstraní přebytečný fotosenzibilizátor. Podává-li se fotosenzibilizátor systémově, volí se tak, aby měl nejen rychlé farmakokinetické charakteristiky, ale i schopnost rychlé clearance z organismu.

Podává-li se fotosenzibilizátor topicky, odstraní se přebytek výhodně opláchnutím fyziologicky přijatelnou chemicky inertní kapalinou, jako je fyziologický roztok nebo BSS („basic salt solution“), nebo vodou nebo jiným rozpouštědlem. Tento postup opět nelze považovat vzhledem k šíři jeho možných variací za omezující.

5

Poté, co proběhl kontakt poraněné tkáně nebo tkáně před poraněním s přípravkem obsahujícím fotosenzibilizátor podle vynálezu, se tkáň vystaví působení světla o vlnové délce, kterou absorbuje fotosenzibilizační prostředek a která vede k redukci nebo prevenci zánětu. Zde používaný výraz „nízká dávka PDT“ se vztahuje na dávku, která nezpůsobuje zjevné poškození buněk, nekrózu nebo erythem, ale vykazuje pouze protizánětlivý účinek. Protože celková dávka PDT závisí na kombinaci dávky fotosenzibilizačního prostředku a dávce světelného záření, může být nízká dávka PDT podávána v kombinacích relativně vysokých dávek fotosenzibilizátoru a relativně nízkých dávek světla nebo naopak v kombinacích relativně nízkých dávek fotosenzibilizátoru a vysokých dávek světla. Posledně uvedenou kombinaci je také možno získat podáváním relativně vysoké dávky fotosenzibilizátoru s neobvykle dlouhou „inkubační“ dobou před ozářením světlem. Pro provedení vynálezu jsou tedy vhodné rozmanité podmínky, které všechny vedou k relativně nízké celkové dávce PDT.

Podobně jsou vhodné rozmanité různé kombinace dávek fotosenzibilizátoru, kontaktních dob a způsobů podávání. Je však možno aplikovat následující hrubá pravidla. Krátká kontaktní doba (méně než 1 h) s vysokou dávkou fotosenzibilizátoru, například 2 mg/ml, aplikovanou topicky, je obecně ekvivalentní nízké dávce fotosenzibilizátoru, například 0,15 mg/kg, podávané intravenózně. Avšak odložení ozářování na pozdější dobu, například více než 3 h, po podání fotosenzibilizačního prostředku může mít i po vysoké intravenózní dávce fotosenzibilizátoru za následek nízkou dávku PDT, protože je-li fotosenzibilizátor schopen rychlé clearance, může být ve tkáních po třech hodinách přítomen jen ve velmi malém množství.

Jako konkrétní příklady „nízké dávky PDT“ je možno uvést:

- 30 – topickou aplikaci nebo lokalizovanou injekci méně než 2 mg/ml benzoporfyrinového derivátu („BPD“) jako fotosenzibilizátoru, který se ponechá ve styku s cílovou tkání po dobu menší než 10 min,
- intravenózní aplikaci méně než 0,15 mg/kg BPD s ozářením kdykoli po aplikaci BPD nebo
- 35 – intravenózní aplikaci 0,15 až 0,50 mg/kg BPD s ozářením pod obě více než 6 h po podání BPD

ve spojení s ozářováním za těchto podmínek:

- 40 – méně než 15 J/cm² aplikováno v době 0 až 3 h po podání fotosenzibilizátoru nebo
- až 100 J/cm² aplikováno později než 6 h po podání fotosenzibilizátoru.

Během ozářovacího stupně je možno použít jakéhokoli záření, které je absorbováno fotosenzibilizátorem a které je vhodné pro použití pro poraněnou tkáň, například asi 380 až asi 850 nm, v závislosti na fotosenzibilizátoru a na požadované hloubce penetrace tkáně, zejména asi 400 až asi 700 nm. Pro obecné protizánětlivé aplikace je možno použít světlo ve viditelné části elektromagnetického spektra, například červené světlo, modré světlo nebo i UVA záření. Světlo o vlnové délce nižší než 400 nm je přijatelné, ale nikoli výhodné v důsledku potenciálně škodlivých účinků UVA záření. Světlo o vlnové délce delší než 700 nm je také přijatelné, ale není zvláště výhodné proto, že je obtížně viditelné a tak téměř znemožňuje vizuální kontrolu ozářování, pro oční aplikace se preferuje červené světlo, protože eliminuje případné potenciálně škodlivé účinky spektrálního rozmezí modrého světla a UVA záření na citlivou oční sítnici.

50

Příkladem zvláště výhodného postupu, používaného během filtrační chirurgie, je:

1. nasycení houby vodnou disperzí liposomálního BPD o koncentraci 2 mg/ml,
2. umístění nasycené houby do styku s ošetřovanou tkání na dobu 2 min,
3. odstranění přebytku BPD opláchnutím hojným množstvím sterilního fyziologického roztoku nebo vyváženého solného roztoku a
- 5 4. vystavení tkáně ošetřené BPD světlu asi 7 až 12 J/cm².

V současnosti se žádný postup nejeví žádoucí pro všechny případy. Typické postupy však zahrnují buď jediné ošetření, nebo počáteční ošetření a další 1 až 4 ošetření. Lokální ošetření topickou aplikací fotosenzibilizátoru se může opakovat každé 3 nebo 4 dny. Při systémové aplikaci fotosenzibilizátoru je však mezi opakovanými ošetřeními obvykle rozestup asi týden nebo déle, aby se předešlo nežádoucím účinkům akumulace přebytečného fotosenzibilizátoru.

Příklady provedení vynálezu

15 Pro ilustraci, avšak nikoli pro omezení vynálezu, jsou uvedeny příklady provedení.

Příklad 1

20 Dávkování světla

Na oku u šesti normálních králíků byla provedena filtrační chirurgie. Houba Weck cell byla nasycena vodným roztokem fotosenzibilizujícího benzoporfyrinového derivátu – monokyseliny kruhu A (BPD–MA, známý také jako „BPD–verteporfin“) o koncentraci 2 mg/ml. Během chirurgického zákroku byl BPD–MA pomocí houby Weck cell nanesen na 2 min topicky na bělimu a spojivku v oblasti zákroku. Po vypláchnutí přebytku léčiva s použitím BSS byla bělima i spojivka vystavena červenému světlu o vlnové délce asi 690 nm, které bylo vydáváno světlo emitující diodou („LED“), umístěnou ve vzdálenosti asi 1 cm od ozařované tkáně. Každý ze šesti králíků, použitých v tomto experimentu, obdržel rozdílnou dávku světla, a to 0, 3, 6, 12, 18 a 24 J/cm² po dobu 30 s až 4 min. Ošetření králíci byli sledováni 11 až 12 dní po zákroku a byla zjišťována výška filtračního vřáčku, vaskularita vřáčku (indikace zánětu) a snížení nitroočního tlaku („IOP“). Údaje získané 5. a 11. den jsou uvedeny v tabulce 1A, resp. 1B.

35 Tabulka 1A. Výsledky pilotního BPD–MA pro dávky světla 5. den po operaci

králík č.	doba ozařování	pokles IOP (mm Hg)	výška vřáčku	vaskularita vřáčku
1	0 (bez BPD)	2–3	střední	vaskulární
2	30 s.	minimální	malá	vaskulární
3	1 min	> 20	maximální	avaskulární
4	2 min	20	maximální	avaskulární
5	3 min	2,5	malá	vaskulární
6	4 min	0–4	malá až střední	vaskulární

40 Tabulka 1B. Výsledky pilotního BPD–MA pro dávky světla 11. den po operaci

králík č.	doba ozařování	pokles IOP (mm Hg)	výška vřáčku	vaskularita vřáčku
1	0 (bez BPD)	3–4	střední	vaskulární
2	30 s.	2,3	minimální	vaskulární
3	1 min	> 20	maximální	avaskulární
4	2 min	> 20	maximální	avaskulární
5	3 min	3–4	nízká	vaskulární
6	4 min	utracen – selhání vřáčku		

Výsledky ukazují, že přežití filtračního váčku bylo nejdelší u očí ošetřených světlem ve středním rozsahu dávek, tj. s relativně nízkými dávkami léčiva i světla („nízká dávka PDT“). Z údajů vyplývá, že je nutná určitá hladina PDT, vyšší dávky jsou však obecně méně účinné než nižší. Neočekávalo se, že kombinace krátké inkubační doby s BPD a nízkou dávkou světla 12 J/cm² ošetřené buňky příliš poškodí. Ošetření nicméně mělo jednoznačný farmakologický účinek. Přežití váčku bylo spojeno s absencí zánětu, což demonstruje avaskularita a bledě zbarvený váček.

Na druhé straně byla snížena výška váčku a velikost sníženého nitroočního tlaku u příliš nízkých nebo příliš vysokých dávkách světla. Selhání váčku bylo spojeno se zánětem.

Odpovídající filtrační váčky byly porovnány. U kontrolního (neošetřeného) váčku byla 3. den po zákroku patrná vaskularita. U váčku ošetřeného PDT byla 4 dny po zákroku pozorována minimální vaskularita a velké zvýšení.

Příklad 2

Doba aplikace PDT

Fotosenzibilizátor použitý v tomto příkladu byl připraven následujícím způsobem: liposomálně formulovaný derivát benzoporfyrinu – monokyselina na kruhu A (BPD–MA čili BPD–verteporfin) byl dodán z QLT PhotoTherapeutics, Inc., jako lyofilizovaný prášek a byl krátce před použitím rekonstituován sterilní destilovanou vodou. BPD byl rekonstituován na 1,98 mg/ml a použit k nasycení 3 mm odřezku houby Weck cell. V kontrolních skupinách byla houba nasycena základním roztokem („BSS“).

Nultý den byla provedena filtrační chirurgie v plné tloušťce na jednom náhodně vybraném oku 48 králíků, rozdělených do skupin po 12. Neošetřené oko sloužilo u každého králíka jako kontrola. Filtrační postup byl proveden tímto způsobem: Každé zvíře bylo anestetizováno směsí ketaminu a xylazinu. K oddělení víček bylo použito drátěné spekulum. V horním nasálním nebo horním temporálním kvadrantu byl vytvořen spojivkový lalok se základnou v klenbě. Po jeho vytvoření byla na bělimu za limbus, kde měl být vytvořen kanálek, umístěna houba Weck cell nasycená BPD–MA (nebo BSS jako placebem). Přes houbu byla přetažena spojivka. Houba tak spočívala mezi spojivkou a bělimou a byla rovněž po dobu 2 min v kontaktu s episklerou a Tenonovým pouzdem. Nástroje a rukavice byly před vniknutím do oka rovněž opláchnuty a pro vstup do přední komory byl použit 1,0 mm trepan.

Spojivkový lalok pak byl upevněn k limbu s použitím dvou 7–0 vicrylových švů. Bezprostředně po zákroku byl každý králík po dobu 2 min vystaven světlu o vlnové délce 690 nm, přičemž byl 1 cm před oko umístěn světelný zdroj uvedený v příkladu 1 (Quantum Devices, Inc.). Byl použit maximální výkon světelného zdroje (100 W/cm²), který poskytl celkovou dávku přibližně 7,2 J.

Po chirurgickém zákroku pak byla do každého oka vkápnuta jedna kapka tobramycinu. Po dobu jednoho týdne po zákroku byl do obou očí čtyřikrát denně kapán tobramycin a prednisolon acetát.

Na kontrolní oči byl subkonjunktiválně aplikován stejný fotosenzibilizátor a ozařování jako u očí chirurgicky ošetřených, avšak bez vytvoření kanálku. Kontrolní oko bylo použito k testování toxicity a jako základ pro zjištění poklesu IOP v oku chirurgicky ošetřeném. Doba, kdy byl aplikován BPD–MA, se měnila následujícím způsobem:

Skupina 1: během zákroku ošetření placebem
 48 h po zákroku ošetření placebem

Skupina 2: během zákroku ošetření BPD
 48 h po zákroku ošetření placebem

- Skupina 3: během zákroku ošetření placebem
48 h po zákroku ošetření BPD
- Skupina 4: během zákroku ošetření BPD
48 h po zákroku ošetření BPD

5

Ošetření BPD 48 h po zákroku spočívalo v aplikaci 3 mm seříznutého konce houby Weck cell, nasycené vodným roztokem BPD-MA 2 mg/ml (nebo placebem), položené na dobu 2 min na spojivku nad filtračním váčkem, opláchnutí přebytečného fotosenzibilizátoru a vystavení na dobu 1 min červenému LED světlu o vlnové délce 688 nm.

10

V nultý a každý druhý den po operaci byli králíci vyšetřováni biomikroskopicky se šterbinovou lampou a byla zjišťována velikost filtračního váčku, výška filtračního váčku, erythem spojivky nad váčkem, zarudnutí dutiny přední komory a hloubka přední komory. IOP byl měřen v lokální anestezii aplanačním tonometrem. Bylo rovněž provedeno hodnocení subjektivního diskomfortu na základě zjišťování zvyků zvířete při odpočinku a jídle podle následující stupnice:

15

0: normální chování

1: potřásání hlavou, naklánění hlavy, šilhání očima

2: sahání packou do oka

20

3: působení škody/sebepoškození (drápy)

25

Přežití váčku bylo hodnoceno podle rozsahu a výšky váčku a podle IOP ve srovnání s kontrolním okem. Stupeň zánětlivé odpovědi byl stanoven podle erythemu nad filtračním váčkem a hodnocen stupnicí 0–3. Králíci byli utraceni, bylo zaznamenáno selhání váčku, tj. když byl nitrooční tlak v chirurgicky ošetřeném oku stejný jako v kontrolním oku a filtrační váček byl plochý.

30

Graf na obr. 1 znázorňuje procento přežití filtračních váčků u králíků v každé ze čtyř skupin hodnocených v této studii. Střední doba přežití (\pm standardní odchylka) byla:

Skupina 1: $10,3 \pm 8$ dní

Skupina 2: $23,8 \pm 12$ dní

Skupina 3: $10,1 \pm 9$ dní

Skupina 4: $23,2 \pm 8$ dní

35

Statistický rozdíl byl pozorován mezi většinou skupin ($P < 0,001$), ale nikoli mezi skupinami 2 a 4 ($P < 0,005$). Ošetření BDP a světlem během zákroku (skupiny 2 a 4) mělo za následek prodlouženou životnost váčku v porovnání s kontrolou s placebem (skupina 1) nebo s ošetřením až 48 h po zákroku (skupina 3). Nezdálo se, že by druhé ošetření BPD a světlem po 48 h (skupina 4) mělo nějaký účinek navíc. K hodnocení rozdílů v době životnosti filtračních váčků mezi skupinami byl použit Kruskal-Wallisův test pro neparametrickou analýzu.

40

45

IOP byl hodnocen testem ANOVA a byl pozorován trend k nižšímu IOP, pokud byl BPD podáván během operace ($P = 0,057$). V důsledku problémů s tonometrem při měření IOP u králíků však byly nejspolehlivějšími parametry rozsah (obr. 2) a výška (obr. 3) váčku, které oba demonstrují účinnost ošetření nízkými dávkami PDT během chirurgického zákroku. Měření erythemu nad váčkem (znázorněno na obr. 4) demonstruje vyšší zánětlivou reakci ve skupinách 1 a 3, u nichž došlo k selhání váčku krátce po zákroku. Na obr. 2, 3 a 4 byl mezi skupinami pozorován statistický rozdíl ($P < 0,001$). Výška a rozsah váčku, stejně jako další charakteristicky šterbinové lampy, byly analyzovány statistikou metodou chí čtverců („chisquare“). Nepříznivé případy byly rovněž analyzovány touto metodou. Pomocí modelu Coxova proporcionálního hazardu byly stanoveny ty parametry, které nejpřesněji předpovídaly přežití filtračního váčku každý den vyšetření.

50

V porovnání s dřívějšími studii na králících, zabývajícími se přidavnou medikací pro trabekulektomii, a které jsou shrnuty v tabulce 2, výsledky ukázaly, že BPD prodlužuje přežití filtračního vaku oproti normální kontrole, Ara-A a 5-fluorouracilu.

5

Tabulka 2

	přežití filtračního vaku (střed dny \pm SD [rozmezí])	dokumenty
antifibrotická terapie bez léčiva	12,6 \pm 6,2 (6–23,2)	Kay a spol., „Delivery of Antifibrotic Agents as Adjuncts as Adjuncts to Filtration Surgery—Part II: Delivery of 5-Fluorouracil and Bleomycin in a Collagen Implatn: Pilot Study in the Rabbit“, <i>Ophthalmic Surg.</i> , 17: 796–801 (1986); Khaw a spol., „Effects of Inoperative 5-Fluorouracil or mitomycin C on Glaucoma Filtration Surgery in the Rabbit“, <i>Ophthalmology</i> 100: 367–72 (1993); Bergstrom a spol., „The Effects of Subconjunctil Mitomycin-C on Glaucoma Filtration Surgery in Rabbits“, <i>Arch. Ophthalmol.</i> , 109: 1725–30 (1991) a Liang a spol., „Comparison of Mitomycin C and 5-Fluorouracil on Filtration Surgery Success in Rabbit Eyes“, <i>J. Glaucoma</i> , 1: 87–93 (1992).
5-fluorouracil	19,5 \pm 5,5 (14–25)	Kay a spol., „Delivery of Antifibrotic Agents as Adjuncts as Adjuncts to Filtration Surgery—Part II: Delivery of 5-Fluorouracil and Bleomycin in a Collagen Implatn: Pilot Study in the Rabbit“, <i>Ophthalmic Surg.</i> , 17: 796–801 (1986); Khaw a spol., „Effects of Inoperative 5-Fluorouracil or mitomycin C on Glaucoma Filtration Surgery in the Rabbit“, <i>Ophthalmology</i> 100: 367–72 (1993);
Bleomycin	25,5 \pm 14,5 (21–50)	Khaw a spol., „Effects of Inoperative 5-Fluorouracil or Mitomycin C on Glaucoma Filtration Surgery in the Rabbit“, <i>Ophthalmology</i> , 100: 367–72(1993)
Mitomycin-C	34,8 \pm 28,8 (6–23,2)	Khaw a spol., „Effects of Inoperative 5-Fluorouracil or mitomycin C on Glaucoma Filtration Surgery in the Rabbit“, <i>Ophthalmology</i> , 100: 367–72(1993); Liang a spol., „Comparison of Mitomycin C and 5-Fluourouracil on Filtration Surgery Success in Rabbit Eyes“, <i>J. Glaucoma</i> , 1: 87–93 (1992).
Ara-A	15,2 \pm 1,8	Lee a spol., „Effect of Cytosine Arabino-side-impregnated Bioerodible Polymers on Glaucoma Filtration Surgery in Rabbits“, <i>J. Glaucoma</i> , 2: 96–100 (1993).

Výsledky dále ukázaly, že BPS prodlužuje životnost filtračního váčku u králíků o více než u některých králíků, jimž byl podáván mitomycin C. Střední doba přežití ve studiích s Mitomycinem C byla delší, což je konzistentní s hypotézou, že PDT klinicky pravděpodobně způsobuje
5 menší nadměrnou filtraci než mitomycin C, ale má podobně snadnou aplikaci s větší bezpečností.

Získané údaje jasně ukazují, že delší přežití váčku je spojeno s minimálním nebo žádným erythemem a tudíž s omezením zánětlivé reakce. Vyplyvá z nich dále, že ošetření pomocí BPD a světla v relativně nízkém rozmezí dávek zamezuje vývoj zánětu, zejména aplikuje-li se během
10 zákroku.

Nepříznivé výsledky byly nepočtené a netýkaly se konkrétně použití fotosenzibilizátoru. Fibrinová zátka během prvních čtyř dní byla pozorována u šesti králíků, z nichž tři byli ze skupiny 2 a tři ze skupiny 3. V každém případě se fibrin do konce prvního týdne rozpustil bez
15 následků. Jeden králík uhynul nultý den, což bylo zřejmě způsobeno komplikacemi při anestezii. Jiné neúspěšné případy nebyly zaznamenány.

Sedmý den byl utracen jeden králík z každé skupiny a po selhání váčku dva králíci z každé skupiny za účelem histologických testů a analýzy transmisní elektronovou mikroskopií („TEM“).
20 Histologické hodnocení bylo provedeno poté, co byly oči usmrčeného zvířete nejprve promyty neutrálním roztokem formalinu s 10 % pufru. Oči byly zpracovány, rozřezány a barveny hematoxylinem a eosinem stejně jako Massonovým trichromem. Vzorky byly hodnoceny jako maskované a nezávislým pozorovatelem.

Při transmisní elektronové mikroskopii byly tkáňové vzorky fixovány v 2,5% glutaraldehydu, tlumeném 0,1 M kakodylátem s obsahem 7 % sacharózy. Následná fixace byla prováděna 1 h 2% oxidem osmičelým, načež byla tkáň dehydratována stoupající koncentrací alkoholu do 100% ethanolu. Tkáňové bloky 2 x 5 mm byly nasáknuty katalyzovanou epoxypryskyřicí. Byly
25 zhotoveny tlusté řezy (0,5 μ m), barveny toluidinovou modří a příslušné oblasti byly určovány světlou mikroskopií. Pak byly zhotoveny tenké řezy (80 nm), vybrány na měděnou síťku a pro TEM mikroskopii barveny uranylacetátem a citrátem olovnatým. Ke zkoumání těchto řezů byl
30 použit transmisní elektronový mikroskop Hitachi H7000.

Světelná mikroskopie, prováděná 7. den po operaci na filtračních váčkách, které byly při zákroku ošetřovány BPD a nikoli placebem, ukázala, že u králíků, kteří dostávali placebo v nultý i druhý den, byly přítomny fibroblasty a mírná lymfocytová reakce. Kromě toho 7. den vykazaly tyto oči
35 určitou vaskulární proliferaci a nové ukládání kolagenu.

Naproti tomu králíci, která dostali BPD jen druhý den (skupina 3), vykazovali kromě fibroblastů zvětšené lymfatické kanálky, ale žádnou vaskulární proliferaci. U obou očí, které dostávaly při zákroku BPD, byla u filtračního váčku zaznamenána mírná lymfocytová reakce. Nebyly však
40 zaznamenány žádné fibroblasty, vzrůst vaskularity nebo přírůstek lymfocytických kanálků. Na konci studie (tři týdnů po operaci) bylo u očních kanálků, které byly ošetřeny BPD, zaznamenáno pouze málo lymfocytů a žádná proliferace cév v kanálku.

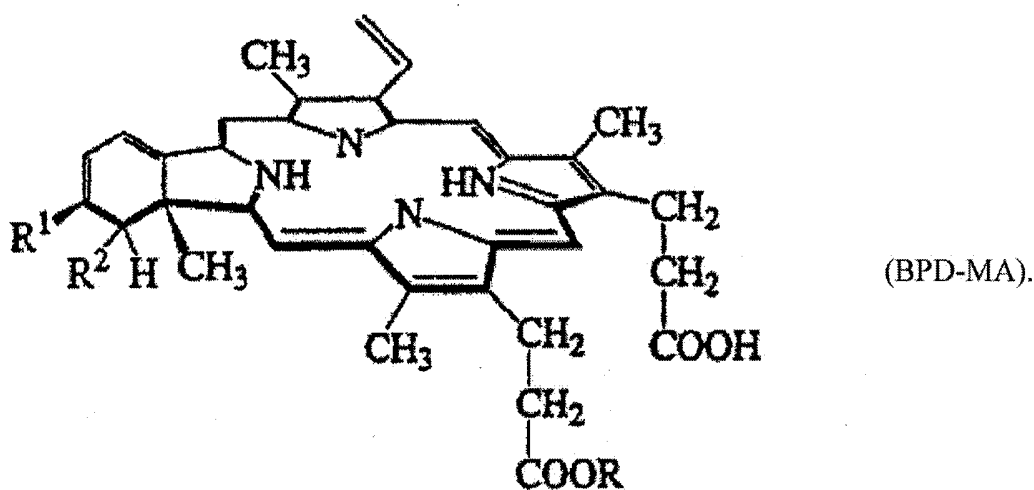
Ve skupinách 2 a 4 byl jak 7. den, tak při utracení pozorován ztenčelý epitel. Má se však za to, že se jedná o důsledek zvýšeného váčku a s tím spojeného přerušení slzného filmu spíše než o toxický účinek ošetření BPD.
45

U kontrolního oka nebyl při vyšetření předního segmentu zaznamenán rozdíl mezi okem ošetřeným placebem a PBD, což klinicky demonstruje absenci toxicity u způsobu nebo přípravku podle vynálezu ($P > 0,05$). Histologické a transmisní elektronové mikroskopické vyšetření navíc neprokázalo toxicitu nebo zánět mimo místo filtrace ani v operovaném ani v kontrolním oku. Nebyly tedy klinicky, histologicky ani mikroskopicky pozorována toxicita v důsledku BPD.
50

55

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Použití fotosenzibilizačního prostředku pro výrobu léčiva pro omezení nebo prevenci účinků zánětu vznikajícího v poraněné tkáni uvedením poraněné tkáně nebo tkáně před poškozením do kontaktu s fotosenzibilizačním prostředkem a vystavením tkáně světlu o vlnové délce absorbované fotosenzibilizačním prostředkem.
- 10 2. Použití podle nároku 1, přičemž léčivo je upraveno pro ošetřování oční tkáně.
3. Použití podle nároku 1, kde léčivo zahrnuje jako fotosenzibilizační prostředek jednu nebo více mnohydrobenzoporfyrinových sloučenin.
- 15 4. Použití podle nároku 1, přičemž léčiva zahrnuje jako fotosenzibilizační prostředek benzo-porfyrinový derivát vzorce BPD-MA



5. Použití podle nároku 1, kde léčivo je upraveno pro topickou aplikaci.
- 20 6. Použití podle nároku 5, kde léčivo je upraveno pro aplikaci ve formě roztoku fotosenzibilizačního prostředku o koncentraci 2 mg/ml nebo nižší.
7. Použití podle nároku 5, kde léčivo je upraveno pro aplikaci uvedením do styku s houbou nasáklou léčivem.
- 25 8. Použití podle nároku 5, kde léčivo je upraveno pro uvádění do styku s poraněnou tkání po dobu kratší než 5 min.
9. Použití podle nároku 1, kde léčivo je upraveno pro systémovou aplikaci.
- 30 10. Použití podle nároku 9, kde léčivo je upraveno pro aplikaci v dávce nižší než 0,30 mg/kg.
11. Použití podle nároku 1, kde přebytečný fotosenzibilizační prostředek je odstraněn po styku s poraněnou tkání.
- 35 12. Použití podle nároku 11, kde přebytečný fotosenzibilizační prostředek je odstraněn sterilním fyziologickým nebo vyváženým solným roztokem.
- 40 13. Použití podle nároku 1, kde alespoň část vlnové délky světla je v oblasti viditelného elektromagnetického spektra.

14. Použití podle nároku 1, kde léčivo je upraveno pro vystavení záření v dávce nižší než 100 J/cm^2 .

5 15. Použití podle nároku 1, kde léčivo je upraveno pro vystavení záření po dobu až 3 hodin v dávce nižší než 15 J/cm^2 .

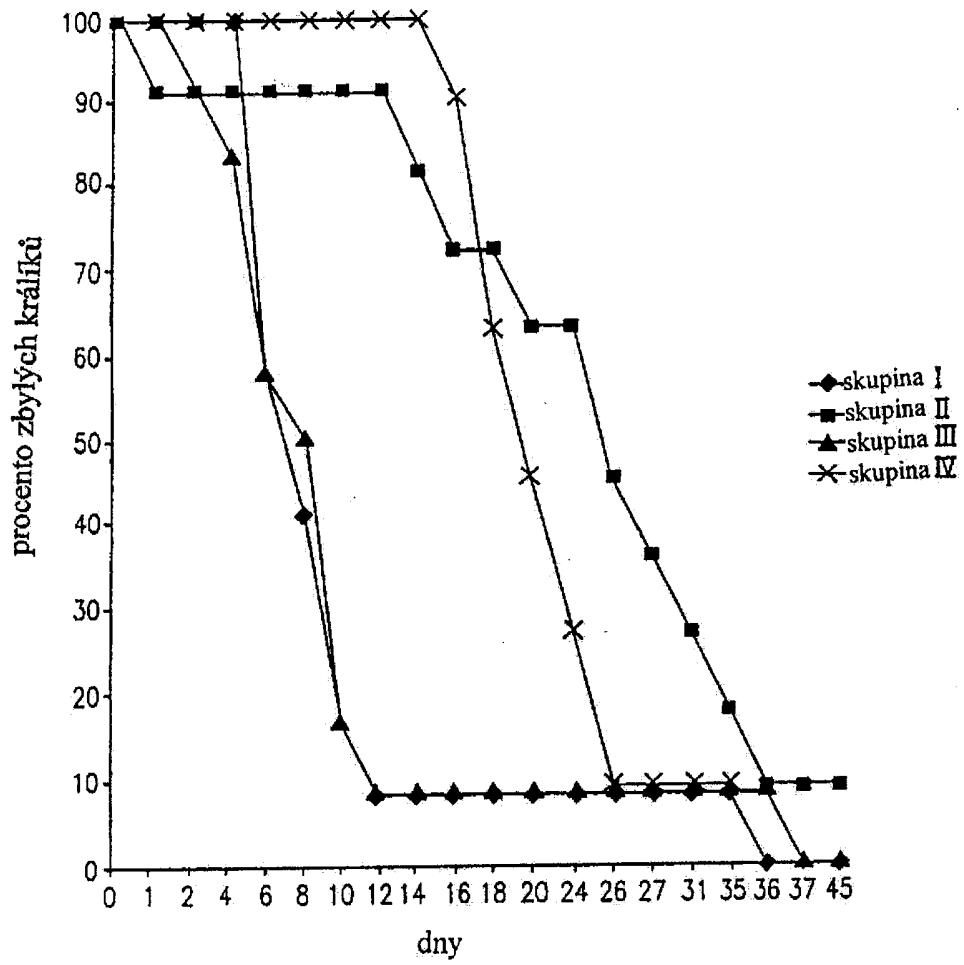
16. Použití podle nároku 15, kde léčivo je upraveno pro vystavení záření v dávce nižší než 7 až 12 J/m^2 .

10

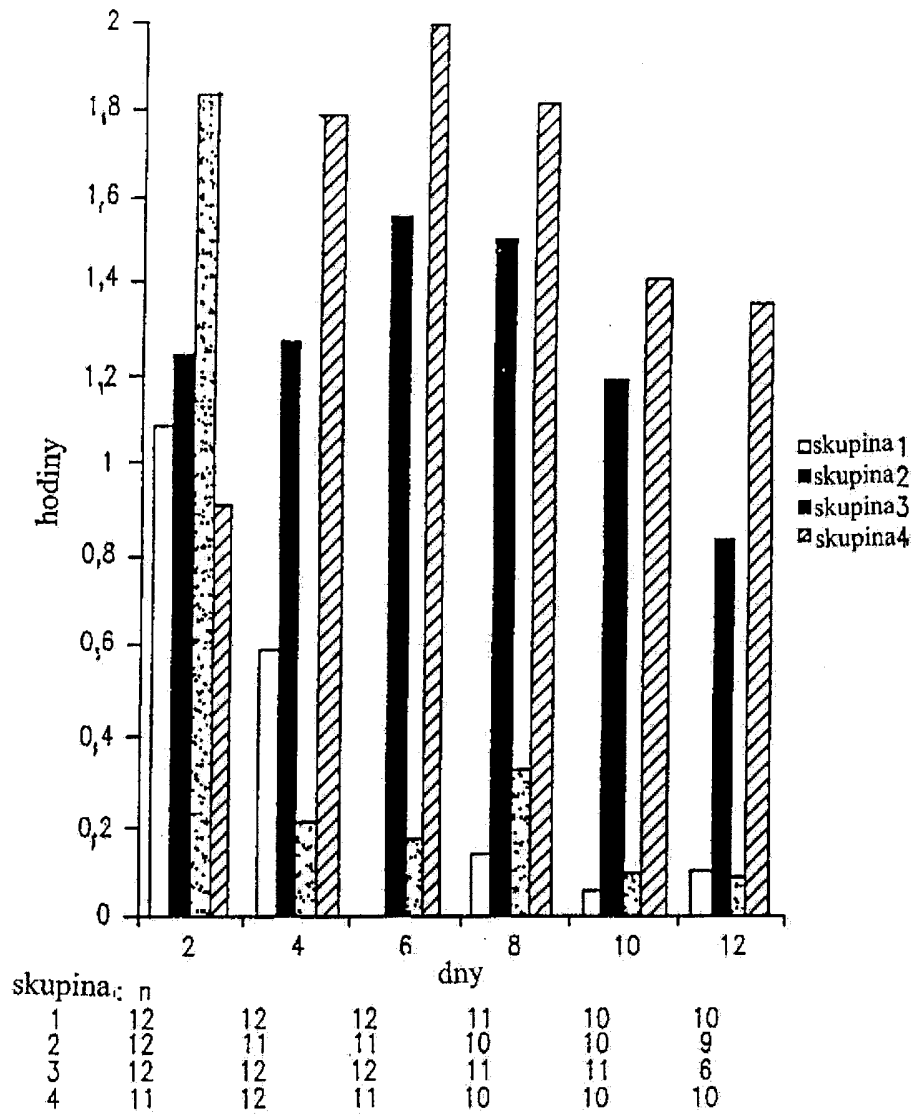
17. Použití podle nároku 1, kde léčivo je upraveno pro vystavení záření po dobu větší než 6 hodin v dávce 15 až 100 J/cm^2 .

15

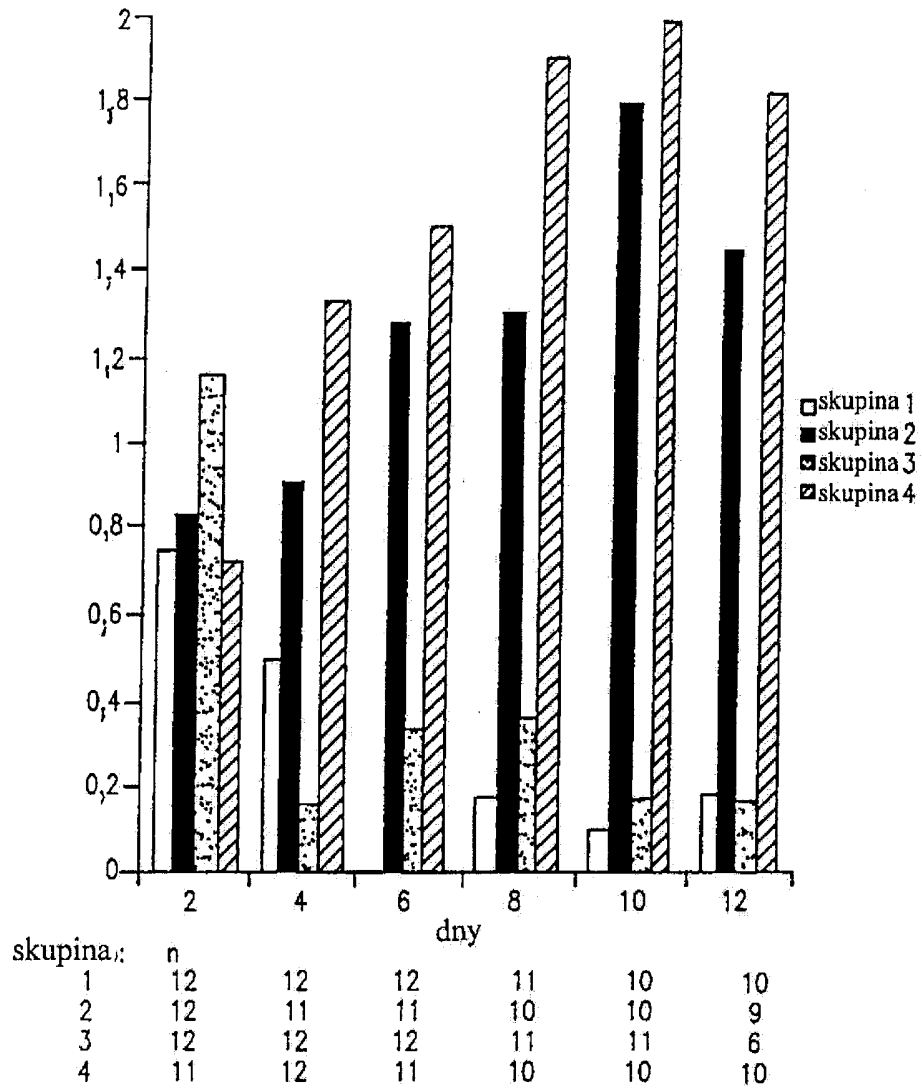
6 výkresů



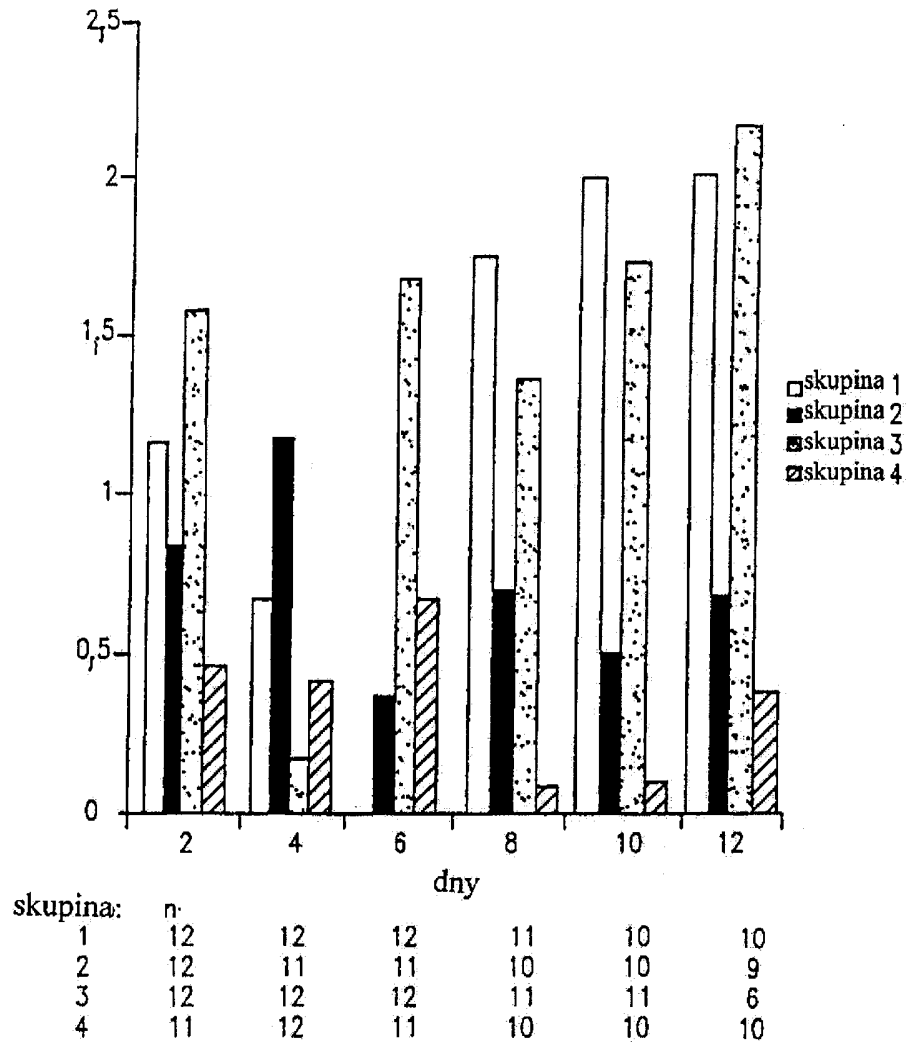
Obr. 1



Obr. 2

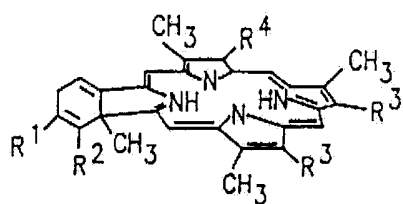


Obr. 3

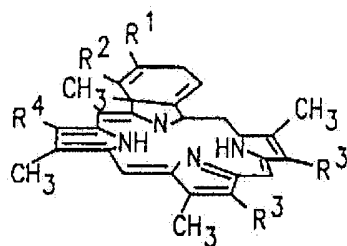


Obr. 4

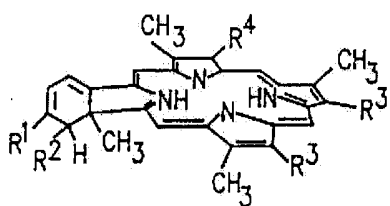
vzorec 1



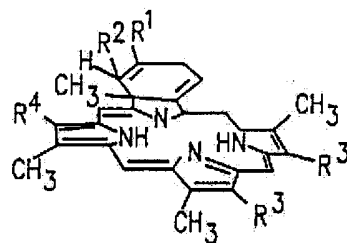
vzorec 2



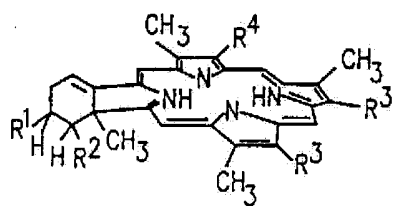
vzorec 3



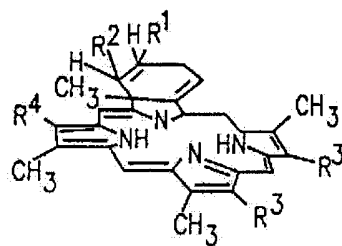
vzorec 4



vzorec 5



vzorec 6



Obr. 5

