

SZULFONÁLT MEZO-TETRAFENIL-KLORINT TARTALMAZÓ

FÉNYÉRZÉKENYÍTŐ SZER, ELJÁRÁS A2
ELŐÁLLÍTÁSÁRA ÉS EZT TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK

Kivonat

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

5

A találmány egy szulfonált mezo-tetrafenilporfirin, előnyösen diszulfonált mezo-tetrafenilporfirin, például TPPS_{2a} porfirin-makrociklusában lévő egyetlen kettős-kötés redukálásával előállított fényérzékenyítő anyagokra vonatkozik. A képződő szulfonált mezo-tetrafenilklorinok például olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyek képletében X jelentése -SO₃H képletű csoport; n, p, q és r értéke 0 vagy 1; és n, p, q és r értékének összege 1 és 4 közötti egész szám, előnyösen legalább 2, például 2 vagy 4, vagy ezek izomerei vagy izomereinek keverékei. A találmány szerinti vegyületek és ezek gyógyászatilag elfogadható sói különösen jól alkalmazhatók molekulák fotokémiai bevitelére és fotodinamikus terápiában fényérzékenyítő anyagként.

15

PK

fellevező ábra: (I) általános képlet

20

SZULFONÁLT MEZO-TETRAFENIL-KLORINT TARTALMAZÓ

FÉNYÉRZÉKENYÍTŐ SZER, ELJÁRÁS A 2
ELŐÁLLÍTÁSÁRA ÉS EZZE TARTALMAZÓ GYÓGYSZERLEJELZÉSEK
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

5 A találmány új fényérzékenyítő szerekre és ezeknek molekulák fotokémiai úton történő bejuttatására és fotodinamikus terápiában történő alkalmazására vonatkozik.

A szakirodalomban a fényérzékenyítő szerek széles köre ismert. Fénysugárzás hatására ezek toxikussá válhatnak vagy toxikus anyagokat, például szinglett oxigént vagy egyéb oxidáló gyököt bocsáthatnak ki, amelyek károsítják a sejtek anyagát és a biomolekulákat, beleértve a sejtmembránokat és a sejtek szerkezetét, továbbá az ilyen
10 sejt- vagy membránsérülés a sejteket meg is ölheti. Ez a citotoxikus hatás különböző abnormalitások és rendellenességek kezelésére használhatók, mint például a daganatos betegségek. Ilyen ismert terápia a fotodinamikus terápia (PDT), amelynek során az érintett testterületre fényérzékenyítő (fotokemoterápiás) szert adnak be, majd aktiváló fénysugárzásnak vetik alá, amelynek hatására a fényérzékenyítő szer aktiválódik és
15 citotoxikus formává alakul át, ezáltal az érintett sejtek elpusztulnak vagy szaporodóképességük megszűnik.

A legutóbbi időkben a fotodinamikus hatást a membránokon egyébként áthatolni nem képes molekuláknak a sejt citoszóljába történő bejuttatására alkalmas eszközként írták le, amely nem szükségképpen eredményez sejt leépülést vagy pusztulást. Ebben az
20 eljárásban, amely "fotokémiai bejuttatás" vagy PCI néven is ismert, a bejuttatandó vagy átjuttatandó molekulát egy fényérzékenyítő szerrel kombinálva alkalmazzák a sejtnél. A sejteket a fényérzékenyítő vegyület aktiválásához szükséges hullámhosszúságú fénnel besugározták, amelynek hatására a sejten belüli membránok elroncsolódnak, majd a molekula bejut a citoszólba.

25 A fényérzékenyítő anyagok hatásukat különböző mechanizmusok útján közvetlenül vagy közvetve fejthetik ki. Például bizonyos fényérzékenyítők fénnel aktiválva közvetlenül toxikussá válnak, ezzel szemben mások úgy hatnak, hogy toxikus fajtákat fejlesztenek, ilyenek például az oxidálószerke, mint a szinglett oxigén vagy az oxigénből származó szabad gyökök, amelyek rendkívüli módon roncsolják a sejt anyagát és a
30 biomolekulákat, például a lipideket, a proteineket és a nukleinsavakat.

Ismert fényérzékenyítő anyagok például a pszoralének, a porfirinek, a klorinok és a ftalocianinok. A porfirin fotoérzékenyítők toxikus oxigén fajták fejlesztése útján közvetve hatnak, ezeket különösen ígéretes PDT jelölteknek tekintik. A porfirinek a hem szintézisében természetesen előforduló prekursorok. Közelebbről, hem akkor képződik, amikor enzim ferrokelatáz hatására vas (Fe^{2+}) épül be a protoporfirin IX-be (PpIX). A PpIX egy rendkívül hatásos fényérzékenyítő, ezzel szemben a hem nem mutat fényérzékenyítő hatást.

A szakirodalomban számos porfirin alapú vagy porfirinnel rokon fényérzékenyítő szert írtak le. Ilyen anyag például a Photofrin[®], amelyeket nemrégiben bizonyos rákfajták kezelésénél fényérzékenyítőként történő alkalmazásra javasoltak. Azonban, mivel a Photofrin[®]-t parenterálisan (például intravénásan) kell beadni, hátránya, hogy a bőrön hosszú időn át fényérzékenységet okoz, amely néhány hétig is eltarthat. Mivel a Photofrin[®] a porfirin nagyméretű oligomerjeit tartalmazza, helyileg alkalmazva nem hatol be könnyen a bőrbe. Hasonló problémák merülnek fel egyéb porfirin alapú fényérzékenyítőknél, mint az úgynevezett "hematoporfirin-származék" (HpD), amelynek szintén leírták rák fotokemoterápiában történő alkalmazását.

A legutóbbi időkben megvizsgálták szulfonált mezo-tetrafenil-porfirinek (TPPS_n-k), például diszulfonált TPPS_{2a} és TPPS_{2o} mezo-tetrafenilporfirinek, és a tetraszulfonált TPPS₄ mezo-tetrafenilporfirinek fényérzékenyítő anyagként való alkalmazhatóságát, és azt találták, hogy ezek bizonyos jelentős előnyöket mutatnak a HpD-vel és a Photofrin[®]-nel szemben. Különösen tumor:normális szövet arányuk magas, és ezért jól alkalmazhatók a fotokemoterápiában [Peng és munkatársai, Cancer Lett., 36, 1-10 (1987); Evensen és munkatársai, Photodynamic therapy of tumors and other diseases (szerk.: Jori, G. és Perria, C.), 215-219, Libreria Prongetto Publ., Padova; és Winkelman, Cancer Res., 22, 589-596 (1962)]. Nemrégiben azt találták, hogy a TPPS_{2a} a makromolekulák fotokémiai bejuttatásánál jól alkalmazhatók fényérzékenyítőként [Berg és munkatársai, Cancer Res., 59, 1180-1183 (1999); Høgset és munkatársai, Hum. Gene Ther. 11, 869-880 (2000) és Selbo és munkatársai, Int. J. Cancer, 87, 853-859 (2000)].

Azonban a TPPS_{2a} kémiai célokra történő alkalmazásának fő hátránya, hogy a vörös fényt csekély mértékben nyelik el. Tehát az összes porfirin-származék klinikai alkalmazhatóságának korlátot szab, hogy a legnagyobb hullámhosszú fényt, amelyre

ezek érzékenyek, viszonylag kis mértékben nyelik el, ez a hullámhossztartomány körülbelül 620-630 nm között van. Ilyen hullámhosszúságú fény csak rövid távolságra képes az élő szövetbe behatolni, ennek következtében nem képes elérni a mélyen elhelyezkedő sejteket vagy szöveteket, például a tumoros sejteket. Ezért van szükség olyan tetra-
 5 pirrol-származékok kutatására, amelyek még rendelkeznek az ismert porfirin alapú fényérzékenyítők előnyös tulajdonságaival, azonban nagyobb fényabszorpciót mutatnak nagyobb hullámhosszaknál is, ahol a szövetbe történő behatolás fokozottabb.

Találmányunk célja ezen igény kielégítése, továbbá különösen olyan anyagok kutatása, amelyek a szakirodalomban ismert porfirin alapú vegyületekhez képest foko-
 10 zott fényérzékenyítő hatással bírnak.

Arra a felismerésre jutottunk, hogy a szulfonált mezo-tetrafenilporfirinek (például a diszulfonált mezo-tetrafenilporfirin) porfirin-makrociklusában egy kettőskötés redukálásával meglepő módon megnövekedett fényérzékenyítő tulajdonságú vegyületeket kapunk. Ezek a vegyületek különösen jó spektrális tulajdonságokat mutatnak a meg-
 15 felelő porfirinekkel összehasonlítva, továbbá azt találtuk, hogy vörös fényben, például 630 nm és 680 nm közötti tartományba eső fényben váratlan módon megnövekedett extinkciós koefficiensst kapunk. Tehát ezek a vegyületek különösen jól alkalmazhatók nem csak hagyományos fotodinamikai terápiás eljárásban, de makromolekulák fotokémiai bevitelére szolgáló eljárásokban is.

A fentieknek megfelelően találmányunk tárgyát olyan fényérzékenyítő anyag képezi, amely egy szulfonált mezo-tetrafenil-klorint, például diszulfonált mezo-tetrafenil-klorint vagy gyógyászatilag elfogadható sóját tartalmazza. Az ilyen vegyületekben a négy fenilgyűrű legalább egyike jellemzően 1, 2 vagy 3, előnyösen 1 szulfonát-csoportot tartalmaz. A találmányunk szerinti előnyös vegyületekben két fenilgyűrű egy-
 20 egy szulfonát-csoporttal helyettesített.

Találmányunk tárgyát képezi továbbá egy olyan fényérzékenyítő anyag, amely szulfonált mezo-tetrafenilporfirin porfirin-makrociklusában egy kettőskötés redukálásával állítható elő, ilyenek különösen a diszulfonált mezo-tetrafenilporfirinek, például a TPPS_{2a} porfirin-makrociklusában egy kettőskötés redukciójával előállítható anyagok.
 30 Ezen vegyületek gyógyászatilag elfogadható sójai is találmányunk tárgyát képezik.

A találmányunk szerinti fényérzékenyítő anyagok például az (I) általános képlettel írhatók le, amely képletben

X jelentése $\text{-SO}_3\text{H}$ képletű csoport;

n, p, q és r értéke egymástól függetlenül 0 vagy 1; és

n, p, q és r értékének összege 1 és 4 közötti egész szám, előnyösen legalább 2, például 2 vagy 4, továbbá

5 ezen vegyületek gyógyászatilag elfogadható sói.

Az olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyek képletében a három maradék pirrolgyűrű bármelyikében elhelyezkedő kettőskötés redukálva van, szintén találmányunk részét képezi. Az (I) általános képletű vegyületek vagy izomereik legalább egyi-
10 két tartalmazó izomer keverék is találmányunk részét képezi. Az (I) általános képletű vegyületek izomerei például különösen jól alkalmazhatók a találmányunk szerinti meg-
oldásban, ilyenek például az alábbi (Ia), (Ib) és (Ic) általános képletű vegyületek, ame-
lyek képletében X, n, p, q és r jelentése a fent meghatározott.

Az (I), (Ia), (Ib) és (Ic) általános képletű vegyületekben, amikor n, p, q és r közül
15 bármelyik értéke 1, ez azt jelöli, hogy a fenilgyűrűhöz egyetlen szulfonátcsoport kap-
csolódik bármelyik gyűrűhelyzetben (azaz orto-, meta- vagy para-helyzetben). Azokban
az esetekben, amikor egynél több szulfonátcsoport van jelen, ezek azonos vagy külön-
böző gyűrűhelyzetekben lehetnek mindegyik fenilgyűrűben. Ezek előnyösen ugyanazon
gyűrűhelyzetben, legelőnyösebben meta- vagy para-helyzetben vannak jelen. Ahol n, p,
q vagy r közül bármelyik értéke nulla, ez azt jelzi, hogy a gyűrűben nincs helyettesítő,
20 azaz a fenilgyűrű helyettesítetlen. Különösen előnyös (I), (Ia), (Ib) és (Ic) általános
képletű vegyületek azok, amelyek képletében n, p, q és r értékének összege 2. A legelő-
nyösebb ilyen vegyületek képletében a helyettesített fenilgyűrűk egymással szomszédos-
san, például a redukált pirrolgyűrűvel szomszédosan helyezkednek el, azaz ahol az (I)
általános képletben n értéke 0, p értéke 0, q értéke 1 és r értéke 1. További előnyös (I),
25 (Ia), (Ib) és (Ic) általános képletű vegyületek azok, amelyek képletében n, p, q és r érté-
kének összege 2, továbbá a helyettesített fenilgyűrűk egymással ellentétesen helyezked-
nek el, például olyan (I) általános képletű vegyületekről van szó, amelyek képletében n
értéke 0, p értéke 1, q értéke 0 és r értéke 1.

Az egyes fenilgyűrűkben az X szulfonált csoportok egymástól függetlenül orto-,
30 meta- vagy para-helyzetben lehetnek. Ezek előnyösen meta- vagy para-helyzetben, leg-
előnyösebben para-helyzetben vannak. A találmányunk szerinti vegyületek közül külö-
nösen előnyösek a (II) általános képlettel leírható vegyületek. A (II) általános képletű

vegyületek izomer formái például azok a vegyületek, amelyekben a redukált kettőskötés a három maradék pirrolgyűrű bármelyikében helyezkedik el, szintén találmányunk részét képezik. Találmányunkhoz tartoznak továbbá a legalább egy (II) általános képletű vegyületet vagy izomer formáit tartalmazó izomer keverékek.

- 5 Különösen előnyösek azok a (II) általános képletű vegyületek, amelyek képletében a két helyettesített fenilgyűrű a redukált kettőskötéssel szomszédosan helyezkedik el.

A találmányunk szerinti vegyületek a szakirodalomban jól ismert szokásos eljárásokkal állíthatók elő. Legkényelmesebben ezek a megfelelő porfirin redukciójával állíthatók elő.

Találmányunk kiterjed a találmányunk szerinti vegyületek előállítására is, az eljárás során az alábbi lépések legalább egyikét hajtjuk végre:

- (a) egy szulfonált tetrafenil-porfirint vagy ennek egy vas-kelát-komplexét, például egy (III) általános képletű tetrafenil-porfirint vagy ennek vas-kelát komplexét redukáljuk, utóbbi képletben X, n, p, q és r jelentése a fent meghatározott;

(b) kívánt esetben az (a) lépésben előállított vegyület keveréket szokásos elválasztási eljárással elválasztjuk és

(c) az (a) vagy (b) lépésben előállított vegyületet, például az (I) általános képletű vegyületet gyógyászatilag elfogadható sójává alakítjuk át.

- 20 Az (a) lépésben a kiindulási anyagként használt porfirin-származék a kereskedelemben beszerezhető vagy a szakirodalomban ismert eljárások alkalmazásával állítható elő. A szulfonált porfirinek, például a TPPS_{2a} (diszulfonált tetrafenilporfirin), a kereskedelemben beszerezhetők (például Porpfyrin Products, Logan, UT, USA).

- 25 A (III) általános képletű porfirin-származéknak a megfelelő klorinná történő (a) lépés szerinti kémiai átalakítását különböző módon végezhetjük, például a szabad porfirin bázis redukciójában diimid prekursoraként p-toluolszulfonilhidrazin alkalmazásával [lásd például Whitlock és munkatársai, J. Am. Chem. Soc., 91, 7485-7489 (1969)]. Egyik változat szerint az előállítani kívánt klorint úgy kaphatjuk meg, hogy a megfelelő vas-porfirint például forró izoamil-alkoholban nátriummal redukáljuk [lásd Eisner, J. Chem. Soc., 3461-3469 (1957) és Eisner és munkatársai, J. Chem. Soc., 733-739 (1957)].

A találmányunk szerinti vegyületek előállítására különösen jól alkalmazható a

porfirinek adott esetben egy tercier amin bázis jelenlétében végrehajtott redukciója. Például szabad porfirin bázis egy amin, különösen egy tercier amin jelenlétében fotoredukcióval klorinná alakítható [lásd például Harel és munkatársai, Photochem. Photobiol., 23, 337-341 (1976)].

5 A porfirin molekulának diimid jelenlétében végrehajtott redukciójával bakterio-
klorinok képződését indukálhatjuk oly módon, hogy a porfirin-makrociklusban két ket-
tőskötést redukálunk. Ezért alkalmazható előnyösen aminokkal, különösen előnyösen a
tercier aminokkal végzett fotoredukciós eljárás a találmányunk szerinti klorin vegyüle-
tek előállítására. Az ilyen eljárásokban jól alkalmazhatók tercier aminok, például a
10 trietil-amin ((TEA), az N-metil-pirrolidon, a tri-n-butyl-amin, a trioktil-amin és hason-
lók, és a redukciót általában látható fény jelenlétében végezzük (azaz fotoredukciót
hajtunk végre).

A porfirinek fotokémiai redukcióját szokásos módon, oldószerben vagy oldószer
keverékekben végezhetjük, mint a benzol, a piridin, a dimetil-szulfid és hasonló,
15 10 °C és 30 °C közötti hőmérséklettartományban, előnyösen szobahőmérsékleten, azaz
20-25 °C-on, előnyösen 22 °C-on.

A fotoredukciót végezhetjük látható tartományba eső fénnel, például 400 nm és
640 nm közötti, előnyösen 500 nm és 640 nm közötti, például körülbelül 545 ± 15 nm
hullámhosszúságú fénnel. A besugárzásnál általában 1 W/m^2 és 50 W/m^2 közötti, pél-
20 dával körülbelül 15 W/m^2 dózisszintet alkalmazunk 1 perc és 90 perc közötti, például
5 perc és 40 perc közötti időtartamig. Az esetleges nemkívánt bakteriochlorinok képző-
dését a porfirin-makrociklus fénnel történő kezelése időtartamának korlátozásával
csökkenthetjük. A porfirinek besugárzására alkalmas eljárások, például lámpák vagy
lézerek alkalmazása, a szakirodalomban jól ismert. Ilyen szempontból különösen elő-
25 nyös a nagy nyomású Xenon lámpa vagy a volfram-jód lámpa, amelyek például a
Philips-től szerezhetők be. A reakciót jellemzően anaerob körülmények között végez-
zük, például a kiindulási anyagot és az oldószer keverékét a fény kezelés előtt és adott
esetben a fény kezelés közben is nitrogénnel telíthetjük.

A találmányunk szerinti vegyületek lehetnek izomer keverék formájában, és eb-
30 ben a formában is használhatók. Kívánt esetben a találmányunk szerinti vegyületek,
például az (I) általános képletű vegyületek, fizikai/kémiai tulajdonságbeli különbségei
alapján választhatók szét izomereikre a szakirodalomban ismert eljárások segítségével,

például kromatográfiával és/vagy frakcionált kristályosítással.

Ahogy fentebb említettük, a találmányunk szerinti vegyületek gyógyászatilag elfogadható sók formájában lehetnek. Ezek a sók előnyösen fiziológiásan elfogadható szerves vagy szervetlen savakkal alkotott savaddíciós sók. Megfelelő savak például a sósav, a hidrogén-bromid, a kénsav, a foszforsav, az ecetsav, a tejsav, a citromsav, a borkősav, a borostyánkősav, a maleinsav, a fumársav vagy az aszkorbinsav. A hidrofób sók szokásos módon, például kicsapással állíthatók elő. Megfelelő sók például az acetát-, a bromid-, a klorid-, a citrát-, a hidroklorid-, a maleát-, a mezilát-, nitrát-, a foszfát-, a szulfát-, a tartarát-, az oleát-, a sztearát-, a tozilát-, a kalcium-, a meglumin-, a kálium- és a nátriómsók. A sók előállítását a szakirodalomban jól ismert.

Ahogy fentebb említettük, a találmányunk szerinti vegyületek és sóik értékes farmakológiai tulajdonságokat, mégpedig fényérzékenyítő tulajdonságokat mutatnak, ezért ezek jól alkalmazhatók makromolekulák fotokémiai úton történő bejuttatására, továbbá fotokemoterápiás szerekként.

Találmányunk tárgyát képezi tehát egy olyan gyógyszerkészítmény is, amely egy itt ismertetett fényérzékenyítő anyagot, például egy (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját, valamint legalább egy gyógyászatilag elfogadható hordozó- és/vagy segédanyagot tartalmaz.

Találmányunk kiterjed továbbá az itt ismertetett fényérzékenyítő anyagra, például egy (I) általános képletű vegyületre vagy gyógyászatilag elfogadható sójára, amely gyógyszerként, például fényérzékenyítő anyagként használható fotokémiai beviteli eljárásban, fotokemoterápiában vagy diagnózisban.

Találmányunk kiterjed továbbá az itt ismertetett fényérzékenyítő anyag, például egy (I) általános képletű vegyület vagy gyógyászatilag elfogadható sója alkalmazására fotokémiai beviteli eljárásban, fotokemoterápiában vagy diagnózisban, előnyösen fotokemoterápiára érzékeny külső vagy belső test felületi rendellenességek és abnormalitások kezelésére alkalmas eljárásokban használható terápiás szerek előállítására.

"Bevitel" vagy "bejuttatás" kifejezésen egy molekulának a citoszólba történő bejuttatását értjük, amely a molekulának a sejt intracelluláris/membránhoz kapcsolódó részéből a citoszólba történő bejuttatását foglalja magában. "Sejt" kifejezésen az összes eukariotikus sejtet értjük (beleértve a rovar sejteket és a gomba sejteket is). Tehát a

"sejt" kifejezésbe beleértjük az összes emlős és nem-emlős élőlény sejtjét, továbbá a növényi sejteket, a rovarok sejtjeit, a gombák sejtjeit és a protozoákat.

A molekuláknak élő sejtek citoszóljába történő bevitelével jól befolyásolhatók és vizsgálhatók a biológiai folyamatok. Jelentősek azok a beviteli eljárások, amelyek során a sejtek életképesek és/vagy működőképesek maradnak. Többek között a WO 96/07432 és a WO 00/54802 számú nemzetközi közzétételi iratban fényérzékenyítő anyagok alkalmazását javasolták egyébként a membránon áthatolni nem képes molekuláknak a sejt citoszólba olyan módon történő bevitelére, amely nem szükségképpen eredményez széleskörű sejtroncsolódást vagy sejtpusztulást. Ezen eljárás során a bejuttatandó molekulát és a fényérzékenyítő vegyületet egyidejűleg vagy egymás után alkalmazzák a sejtnél, ahol a fényérzékenyítő vegyület és a molekula endocitózissal vagy egyéb úton az endoszómákba, lizoszómákba vagy más, sejten belüli membrán által határolt részbe helyeződik át. A sejtek intracelluláris részeibe bejuttatandó molekulát és a fényérzékenyítő vegyületet együtt vagy egymás után alkalmazzuk a sejtnél, amelynek során ezek bejutnak a sejt intracelluláris részeibe. A sejtbe bejuttatandó molekula a sejteknek a fényérzékenyítő vegyület aktiválásához megfelelő hullámhosszúságú fénnel történő besugárzása hatására felszabadul, amelynek következtében az intracelluláris rész membránjai felhasadnak, ezután a molekula bejut a citoszólba. Ezt az eljárást, amelynek során a sejteket fénnel sugározzuk be, ezáltal a kérdéses molekula egy fényérzékenyítő anyag hatására az intracelluláris részből (ahol elhelyezkedik) felszabadul, "fotokémiai bevitelnek" vagy "fotokémiai bejuttatásnak", rövidítve PCI-nek nevezzük.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja egy molekulának (például transzfer molekulának) egy sejt citoszóljába történő *in vitro* vagy *in vivo* bevitelére alkalmas eljárásra vonatkozik, amelynek során a sejtet egy itt ismertetett fényérzékenyítő anyaggal, például egy (I) általános képletű vegyülettel vagy gyógyászatilag elfogadható sójával hozzuk érintkezésbe, a sejtet bejuttatandó molekulával érintkezésbe hozzuk, és az említett sejtet a fényérzékenyítő anyag aktiválásához szükséges hullámhosszú fénnel, például 300 nm és 800 nm közötti hullámhosszúságú fénnel besugározzuk.

A bejuttatandó molekula (azaz a transzfer molekula) és a fényérzékenyítő anyag adagolásának pontos időzítésénél és a fent leírt hatások eléréséhez szükséges besugárzás időzítésénél különböző faktorokat kell figyelembe venni, úgy mint a kezelendő sejtek, a transzfer molekulák tulajdonságai, a sejtek környezete, akár *in vitro*, akár *in vivo* eljárást

végzünk, továbbá akár közvetlenül a cél szövetnél, akár távolabbi helyen végezzük a beadást. Ezen szempontokat figyelembe véve a megfelelő időzítést a szakember könnyen meghatározhatja. A transzfer molekulát és a fényérzékenyítő anyagot a sejtbe jellemzően a besugárzás előtt adjuk be. Ezt végezhetjük például egyidejűleg vagy külön, a besugárzás előtt 1-72 órával, előnyösebben 4-48 órával, például 4-24 órával.

Bizonyos esetekben a transzfer molekulát a fényérzékenyítő anyaggal egyidejűleg adjuk be. Találmányunk egy másik kiviteli alakja olyan gyógyszerkészítményre vonatkozik, amely egy itt ismertetett fényérzékenyítő anyagot és egy transzfer molekulát tartalmaz. Gyógyászati lag elfogadható hordozó- és/vagy segédanyagok is lehetnek jelen.

Találmányunk egy másik kiviteli alakja egy itt ismertetett fényérzékenyítő anyagot és egy transzfer molekulát tartalmazó gyógyszerkészítményre vonatkozik, amely terápiás célokra, például rák- vagy génterápiás célokra használható.

Találmányunk egy további kiviteli alakja egy itt ismertetett fényérzékenyítő anyag és/vagy egy transzfer molekulának terápiában, például rák- vagy génterápiában alkalmazható gyógyszerkészítmény előállítására történő alkalmazására vonatkozik, amely terápiás eljárás során a fényérzékenyítő anyagot és a transzfer molekulát (külön, egyidejűleg vagy egymást követően) a beteg sejtjeivel vagy szöveteivel érintkeztetjük, és a sejteket vagy szöveteket a fényérzékenyítő anyag aktiválásához szükséges hullámhosszúságú fénnel besugározzuk. Az ilyen eljárásokat magukba foglaló kezelési eljárások is találmányunk megvalósítási módjait képezik.

A találmányunk szerinti fényérzékenyítő anyagok tehát bármilyen molekulának élő sejtek citoszóljába történő *in vitro* (azaz tenyészetben) vagy *in vivo* bejuttatására vagy transzfektálására használhatók. Ezek az eljárások nem csak transzfer molekulának (vagy részeinek vagy fragmenseinek) egy sejt belsejébe történő bejuttatására, hanem bizonyos körülmények között ezeknek a sejt felületén történő expresszálására is alkalmasak. Tehát egy transzfer molekulának a sejt citoszólba történő bevitelét és felszabadítását követően, ha a kérdéses sejtek speciális sejtek, például antigén prezentáló sejtek, a molekula vagy a fragmens a sejt felületre juttatható, ahol az a sejt külsején, azaz a sejt felületén jelenhet meg. Ezek az eljárások különösen a védőoltások területén használhatók, ahol a vakcina komponenseket, azaz az antigéneket vagy az immunogéneket, azért juttatják be egy sejtbe, hogy azok a sejt felületén megjelenve lehetővé

tegyék, indukálják vagy fokozzák az immunválaszt. A molekulák sejtfelületen történő expressziójának elősegítésére vonatkozó további részletek találhatóak a WO 00/54802 számú nemzetközi közzétételi iratban.

A sejtek citoszóljába a találmányunk szerinti fényérzékenyítő anyagok alkalmazásával bejuttatható transzfer molekulák például olyan molekulák, amelyek nem hatolnak át könnyen a sejt membránokon. Ezen túlmenően az itt ismertetett anyagok növelhetik az olyan molekulák citoszólba való bejutását és aktivitását, amelyek csak részben képesek a sejt membránon vagy a sejten belüli edények membránjain áthatolni. A transzfer molekulák lehetnek szerves vegyületek, proteinek vagy protein fragmensek, például peptidek, antitestek vagy antigének vagy ezek fragmensei. A találmányunk szerinti anyagok alkalmazásával bejuttatható transzfer molekulák egy másik osztályát a citotoxikus hatóanyagok képezik, ilyenek a protein toxinok vagy a citotoxikus szerves vegyületek. Az olyan molekulák, amelyek rák kezelése szempontjából klinikai jelentőséggel bírnak, de ezek alkalmazhatóságát korlátozza, hogy a citoszólba rosszul vagy egyáltalán nem jutnak be, a találmányunk szerinti eljárások alkalmazásával bejuttathatók a citoszólba, és meghatározott sejtek is célba vehetők. Ilyen molekula például a gelonin.

A transzfer molekula tulajdonságaitól függően az itt ismertetett eljárások különböző rendellenességek kezelésére használhatók, mint a reumatoid arthritisz, az arteroszklerózis és különböző szív-érrendszeri betegségek, vírusos és egyéb fertőzések, pszoriázis, napfény keratózis, seb hegesezés, csont összeforrás, szemölcsök és örökölt genetikai rendellenességek, például cisztás fibrózis, Gorlin-szindróma vagy ataxia hajszálértágulat.

A megfelelő transzfer molekulák egy másik osztályát a nukleinsavak képezik. A nukleinsavak használhatók például terápiás proteinek, antiszensz RNS molekulákat, ribozimeket, RNS aptamérek vagy triplexet képező oligonukleotidokat kódoló gének formájában. Egyik változatban a nukleinsavak nem kódoló molekulák formájában lehetnek, mint például a szintetikus DNS vagy RNS antiszensz molekulák, a ribozimek, az aptamérek, a triplexet képező oligonukleotidok, a peptid nukleinsavak (PNS-k), a "decoy" DNS transzkripció faktor vagy a kimér oligonukleotidok, amelyek a betegben specifikus mutációk kialakítására alkalmasak. Ahol lehetséges, a nukleinsav molekulák teljes gének vagy nukleinsav fragmensek formájában lehetnek, amelyek adott esetben

egy vektor molekulában, például egy plazmid vektorban vannak. Az utóbbi forma különösen jól alkalmazható, amikor olyan génterápiás eljárásban használandó transzfer molekuláról van szó, amelyben a géneket egy beteg sejtjeibe terápiásan visszük be. Ez olyan betegségek kezelésére használható, mint a rák, a szív-érrendszeri betegségek, a vírusfertőzések vagy a monogén rendellenességek, mint a cisztás fibrózis.

Adott esetben a fényérzékenyítő anyag és a sejtbe bejuttatandó transzfer molekula egyikét vagy másikat vagy mindkettőt hordozó molekulákhoz, célbajuttató molekulákhoz vagy olyan vektorokhoz rögzíthetjük, azokkal kapcsolatba hozhatjuk vagy konjugálhatjuk, amelyek elősegítik vagy növelik a fényérzékenyítő anyag vagy a transzfer molekula felvételét, vagy ezen entitásokat egy meghatározott sejt típushoz, sejthez vagy sejten belüli részhez célbajuttatják. A hordozó rendszerek például a polilizin vagy egyéb polikationok, a dextrán-szulfát, a különböző kationos lipidek, liposzómák, visszaalakított LDL-részecskék vagy sztérikusan stabilizált liposzómák. Ezek a hordozó rendszerek általában javíthatják a farmakokinetikát és növelhetik a transzfer molekula és/vagy a fényérzékenyítő anyag sejtbe való bejutását, ezen túlmenően a transzfer molekulát és/vagy a fényérzékenyítő anyagot egy olyan sejten belüli részhez irányíthatják, ami fotokémiai bevitelnél különösen előnyös, de általában ezek nem képesek a transzfer molekulát és/vagy a fényérzékenyítő anyagot meghatározott sejtekhez (például rákos sejtekhez) vagy szövetekhez célba juttatni. Azonban ilyen specifikus vagy szelektív célbajuttatás eléréséhez a hordozó molekulákat, a transzfer molekulát és/vagy a fényérzékenyítőt specifikus célbajuttató molekulákkal hozhatjuk kapcsolatba, azokhoz köthetjük vagy azokkal konjugálhatjuk, amelyek elősegítik a transzfer molekulának a kívánt sejtekbe vagy szövetekbe történő specifikus sejtbe jutását. Ezek a célbajuttató molekulák a transzfer molekulát a sejten belüli részekhez irányíthatják, ami fotokémiai bevitelnél különösen előnyös.

A szakirodalomban sokféle különböző célbajuttató molekulát alkalmaztak [Curiel, D. T., Ann. NewYork Acad. Sci. 886, 158-171 (1999); Bilbao, G. és munkatársai, Gene Therapy of Cancer (szerk.: Walden és munkatársai, Plenum Press, New York) (1998); Peng, K. W. és Russell, S. J., Curr. Opin. Biotechnol. 10, 454-457 (1999); Wickham, T. J., Gene Ther., 7, 110-114 (2000)].

A hordozó molekula és/vagy a célbajuttató molekula érintkezésbe hozható, összekapcsolható vagy konjugálható a transzfer molekulával, a fényérzékenyítő anyag-

gal vagy mindkettővel, és azonos vagy különböző hordozó és/vagy célbajuttató molekulák alkalmazhatók. Az ilyen célbajuttató molekulák vagy hordozók a transzfer molekulának egy meghatározott sejten belüli részbe irányítására is használhatók, ez különösen előnyös PCI, például lizoszómák vagy endoszómák alkalmazása esetén.

5 Ahogy fentebb említettük, a találmányunk szerinti fényérzékenyítő anyagok fotodinamikai terápiában, különösen fotokemoterápiában vagy diagnózisban használhatók. Ezek az eljárások a szabadalmi és tudományos szakirodalomban jól dokumentáltak [például WO 96/28412 és WO 98/30242 számú nemzetközi szabadalmi leírások].

Amikor a fényérzékenyítő szert PDT-ben használjuk, a kezelhető abnormali-
10 tások és rendellenességek bármilyen rosszindulatú vagy rosszindulatú állapotot megelőző vagy nem-rosszindulatú rendellenességek vagy abnormalitások lehetnek, amelyek a fotokemoterápiára érzékenyek, ilyenek például a tumorok vagy egyéb növekedések, bőrrendellenességek, például pszoriázis vagy aktinikus keratózisos, továbbá akné, bőr
sérülések és egyéb betegségek vagy fertőzések, például bakteriális, vírusos vagy gom-
15 bás fertőzések, például herpesz vírus fertőzések.

A találmányunk szerinti vegyületek alkalmazásával kezelhető belső és külső
testfelületek például a bőr és az összes epitélium és serosa felületek, beleértve például a
nyálkahártyát, vagy a légutak, a gyomor-bélrendszer, valamint a és húgy- és ivarszervek
belső felületeit, továbbá az ilyen felületekre ürülő vezetékekhez kapcsolódó mirigyeket
20 (például máj, faggyúmirigyeket tartalmazó szőrtüszők, emlőmirigyek, nyálmirigyek és
ondóvezetékek). A bőr mellett ilyen felületek például a vagina, az endometrium és az
urothelium belső felülete. Ilyen felületek továbbá egy beteg vagy rákos szövet kimetszé-
se után a test által alkotott üregek, például tumorok vagy gliómák kimetszése után az
agyban kialakuló üregek.

25 Tehát a felületek például a következők: (i) bőr és kötőszövet; (ii) a száj, a garat,
a nyelőcső, a gyomor, a belek és a bélnyúlványok, a vastagbél és a végbél belső felülete;
(iii) az orrjáratok, az orrüregek, az orr-garat, a légcső, a hörgők és az apró hörgők belső
felülete; (iv) a húgyvezetékek, a húgyhólyag és a húgycső belső felülete; (v) a vagina, a
méhnyak és a méh belső felülete; (vi) a parietális és viscerális mellhártya; (vii) a has- és
30 medenceüregek belső felülete és az ezen üregekben lévő szervek felülete; (viii) a ke-
mény agyburkok és az agyhártya; (ix) a szilárd szövetek bármilyen tumora, amely akti-
váló fénysugárzás számára például közvetlenül a sebészeti beavatkozáskor vagy egy tűn

keresztül bejuttatott optikai szál útján hozzáférhetővé tehető.

A találmányunk szerinti készítmények szokásos módon formálhatók egy vagy több fiziológiásan elfogadható hordozó- és/vagy segédanyaggal a szakirodalomban jól ismert eljárások alkalmazásával. A készítmény és a hordozó- vagy segédanyagok tulajdonságai, a dózis és hasonlóak szokásos módon határozhatók meg a beadás módját, a kezelés célját és hasonlókat illetően. Ehhez hasonlóan a dózisok is szokásos módon határozhatók meg, és ez a transzfer molekula (ha van jelen) tulajdonságától, a kezelés céljától, a beteg életkorától, a beadás módjától és hasonlóktól függhet.

A készítmények beadhatók helyileg, orálisan vagy szisztémásan. PDT-ben történő alkalmazás esetén előnyösek a helyi készítmények, ilyenek például a gélek, a krémek, a kenőcsök, a spray-k, a tejek, a balzsamok, a rudak, a szappanok, a porok, a pesszáriumok, az aeroszolok, a cseppek, az oldatok vagy bármilyen más, a szakirodalomban is ismert és szokásosan alkalmazott gyógyszerkészítmény formák. A hozzáférhetetlen helyekre történő helyi beadás a szakirodalomban ismert eljárásokkal, például katéterek vagy egyéb megfelelő hatóanyag bejuttató rendszerek alkalmazásával valósítható meg.

Egyik változat szerint a készítmények orális vagy parenterális beadásnak megfelelően kialakított formában, például intradermális, szubkután, intraperitoneális vagy intravénás injekcióban adhatók be. A gyógyszerészeti dózisformák különböző változatait képezik például az egyszerű vagy bevont tabletták, a kapszulák, a szuszpenziók és az oldatok, amelyek az aktív komponenst adott esetben egy vagy több szokásosan alkalmazott inert hordozóval és/vagy hígítószerrel együtt tartalmazzák.

Az itt ismertetett készítményekben a vegyületek koncentrációja függ attól, hogy a vegyületet milyen célra kívánjuk alkalmazni, továbbá a készítmény tulajdonságaitól, a beadás módjától, a kezelendő állapottól és a betegről, és ez a választásnak megfelelően változtatható vagy határozható meg. Azonban PDT-ben történő alkalmazás esetén a fényérzékenyítő anyag koncentrációtartománya 0,01 tömeg% és 50 tömeg% közötti, például 0,05 tömeg% és 20 tömeg% közötti, azaz 1 tömeg% és 10 tömeg% közötti tartományban lehet. PCI-ben történő alkalmazás esetén fontos, hogy a fényérzékenyítő anyag koncentrációját úgy határozzuk meg, hogy amikor az a sejtbe bejut, például annak egy vagy több sejtben belüli részébe bejutott vagy azzal kapcsolatba kerül, és sugárzás hatására aktiválódik, egy vagy több sejt szerkezet roncsolódik, például egy vagy

több sejten belüli rész lizálódik vagy roncsolódik. A fényérzékenyítő anyagot használhatjuk például 10 µg/ml és 50 µg/ml közötti koncentrációban. *In vitro* alkalmazás esetén ez a tartomány sokkal szélesebb, például 0,05 µg/ml és 500 µg/ml közötti lehet. *In vivo* humán kezelés esetén a fényérzékenyítő anyagot szisztémásan beadva testtömegre számítva 0,05 mg/kg és 20 mg/kg közötti tartományban vagy helyi alkalmazás esetén oldószerben 0,1 % és 20 % közötti koncentrációban használhatjuk. Amikor az itt ismertetett vegyületeket PCI-ben használjuk, a sejtek fényérzékenyítő anyaggal történő inkubálásának ideje (azaz az "érintkeztetési" idő) néhány perc és néhány óra között változhat, sőt elérheti a 48 órát vagy ennél hosszabb időtartamot is. Az inkubálás idejét úgy kell megválasztani, hogy a fényérzékenyítő anyagot a megfelelő sejtek vegyék fel. A sejtek fényérzékenyítő anyaggal történő inkubálását adott esetben egy fényérzékenyítőtől mentes közeggel történő inkubálási időtartam követheti, mielőtt a sejteket fénnel besugározzuk és/vagy a transzfer molekulát beadjuk.

A találmányunk szerinti megoldásban alkalmazott cél molekulák megfelelő dózisának meghatározása a szakterületen járatos személy rutin feladata. Amikor a transzfer molekula egy protein vagy egy peptid, *in vitro* alkalmazás esetén a transzfer molekulát általában 5 mg/ml-nél kisebb (például 0,1 mg/ml és 5 mg/ml közötti) dózisban használjuk, és *in vivo* alkalmazás esetén a transzfer molekulát általában 5 mg/kg-nál kisebb (például 0,1 mg/kg és 5 mg/kg közötti) dózisban használjuk. Ha a transzfer molekula egy nukleinsav, akkor *in vitro* alkalmazás esetén a transzfer molekulát 10^4 sejtre számítva például körülbelül 0,1 µg és 50 µg közötti mennyiségű nukleinsavat tartalmazó dózisban használjuk, és *in vivo* alkalmazás esetén humán injekcióban körülbelül 10^{-6} g és 1 g közötti mennyiségű nukleinsavat adunk be.

Az itt ismertetett vegyület vagy készítmény (például egy adott testfelületen történő) beadása után a kezelt területet fénnel besugározzuk a kívánt hatás, például fotokémiai bevitel vagy fotokemoterápiás hatás elérése céljából. A fényérzékenyítő anyag aktiválása céljából végzett megvilágítási lépést a szakirodalomban jól ismert eljárások szerint végezhetjük. A kívánt hullámhosszúságot és fényintenzitást biztosító megfelelő fényforrások a szakirodalomban jól ismertek. A találmányunk szerinti eljárásokban változhat az az időtartam, ameddig a testfelületet vagy a sejteket fénnel kezeljük. PCI-ben például a transzfer molekula citoszólba történő bevitelének hatékonysága például a megvilágítás növelésével nőni látszik. A besugárzási lépés időtartamának hosszúsága

általában néhány perc és néhány óra közötti nagyságrendű, például előnyösen eléri a 60 percet, például 1 perc és 30 perc közötti, például 0,5 perc és 3 perc közötti vagy 1 perc és 5 perc közötti vagy 1 perc és 10 perc közötti, például 3 perc és 7 perc közötti, és előnyösen körülbelül 3 perc, például 2,5 perc és 3,5 perc közötti időtartam. A megfelelő fénydózist a szakember választhatja meg, ez függ a célba vett sejtekben vagy szövetekben felgyülemlett fényérzékenyítő anyag mennyiségétől. A sugárzást általában 40 Joules/cm² és 200 Joules/cm² közötti dózis szinten alkalmazzuk, ez lehet például 100 Joules/cm² 200 mW/cm²-nél kisebb besugárzott felületi teljesítmény tartományban. Az itt ismertetett eljárásokban *in vivo* alkalmazás esetén különösen előnyös az 500 nm és 750 nm közötti, például 550 nm és 700 nm közötti tartományba eső hullámhosszúságú fénnel történő besugárzás.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja a test külső vagy belső felületei rendellenességeinek vagy abnormalitásainak fotokemoterápiás kezelésére vonatkozó eljárás, amely eljárás során az érintett felületre egy itt ismertetett fényérzékenyítő anyagot, például egy (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját adjuk be, és az említett felületet fénnel, előnyösen 300 nm és 800 nm közötti, például 500 nm és 700 nm közötti tartományba eső hullámhosszúságú fénnel kezeljük.

A test különböző területeinek például lámpákkal vagy lézerekkel történő besugárzásával végzett eljárások a szakirodalomban jól ismertek [lásd például Van den Bergh, Chemistry in Britain, 430-439, (1986. május)]. A hozzáférhetetlen tartományok optikai szálak alkalmazásával közelíthetők meg.

A találmányunk szerinti vegyületeket egyéb fényérzékenyítő anyagokkal, például ALA-val vagy Photofrin[®]-nel vagy egyéb aktív komponensekkel formálhatjuk és/vagy adhatjuk be, amelyek növelhetik a fotokemoterápiás hatást. Bekeverhetők például kelátképző szerek, például aminopolikarbonsavak (például EDTA) a Pp felgyülemelésének fokozása és így a fényérzékenyítő hatás növelése céljából. A kelátképző szert szokásos módon 0,05 tömeg% és 20 tömeg% közötti, például 0,1 tömeg% és 10 tömeg% közötti koncentrációban használhatjuk.

Felületi behatolást elősegítő anyagokat, különösen dialkil-szulfoxidokat, például dimetil-szulfoxidot (DMSO) is használhatunk a fotokemoterápiás hatásnövelésére. A felületi behatolást elősegítő anyagot szokás szerint 0,2 tömeg% és 50 tömeg% közötti koncentrációtartományban, például körülbelül 10 tömeg%-ban használhatjuk.

A kezelendő állapotnak és a készítmény tulajdonságainak megfelelően a találmányunk szerinti megoldásban használható vegyületeket adott esetben egyéb anyagokkal is összekeverhetjük például egyetlen készítményben, vagy ezek beadhatók egymás után vagy külön is. Sok esetben tehát különösen előnyös fotokemoterápiás hatás érhető el a felületi behatolást elősegítő anyagnak egy külön lépésben végzett előkezelésével, amelyet a találmányunk szerinti eljárásban használt vegyületeket megelőzően adunk be.

Találmányunk egy további kiviteli alakja egy itt ismertetett fényérzékenyítő anyagot, például egy (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját, valamint legalább egy felületi behatolást elősegítő anyagot és adott esetben egy vagy több kelátképző szert tartalmazó termékre vonatkozik, amely fotokemoterápiára érzékeny külső és belső testfelületi rendellenességek vagy abnormalitások kezelésére használható egyidejűleg, külön vagy egymás után alkalmazott kombinált készítmény formájában.

Találmányunk ezen kiviteli alakjának egy változata egy olyan kitet foglal magában, amely külső vagy belső testfelületi rendellenességek vagy abnormalitások fotokemoterápiás kezelésére használhatók, ez a következőket tartalmazza:

- a) egy első tartály, amely egy itt ismertetett fényérzékenyítő anyagot, például egy (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját tartalmazza,
- b) egy második tartály, amely legalább egy felületi behatolást elősegítő anyagot tartalmaz és
- c) egy vagy több adott esetben jelenlévő kelátképző szer, amely vagy az első tartályban vagy egy harmadik tartályban van elhelyezve.

Természetesen az itt ismertetett vegyületek alkalmazásával végzett terápiás eljárás szükségképpen a kezelendő rendellenesség vagy abnormalitás fluoreszcenciás kezelését foglalja magában. A fluoreszcencia intenzitásának megválasztásával az eljárás alkalmazható az abnormális sejtek eltávolítására, azonban a fluoreszcencia lokalizálásával az abnormalitás vagy rendellenesség méretének, kiterjedésének és elhelyezkedésének megjelenítésére is használható.

Ezután a vizsgálat helyén azonosított vagy meghatározott abnormalitás vagy rendellenesség alternatív terápiás eljárásokkal kezelhető, ilyen például a sebészeti vagy kémiai kezelés, vagy a találmányunk szerinti terápiás eljárás, amelynek során folyamatosan felépítjük a fluoreszcenciát vagy tovább alkalmazzuk a találmányunk szerinti ve-

gyületet a megfelelő helyen. Természetesen a diagnosztikai eljárásokban a megjelenítéshez kisebb fluoreszcencia szintekre van szükség, mint a terápiás kezeléseknél. Így általában megfelelő a 0,2 tömeg% és 30 tömeg% közötti, például az 1 tömeg% és 5 tömeg% közötti koncentrációtartomány. A terápiás alkalmazások tekintetében a helyek, eljárások és beadási módok az előzőekben említettek, és ezek az itt ismertetett diagnosztikai alkalmazásokban is megfelelőek.

A találmányunk szerinti vegyületek *in vitro* diagnosztikai eljárásokra, például testfolyadékokban lévő sejtek vizsgálatára is használhatók. A nem normális szövettel kapcsolatos nagyobb fluoreszcencia egy abnormalitás vagy rendellenesség jele lehet. Ez az eljárás igen érzékeny, és így az abnormalitások vagy rendellenességek korai detektálására használható, például a hólyag- vagy tüdőkarcinóma rendre a vizelet- vagy köpetmintákban lévő epitélium sejtek vizsgálatával mutatható ki. A diagnózisra alkalmazható egyéb testfolyadékok a vizelet és a köpet mellett a vér, a sperma, a könny, a gerincfolyadék és hasonló. A szövetminták vagy preparátumok például biopszia szövetből vagy csontvelő mintából is készíthetők. Találmányunk tehát kiterjed a találmányunk szerinti vegyületek vagy sóik fent említett fotokemoterápiás eljárásokkal végzett diagnózisban és termékekben, valamint a diagnózis elvégzéséhez alkalmazott kitekben történő alkalmazására.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja abnormalitások vagy rendellenességek *in vitro* diagnosztikai eljárására vonatkozik, amelynek során egy beteg testfolyadék vagy szövetmintáját vizsgáljuk, ez az eljárás legalább az alábbi lépéseket tartalmazza:

i) a testfolyadékot vagy szövetet az itt ismertetett fényérzékenyítő anyaggal, például egy (I) általános képletű vegyülettel vagy gyógyászatilag elfogadható sójával összekeverjük,

ii) a keveréket fénnel, például 300 nm és 800 nm közötti tartományba eső hullámhosszúságú fénnel besugározzuk,

iii) megmérjük a fluoreszcencia szintet és

iv) a fluoreszcencia szintet összehasonlítjuk kontroll szintekkel.

Találmányunkat az alábbi példákban és a mellékelt ábrákon részletesebben ismertetjük, anélkül, hogy találmányunkat az ezekben foglaltakra korlátoznánk:

az 1. ábrán a TPPS_{2a} abszorpciós spektruma látható trietil-amin (TEA) jelenlé-

tében, benzolban, monokromatikus fénnel különböző időtartamig végzett besugárzás előtt és után;

a 2. ábrán a fénysugárzásnak a TPPS_{2a} 646-655 nm-es csúcsának maximális optikai sűrűségére gyakorolt hatását mutatjuk be; a TPPS_{2a}-t tartalmazó oldatot TEA jelenlétében benzolban monokromatikus fénnel besugározzuk és meghatározzuk az optikai sűrűséget;

a 3. ábrán a TPPS_{2a} fénnel történő besugárzásának hatására képződött származékok HPLC kromatogramját mutatjuk be; a TPPS_{2a}-t TEA jelenlétében benzolban nem-monokromatikus fénnel sugározzuk be, és reverz fázisú HPLC eljárással értékeljük a fluoreszcens származékok képződését; az oldatot fénnel besugározzuk és a mintákat a méréshez izoláljuk;

a 4. ábrán a TPCS_{2a}, valamint TPCS_{2a}-val kezelt V79 sejtek sejt extraktumainak HPLC-kromatogramjai láthatók; a V79 sejteket 1 µg/ml TPPS_{2a}-val kezeljük, amely a 3. ábra szerinti 10 percig végzett fény kezelés (a) után képződött; a TPCS_{2a}-t a sejtekből 18 óra inkubálás után extraháljuk és HPLC eljárással értékeljük (b); a csúcs retenciós időket az ábrán feltüntetjük;

az 5. ábrán TPPS_{2a}-val és TPCS_{2a}-val kezelt V79 sejtek fluoreszcenciás mikrográf felvételei láthatók; a sejteket (a) 1 µg/ml TPPS_{2a}-val vagy (b) 1 µg/ml TPCS_{2a}-val inkubáljuk 18 órán át érzékenyítő szert nem tartalmazó közeggel 1 órán át végzett inkubálás után, majd elvégezzük a mikroszkópos vizsgálatot;

a 6. ábrán V79 sejtekben lévő β-AGA aktivitás inaktiválásának áram-válasz görbéi láthatók 1 µg/ml TPCS_{2a}-val 18 órán át végzett kezelés, majd érzékenyítő szertől mentes közeggel 1 órán át végzett inkubálás, ezután vörös fénnel történő besugárzás után;

a 7. ábrán TPPS_{2a}-val és TPCS_{2a}-val inkubált és (a) vörös fénnel vagy (b) kék fénnel besugárzott V79 sejtek dózis-válasz görbéi láthatók; a sejteket 1 µg/ml TPPS_{2a}-val vagy 2 µg/ml TPPS_{2a}-val vagy 1 µg/ml TPCS_{2a}-val sugároztuk be 18 órán át, majd 1 órán át érzékenyítő szertől mentes közeggel inkubáltuk, ezután fénnel besugároztuk;

a 8. ábrán V79 sejtekben végbemenő protein szintézist mutatunk be kombinált fotokémiai és gelonin kezelés után; a sejteket 1 µg/ml TPCS_{2a}-val kezeltük 1 µg/ml gelonin távollétében (pöttyök) vagy jelenlétében (üres karikák), és vörös fénnel besugároztuk; az oszlopok ezen az ábrán és az előző ábrákon a triplikátban végzett kísérletek

standard deviációját mutatják.

Példák

5 Alkalmazott anyagok és eljárások

Anyagok

A TPPS_{2a} fotoérzékenyítő anyagot a Porphyrin Products-tól szerezzük be (Logan, UT, USA); a 2 mg/ml-es TPPS_{2a} törzsoldatot dimetil-szulfoxidban oldjuk (Sigma, St. Louis, MO USA); a gelonint a Sigma-tól szerezzük be; a 2 mg/ml-es toxin
10 törzsoldatot úgy állítjuk elő, hogy gelonin port oldunk PBS-ben pH 8,5 értéken és felhasználásig -20 °C-on tároljuk; a p-nitrofenil-N-acetil-D-glükózamidot a Sigma-tól szerezzük be (St. Louis, MO, USA).

Tetrafenil-klorin-diszulfonát (TPCS_{2a}) előállítása

A tetrafenil-klorid-diszulfonátot (TPCS_{2a}) TPPS_{2a}-ból állítjuk elő lényegében a
15 Harel és munkatársai által ismertett eljárás szerint [Photochem. Photobiol., 23, 337-341 (1976)].

950 µl 18:7 arányú benzol/trietil-amin (TEA) elegy, 32 ml dimetil-szulfoxid (DMSO) és 18 µl TPPS_{2a} (1 mg/ml-es dimetil-szulfoxidos oldatból) keverékét állítjuk elő és egy 1 ml-es küvettában 5 percig nitrogénnel telítjük. Ezután a keveréket egy
20 Bausch and Lomb típusú monokromátorhoz illesztett 500 W-os nagy nyomású Xenon lámpából származó fénnel besugározzuk. A küvettát 545 ± 15 nm-es hullámhosszúságú 15 W/m^2 felületi teljesítményű fénnel kezeljük. Az áram arányt egy 223 rádiometriás szűrővel ellátott UDT 11 A fény detektorral monitorozzuk. Az abszorpciós spektrumot Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS spektrofotométerrel szabályosan meg-
25 mérjük. A fényút 1 cm.

A TPCS_{2a} (sejt vizsgálatokhoz történő) ipari méretű előállítása céljából a keveréket egy műanyag fóliával lefedett lombikban állítjuk elő, és folyamatosan nitrogént buborékoltatunk át rajta a fénnel történő besugárzás közben. 1 cm-nél rövidebb fényutat alkalmazunk. A keveréket TL'/03 lámpa sorozattal kezeljük, és megvilágítás
30 közben óvatosan rázzuk. A keveréket besugárzás után fagyasztva szárítjuk és dimetil-szulfoxidban oldjuk.

Sejt tenyésztés

Kínai hörcsög tüdő fibroblasztokból származó stabilizált V79 vonal sejteket használunk (ATCC CCL-93). A sejteket 10 % borjú embrió szérumot (FCS, Gibco, Paisley, Nagy-Britannia), 100 U ml⁻¹ penicillint és 100 µg ml⁻¹ sztreptomicint (Gibco) tartalmazó MEM közegben szaporítjuk 37 °C-on 5 % szén-dioxid tartalmú levegővel szellőztetett inkubátorban. A sejteket hetente kétszer másodtenyésztjük.

Fényérzékenyítővel történő jelzés

A sejteket 10 % FCS-t tartalmazó MEM közegbe oltjuk 25 cm³-es lombikokban (Nunclon, Dánia) és 37 °C-on 4-5 órán át állni hagyjuk a szubsztrátumhoz való megfelelő tapadás céljából. Ezután a sejteket a közeggel háromszor mossuk, és egy szérum-tartalmú közegben 1 µg/ml TPPS_{2a}-val vagy TPCS_{2a}-val kezeljük 18 órán át. Ezután a sejteket érzékenyítő szertől mentes közeggel háromszor mossuk, és megvilágítás előtt 1 órán át inkubáljuk. Ezután a sejteket egy Cinemoid 35 szűrőn át szűrt vörös fénnel (Phillips TL 20 W/09) vagy kék fénnel (Appl. Photophysics, Nood. 3026, London) besugározzuk. A sejteket elérő besugárzott felületi teljesítmény a vörös és a kék fényű lámpák esetében rendre 1,35 mW/cm² és 1,5 mW/cm².

Toxicitás vizsgálatok

A sejttúlélést a Berg és munkatársai által ismertetett telepalkotó vizsgálattal határozzuk meg [Photochem. Photobiol., 53, 203-210 (1991)]. 1500 sejtet beoltunk egy 25 cm³-es műanyag szövettenyésztő lombikban, és a fent ismertetett módon a fényérzékenyítővel és fénnel kezeljük. A fotokémiai kezelés után a V79 sejteket 5 napig 37 °C-on szérumtartalmú tenyésztő közegben állni hagyjuk megszámlálható telepek képződése céljából. Ezután a sejteket etanollal fixáljuk, metilén-kékkel megfestjük, és a telepeket megszámloljuk. A protein szintézis gátlását úgy vizsgáljuk, hogy a proteinekbe [³H]-leucint építünk be, és megvilágítás után 24 órával Llorente és munkatársai által ismertetett eljárással megmérjük [FEBS Lett., 431, 200-204 (1998)].

HPLC eljárás

A sejtekből a porfirineket úgy extraháljuk, hogy a sejteket a Berg és munkatársai által ismertetett módon savanyított metanolban felkaparjuk (5 µl koncentrált sósav 10 ml metanolban) [Br. J. Cancer, 74, 688-697 (1996)]. Az elroncsolt sejteket kicsapjuk, és a felülúszót összegyűjtjük. A porfirineket úgy koncentrálnak, hogy az extraktumokat nitrogénnel szellőztetjük, amíg térfogatuk körülbelül 150-200 µl-re csökken, és a további kicsapódott proteinek leüleptetjük. 100 µl felülúszót összekeverünk 235 µl 10

mmól/l koncentrációjú nátrium-foszfáttal, kémhatását körülbelül pH 10,5 értékre állítjuk be 5 mól/l koncentrációjú kálium-hidroxid-oldattal, amelyet közvetlenül használunk fel a HPLC analízisben. A porfirineket a sejtekből ezzel az eljárással kvantitatív módon extraháljuk. A fényérzékenyítők törzsoldatát közvetlenül az indító pufferrel hígítjuk.

- 5 A HPLC rendszer a következőket tartalmazza: egy szivattyú (Spectra Physics 8800), egy reverz fázisú oszlop (4,6 mm x 250 mm, Supelcosil LC-18-T), Supelco S.A., Gland, Svájc), egy fluoreszcens detektor (LDC fluormonitor III) és egy integrátor (Spectra Physics Data-jet), amely egy számítógéphez kapcsolódik. Az A oldószer metanol és víz 30:70 térfogatarányú keveréke, amely 1,5 mmól/l foszfátot tartalmaz, kémhatását pH 7,0 értékre állítjuk be. A B oldószer metanol és víz 95:5 térfogatarányú keveréke, amely 1,5 mmól/l foszfátot tartalmaz, kémhatását pH 7,5 értékre állítjuk be. 40 % és 20 % közötti A oldószertartalom lineáris grádienszt alkalmazunk 30 percig, majd 100 % B oldószer lineáris grádienszt 5 percig. A fluoreszcenciát 330 nm és 400 nm közötti tartományba eső hullámhossznál végzett gerjesztéssel detektáljuk. A fluoreszcenciából a szórt fényt egy szűrővel eltávolítjuk, amely csak a 410 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú fényt engedi át.

Fluoreszcens mikroszkópia

- A mikroszkópiás vizsgálatokhoz 28 cm²-es tálakat (Falcon 3002, Becton Dickinson, Plymouth, Nagy-Britannia) használunk. A sejteket PBS-sel egyszer mossuk és óvatosan egy takaró üveget helyezünk a PBS réteg tetejére. Ezután a sejteket egy epifluoreszcens Zeiss Axioplan mikroszkóppal (Zeiss, Obercohen, Németország) vizsgáljuk. A gerjesztéshez egy HBO/100 W higany lámpát használunk. A sejteket és a sejt fluoreszcenciát egy hűtött töltéskapcsoló eszköz (CCD) kamerával (TE2, Astromed, Cambridge, Nagy-Britannia) vizsgáljuk. A számítógép szabályozza a kamera műveletet, és ezt a feldolgozás és a tárolás digitális leképzésére használjuk. A mikroszkópot egy 390-440 nm-es sávot áteresztő gerjesztő szűrővel, egy 470 nm-es dikroikus sugárforrással és egy 610 nm hullámhosszat áteresztő szűrővel látjuk el.

Enzimes vizsgálat

- A β -AGA lizoszómális enzim fotokémiai inaktiválását Beaufay és munkatársai által ismertett eljárással határozzuk meg [J. Cell Biol., 61, 188-200 (1974)]. Az eljárás p-nitrofenol (p-nitrofenil-N-acetil-D-glükózaminid szubsztátumból történő) képződésén alapul, amely spektrofotometriásan mérhető 420 nm-nél. A sejteket közvetlenül a



fénnyel történő besugárzás után izoláljuk és enzimatikus analízis céljából állítjuk elő.

1. példa

TPPS_{2a} fotokémiai redukciója

Harel és munkatársai által ismertetett eljárás szerint [Photochem. Photobiol., 23,
5 337-341 (1976)] TPPS_{2a}-t nitrogénnel telített benzolos trietil-amin (TEA) oldatban
fénnyel besugározzuk. Az oldatot egy küvettában 545 nm hullámhosszúságú fénnyel
kezeljük fentebb az "Anyagok és eljárások" című részben ismertetett módon.

Az 1. ábrán a fénnyel való besugárzáskor felvett abszorpciós spektrum változása
és a klorinokra jellemző végtermék spektruma látható. A Q-sávok I sávjának csúcs érté-
10 ke 646 nm-ről 655 nm-re tolódott, és maximumának intenzitása 5,8-szeresre növekedett,
ahogy ez a 2. ábrán látható. Az izobesztikus pontokat 593 nm, 505 nm, 518 nm és
577 nm értékeknél észleljük. A sugárzás utáni abszorpciós sávok a klorinokra jellemző-
ek.

A sejt vizsgálatokban történő felhasználásra a klorint nagyobb mennyiségben ál-
15 lítjuk elő, nagyobb TPPS_{2a} oldat térfogatokat sugárzunk be fénnyel, amelyet az "Any-
gok és eljárások" című részben ismertetett módon végezzük. A 655 nm-es abszorpciós
csúcs növelése céljából az idő skála hasonló a fentebb ismertetetthez, és a 2. ábrán be-
mutatotthoz. A klorin előállítása után a HPLC analízis eredményét a 3. ábrán mutatjuk
be, amelyen látható, hogy több klorin izomer képződött. A sejtek tenyészetben történő
20 további kezelésére 10 percig megvilágított oldatokat használunk. 10 perc besugárzás
után a termék körülbelül 23 %-ának retenciós ideje a TPPS_{2a}-éhoz hasonló, de a csúcs
egy klorinra jellemző abszorpciós spektrumot mutat.

2. példa

TPCS_{2a} fotobiológiai vizsgálata

25 A TPCS_{2a} klorin fotokémiai hatásának biológiai vizsgálatához V79 kínai hör-
csög tüdő fibroblaszt sejtvonalat használunk. A sejteket egy éjszakán át klorinnal
inkubáljuk, a fényérzékenyítőt a sejtekből extraháljuk, és az extraktumokat HPLC-vel
vizsgáljuk. A 4. ábrán látható, hogy a sejt extraktumok fluoreszcens csúcsainak felvétele
hasonló a törzsoldatéhoz. A kromatográfiához reverz fázisú C-18 oszlopot használunk,
30 ahol a retenciós idő a vegyületek hidrofób jellegével általában nő. Azt találtuk, hogy a
klorin sejtbe történő bejutása az izomerek hidrofób tulajdonságával nő.

Korábban azt találtuk, hogy a TPPS_{2a} fényérzékenyítő az ilyen vegyülettel

inkubált sejtek endocita edényeiben helyezkedik el [Berg és munkatársai, Photochem. Photobiol., 52, 481-487 (1990)]. A TPCS_{2a} sejten belüli lokalizációját a TPPS_{2a}-val hasonlónak találtuk, ami azt jelzi, hogy a TPCS_{2a} szintén az endocita edényekben helyezkedik el, ahogy ez az 5. ábrán látható. Ezt mutatja a β -N-acetil-glükózaminidáz

5 lizoszóma enzim fotokémiai inaktiválódása is, amely a 6. ábrán látható. Tehát a TPPS_{2a} lizoszóma lokalizáló fényérzékenyítő szer intracelluláris fluoreszcencia felvételével történő összehasonlításából látható, hogy a TPCS_{2a} a V79 sejtek endocita edényeiben lokalizálódik közvetett módon fluoreszcens mikroszkópiával meghatározva és közvetlenül a 13-AGA lizoszóma enzim fotokémiai inaktiválásának méréseivel meghatározva.

10 A fotodinamikus terápiában a porfirin helyett előnyösen egy klorint alkalmaznak, mivel a klorin extinkciós koefficiense a vörös hullámhossz-tartományban nagyobb. Ez jól látható a TPPS_{2a}-val és TPCS_{2a}-val kezelt sejtek kék és vörös fénnel történő megvilágításának összehasonlításával, amelyet a 7. ábrán mutatunk be. A 7b ábrán látható, hogy a TPPS_{2a}-val vagy TPCS_{2a}-val kezelt sejtek egyformán érzékenyek a kék

15 fényre, ezzel szemben a TPCS_{2a}-val kezelt sejtek körülbelül 6-szor érzékenyebbek a vörös fényre, mint a TPPS_{2a} porfirinnel kezelt sejtek, ahogy ez a 7a ábrán látható.

A TPCS_{2a} endocita edényekben való intracelluláris lokalizációját és ennek makromolekulák fotokémiai bevitelére (PCI) történő alkalmazhatóságát I típusú riboszóma-inaktiváló protein toxin gelonin bevitelével vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a gelonin ön-

20 magában vagy fénysugárzással kombinálva kis toxicitást mutat [Berg és munkatársai, Cancer Res., 59, 1180-1183 (1999)]. A 1 μ g/ml geloninnal 18 órán át kezelt sejtekben a protein szintézis körülbelül 10 %-kal csökkent. Azonban a 8. ábrán látható, hogy a TPCS_{2a} és a fénysugárzás erősen fokozza a gelonin citotoxicitását a fénnel történő besugárzás után 24 órával a protein szintézis alapján meghatározva. A kizárólag TPCS_{2a}-

25 val indukált protein szintézis enyhén (20 %-kal) csökkent, amelyet a klónogenicitás vizsgálatokban nem észleltünk. Az eredmények azt mutatják, hogy a gelonin a TPCS_{2a}-val végzett fotokémiai kezelés után bejut a sejtekbe.

Értékelés

A jelen vizsgálatok azt mutatják, hogy a diszulfonált tetrafenilporfirin TEA jelenlétében anaerob körülmények között végzett fotokémiai redukcióval klorin formává redukálható. A fotokémiai redukció hatására a Q-sávok I sávjának extinkciós koefficiense 5,8-szeresére nő, amelyet több klorin izomer képződése okoz. A TPPS_{2a} alap porfi-

30

rinnel összehasonlítva a TPCS_{2a} V79 sejtekben mutatott fényérzékenyítő képességét egyformán hatékonynak találtuk a sejtek kék fénnel végzett fotoinaktiválásra való érzékenyítése esetén és 6-szor hatékonyabbnak vörös fény esetén.

A TPCS_{2a} a V79 sejtek endocita edényeiben lokalizálódik közvetett fluoreszcencia mikroszkópiával vizsgálva. Ezt a β -AGA lizomóma enzim fotokémiai inaktiválódásának mérésével közvetlenül igazoltuk. A β -AGA inaktiválódásának sejt túléléshez viszonyított arányát hasonlónak találtuk a TPPS_{2a} esetében előzőleg találthoz [Berg és munkatársai, Int. J. Cancer, 59, 814-822 (1994)], ami azt mutatja, hogy ezen vegyületek eloszlása hasonló az endocita edények membránjai és ezek lumenje között.

Azt is kimutattuk, hogy a TPCS_{2a} makromolekulák fotokémiai bevitelénél (PCI) fényérzékenyítőként használható, ahogy ezt gelonin PCI-vel demonstráltuk.

15

20

25

30

Szabadalmi igénypontok

1. Fényérzékenyítő szer, amely egy szulfonált mezo-tetrafenil-klorin-származékot vagy gyógyászatilag elfogadható sóját tartalmazza.
- 5 2. Az 1. igénypont szerinti fényérzékenyítő szer, ahol a klorinban jelenlévő négy fenilgyűrű legalább egyike egy szulfonát-csoporttal helyettesített.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti fotoszenzibilizátor anyag, ahol a klorinban jelenlévő két fenilgyűrű mindegyike egyetlen szulfonát-csoporttal helyettesített.
4. Az 1. igénypont szerinti fényérzékenyítő szer, ahol a klorin egy (I) általános
10 képletű vegyület, a képletben
X jelentése $-\text{SO}_3\text{H}$ képletű csoport;
n, p, q és r értéke 0 vagy 1, és
n, p, q és r értékének összege 1 és 4 közötti egész szám, előnyösen legalább 2, például 2
vagy 4, továbbá
15 a fenti vegyületek izomere vagy ezek bármelyikének gyógyászatilag elfogadható sója.
5. A 4. igénypont szerinti fényérzékenyítő szer, amelynek képletében n, p, q és r értékének összege 2, továbbá az egyes fenilgyűrűkön jelenlévő minden egyes X helyettesítő ugyanazon gyűrű-helyzetben van.
6. Az 5. igénypont szerinti fényérzékenyítő szer, amelynek képletében az említett
20 gyűrű-helyzet meta- vagy para-helyzet.
7. A 4-6. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szer, amelynek képletében n, p, q és r értékének összege 2, továbbá a helyettesített fenilgyűrű a redukált pirrolgyűrűvel szomszédosan helyezkedik el.
8. A 4 igénypont szerinti fényérzékenyítő szer, amelynek képletében a klorin egy
25 (II) képletű vegyület vagy izomere, továbbá ezek bármelyikének gyógyászatilag elfogadható sója.
9. Fényérzékenyítő szer, amely egy szulfonált mezo-tetrafenil-porfirin-származék vagy gyógyászatilag elfogadható sója porfirin-makrociklusában lévő egy kettőskötés redukciójával állítható elő.
- 30 10. A 9. igénypont szerinti fényérzékenyítő szer, ahol a porfirin-makrociklus egy diszulfonált mezo-tetrafenil-porfirin.
11. A 10. igénypont szerinti fényérzékenyítő szer, ahol a porfirin TPPS_{2a} (tetra-

fenil-porfin-diszulfonát).

12. Eljárás egy, az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szer előállítására, **azzal jellemezve, hogy** az alábbi lépések legalább egyikét hajtjuk végre:

- 5 (a) egy szulfonált mezo-tetrafenil-porfirin-származékot vagy annak vas-kelát-komplexét redukáljuk;
- (b) kívánt esetben az (a) lépésben képződő vegyületek keverékét szétválasztjuk és
- (c) az (a) vagy (b) lépésben előállított vegyületet gyógyászatilag elfogadható sóvá alakítjuk át.
- 10

13. Gyógyszerkészítmény, amely egy, az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szert vagy gyógyászatilag elfogadható sóját, továbbá legalább egy gyógyszerészeti hordozó- és/vagy segédanyagot tartalmaz.

14. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szer vagy gyógyászatilag elfogadható sója gyógyszerként történő alkalmazásra.

15

15. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szer vagy gyógyászatilag elfogadható sója alkalmazása fotokémiai beviteli eljárásban, fotokemoterápiában vagy diagnózisban alkalmazható terápiás szer előállítására.

16. Eljárás egy transzfer molekulának egy sejt citoszóljába történő bejuttatására, **azzal jellemezve, hogy**

20

- (a) a sejtet érintkezésbe hozzuk egy, az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szerrel vagy gyógyászatilag elfogadható sójával;
- (b) a sejtet érintkezésbe hozzuk a transzfer molekulával és
- (c) a sejtet a fényérzékenyítő szer aktiválásához szükséges hullámhosszú fénnel
- 25 besugározzuk.

17. Gyógyszerkészítmény, amely egy, az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szert vagy gyógyászatilag elfogadható sóját, egy transzfer molekulát és legalább egy gyógyszerészeti hordozó és/vagy segédanyagot tartalmaz.

18. A 17. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a transzfer molekula szerves vegyület, protein, protein fragmens vagy nukleinsav.

30

19. A 17. vagy 18. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény gyógyászati alkalmazásra.

20. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szer vagy gyógyászatilag elfogadható sója és egy transzfer molekula, például egy a 18. igénypont szerinti vegyület alkalmazása terápiában, például rák- vagy génterápiában használható gyógyszerkészítmény előállítására, amely terápia a fényérzékenyítő szernek és a transzfer molekulának egy beteg sejtjeivel vagy szöveteivel (külön, egyidejűleg vagy egymás után) történő érintkeztetését és a sejteknek vagy szöveteknek a fényérzékenyítő szer aktiválásához szükséges hullámhosszúságú fénnel való besugárzását foglalja magában.

21. A 20. igénypont szerinti alkalmazás reumatoid arthritisz, arteroszklerózis, vírusfertőzés, pszoriázis, napfény által okozott keratózis, seb, törés, szemölcs, cisztás fibrózis, Gorlin-szindróma vagy ataxia hajszálértágulat kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

22. Egy, az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szer vagy gyógyászatilag elfogadható sója, valamint egy transzfer molekula, mégpedig egy terápia proteint kódoló gén, egy antiszensz DNS vagy RNS molekula, egy ribozim, egy aptamer, egy oligonukleotidot alkotó triplex, egy peptid nukleinsav (PNS), egy "csali" DNS transzkripció faktor vagy egy kimér oligonukleotid alkalmazása génterápiás eljárásban, például rák, szív-érrendszeri betegség, vírusfertőzés vagy monogenetikus rendellenesség, például cisztás fibrózis, kezelési eljárásban alkalmazható gyógyszerkészítmény előállítására.

23. A 17-19. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény vagy a 20-23. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a fényérzékenyítő szer és/vagy a transzfer molekula egy hordozó molekulával, egy célbajuttató molekulával vagy egy vektorral van összekapcsolva vagy asszociálva.

24. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szer vagy gyógyászatilag elfogadható sója alkalmazása bármilyen, fotokemoterápiára érzékeny rosszindulatú rendellenesség, rosszindulatú rendellenességet megelőző állapot vagy nem-rosszindulatú állapot, például tumor vagy más fajta sejtszaporodás, bőr rendellenesség, például pszoriázis vagy aktinikus keratózis vagy akne, bőrsérülés vagy egyéb betegségek vagy fertőzések, például bakteriális, vírusos vagy gombás fertőzések, például herpesz vírus fertőzés kezelésére alkalmas terápia szer előállítására.

25. Termék, amely egy, az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szer vagy gyógyászatilag elfogadható sóját, valamint legalább egy felületi beha-

tolást elősegítő anyagot és/vagy egy vagy több kelátképző szert tartalmaz egyidejűleg, külön vagy egymás után alkalmazható kombinált készítmény formájában, amely külső vagy belső testfelületek fotokemoterápiára érzékeny rendellenességeinek vagy abnormalitásainak kezelésére használható.

26. Kit külső vagy belső testfelületek rendellenességeinek vagy abnormalitásainak fotokemoterápiás kezelésére történő alkalmazásra, amely a következőket tartalmazza:

(a) egy az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szert vagy gyógyászatilag elfogadható sóját tartalmazó első tartály;

(b) legalább egy, felületi behatolást elősegítő szert tartalmazó második tartály és

(c) egy vagy több adott esetben jelenlévő kelátképző szer, amely az első tartályban vagy egy harmadik tartályban van elhelyezve.

27. Eljárás abnormalitások vagy rendellenességek *in vitro* diagnosztizálására egy beteg testfolyadékát vagy szövetét tartalmazó minta vizsgálatával, **azzal j e l l e m e z-**

v e, hogy

i) a testfolyadékot vagy szövetet összekeverjük egy, az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti fényérzékenyítő szerrel vagy gyógyászatilag elfogadható sójával;

ii) a keveréket fénnel megvilágítjuk;

iii) meghatározzuk a fluoreszcencia szintet és

iv) a fluoreszcencia szintet összehasonlítjuk kontroll szintekkel.

Tisztelettel:
a meghatalmazott:

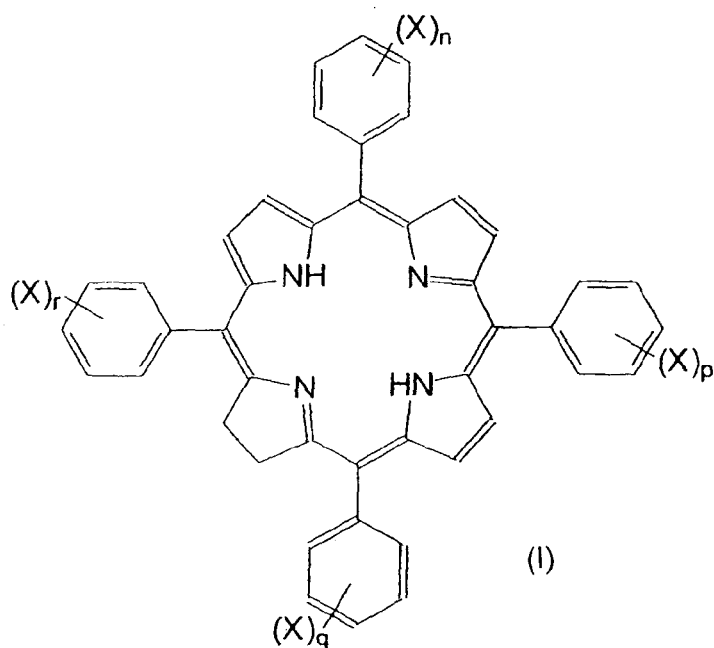
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Dr. Fehérvári Flóra
szabadalmi ügyvivő

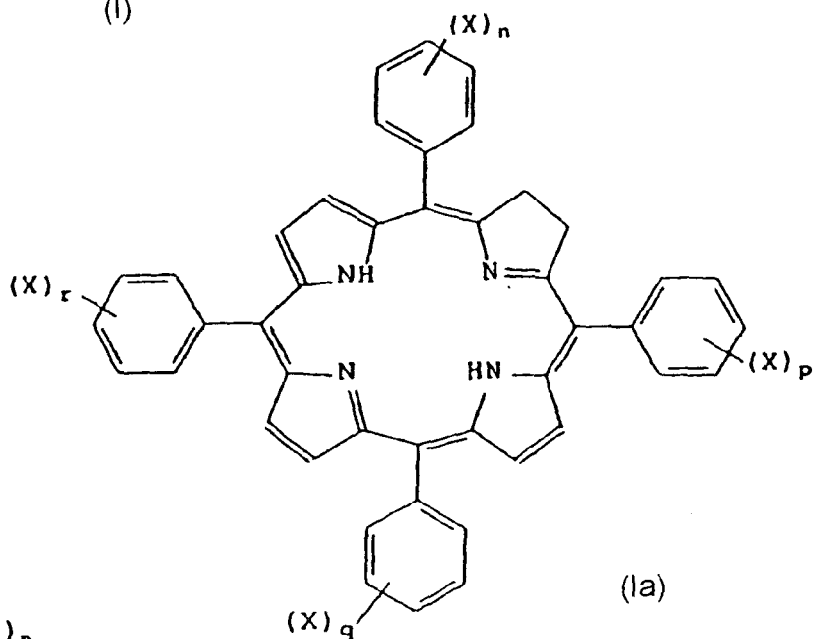
10 oldal rajzol

2009. 09. 22. PK

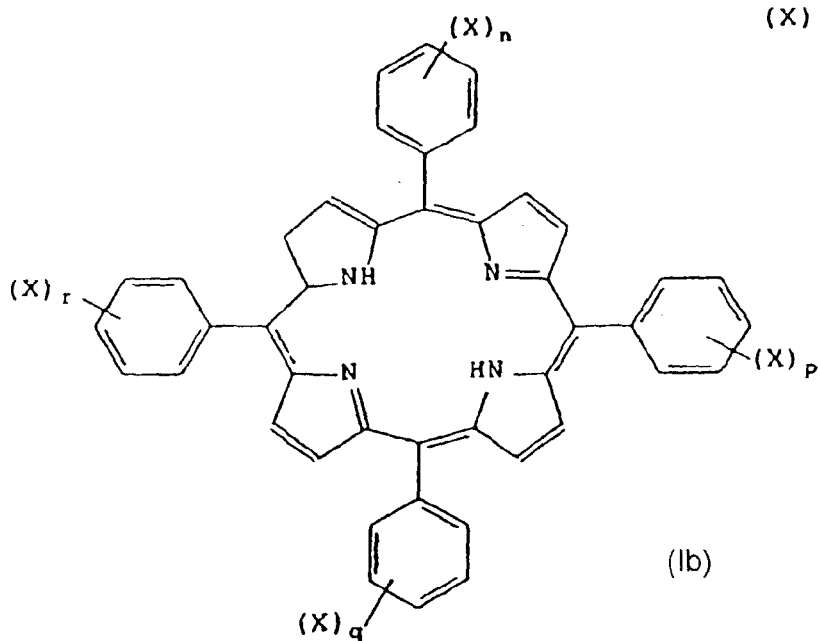
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



(I)

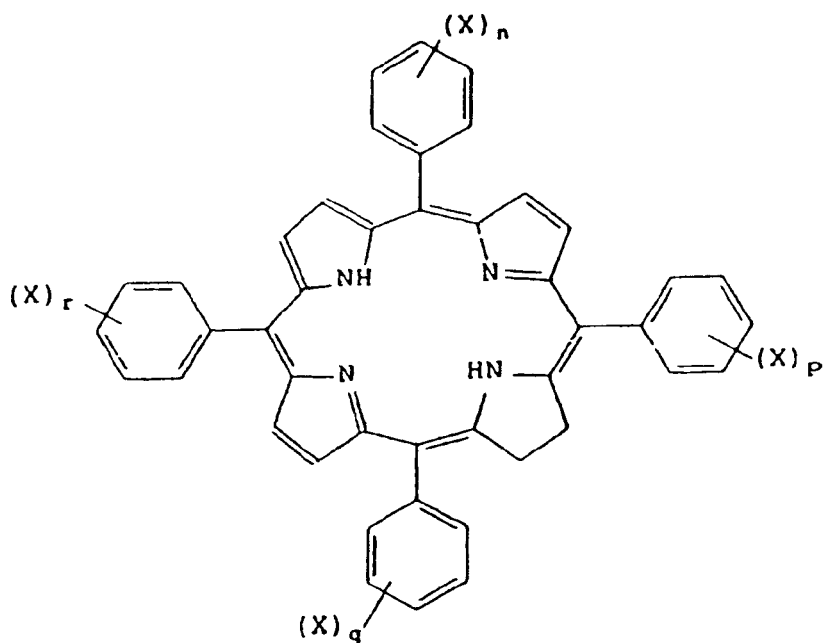


(Ia)

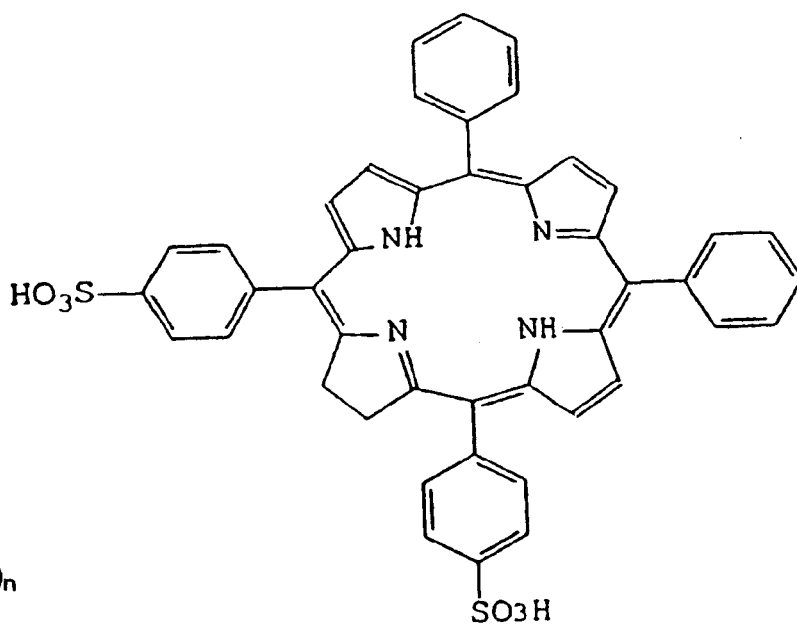


(Ib)

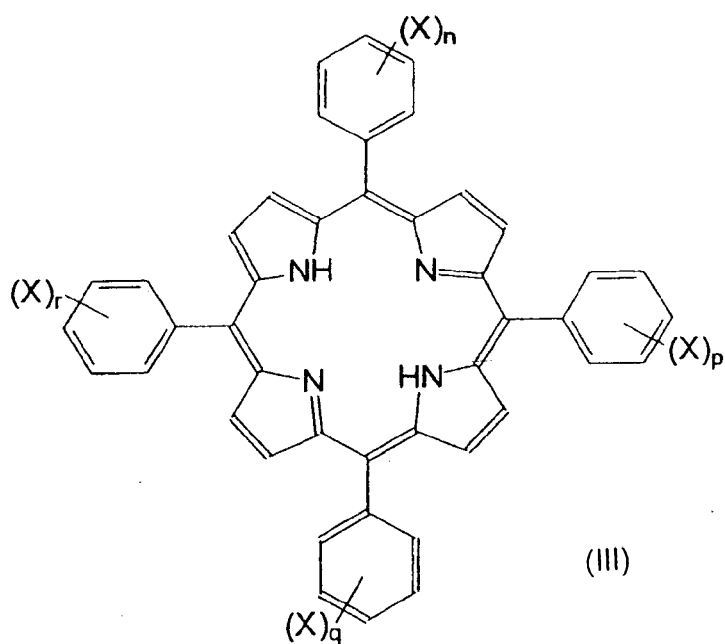
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



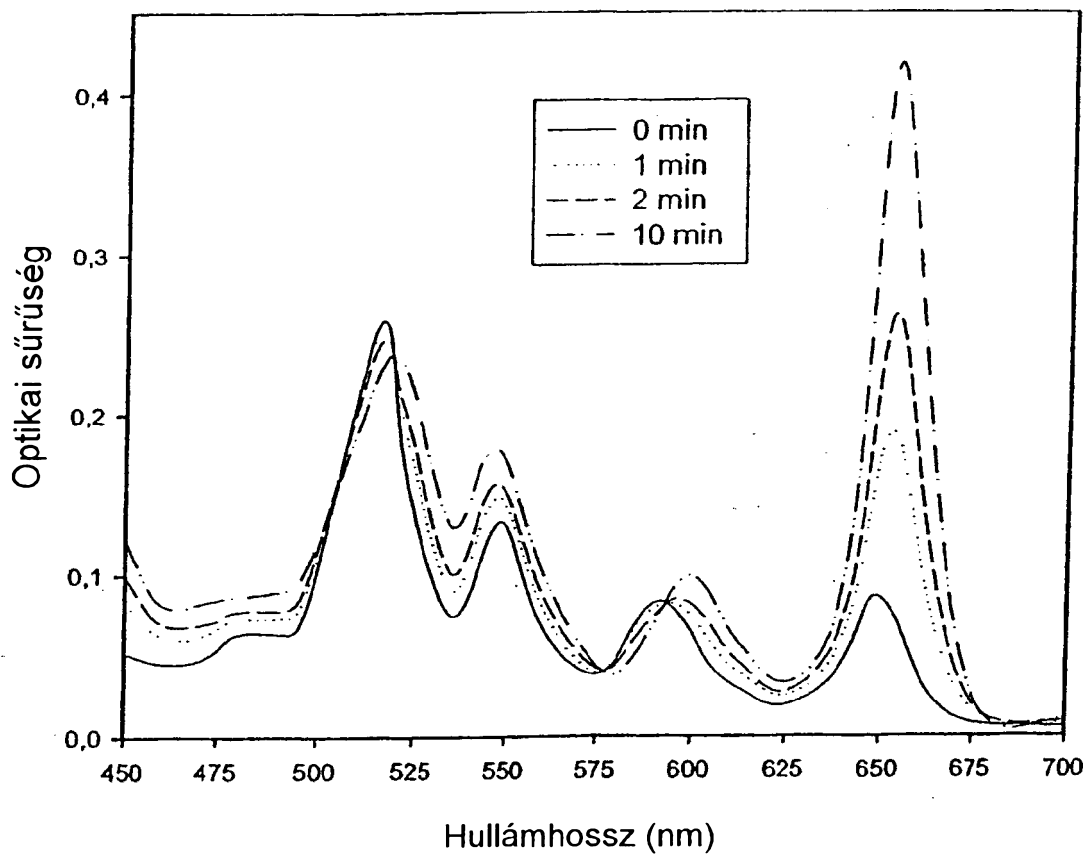
(Ic)



(II)

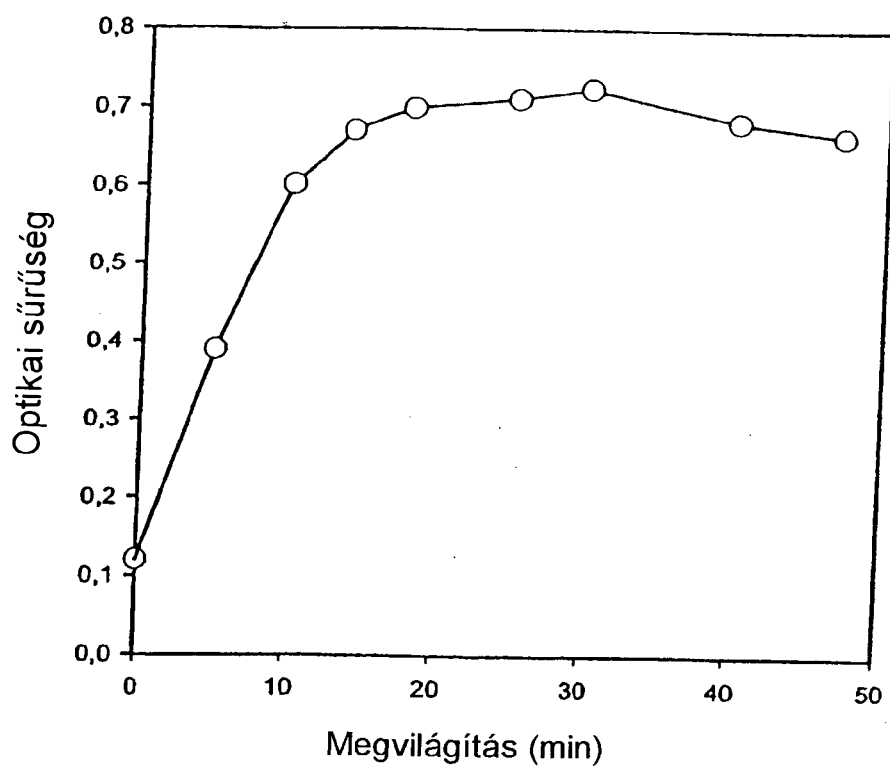


(III)



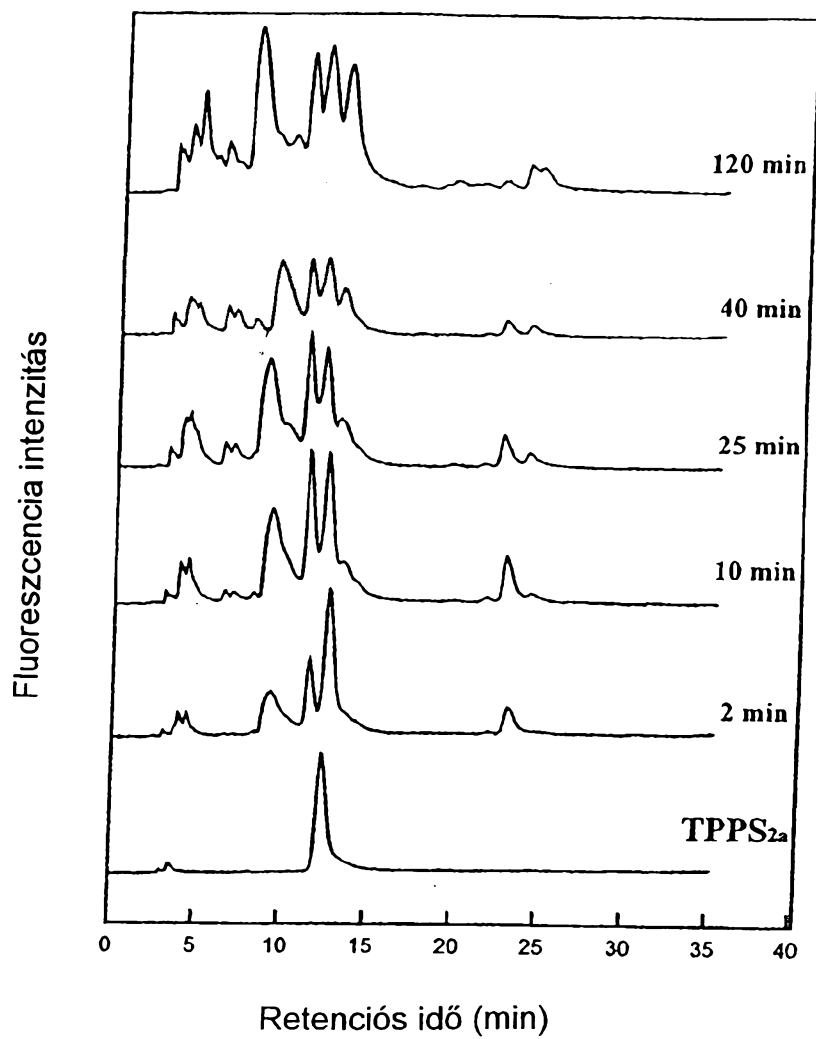
1. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



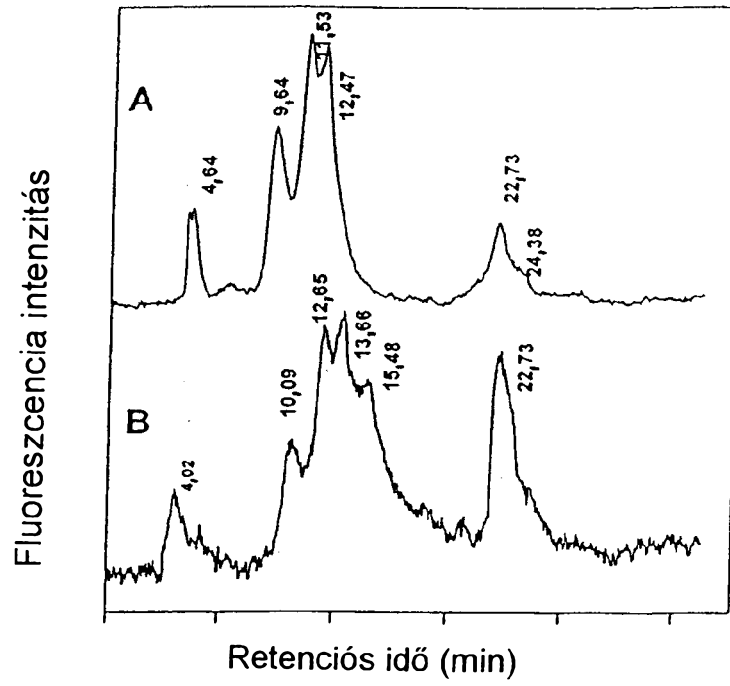
2. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



3. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



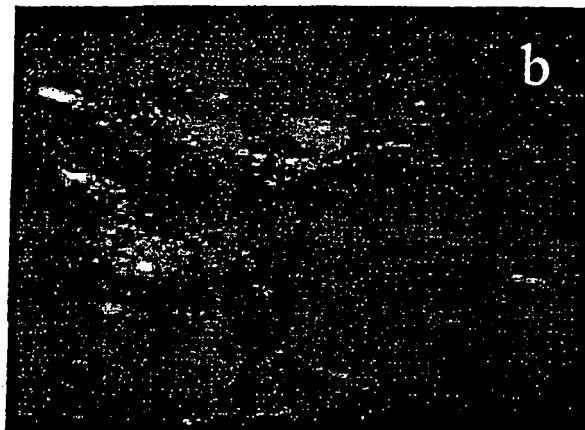
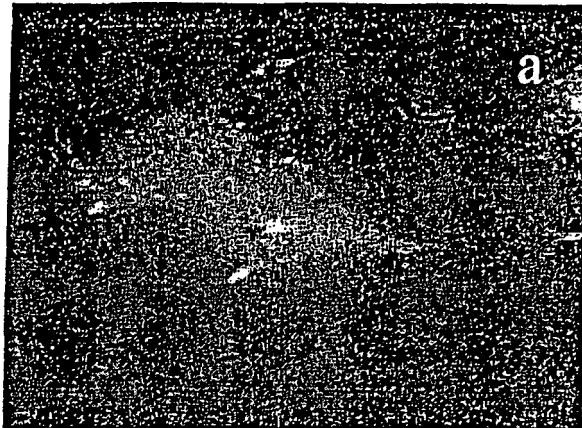
4. ábra

11384

P04 01434

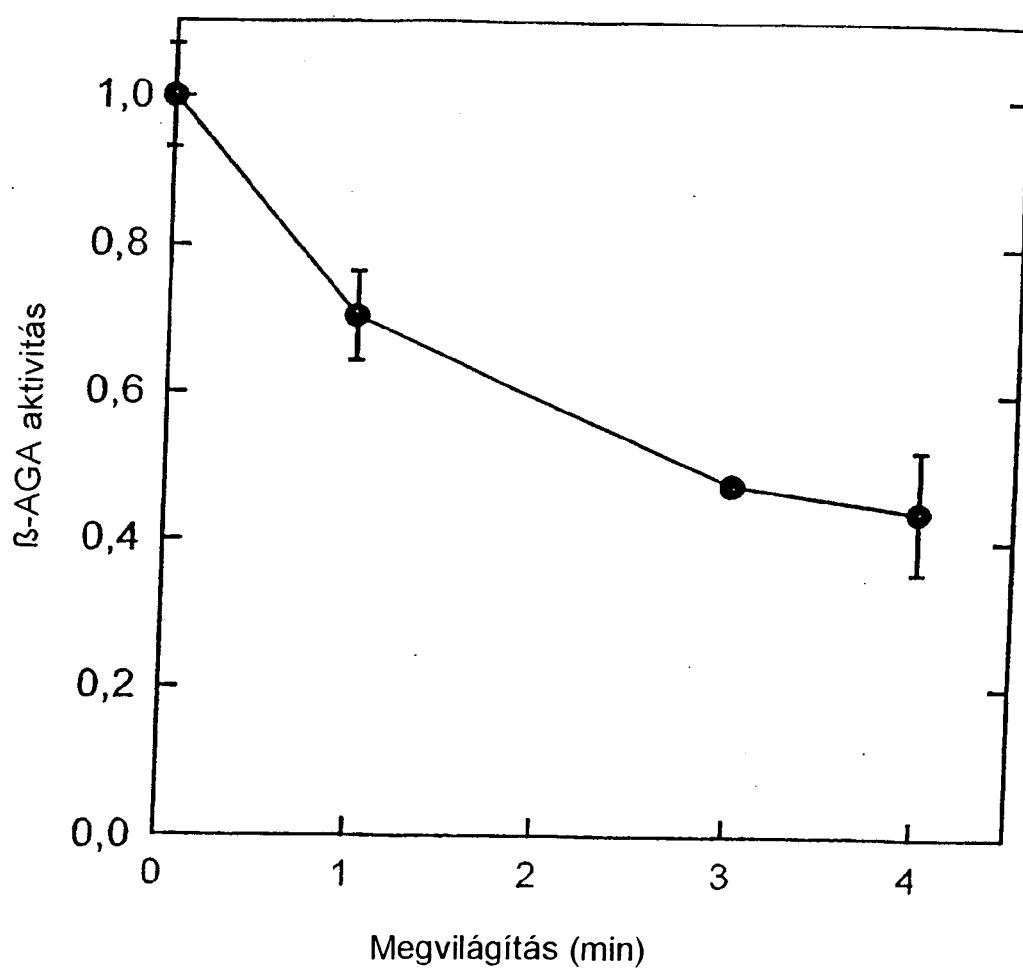
7/10

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



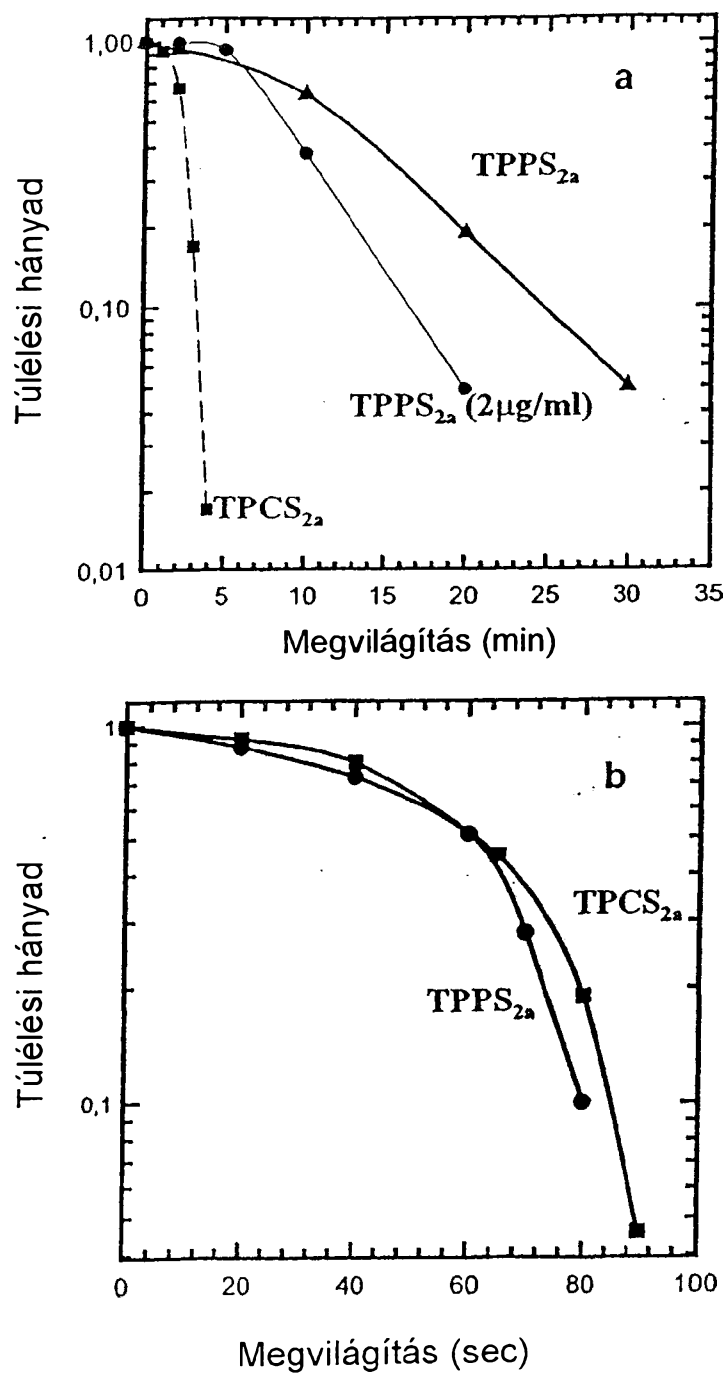
5. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



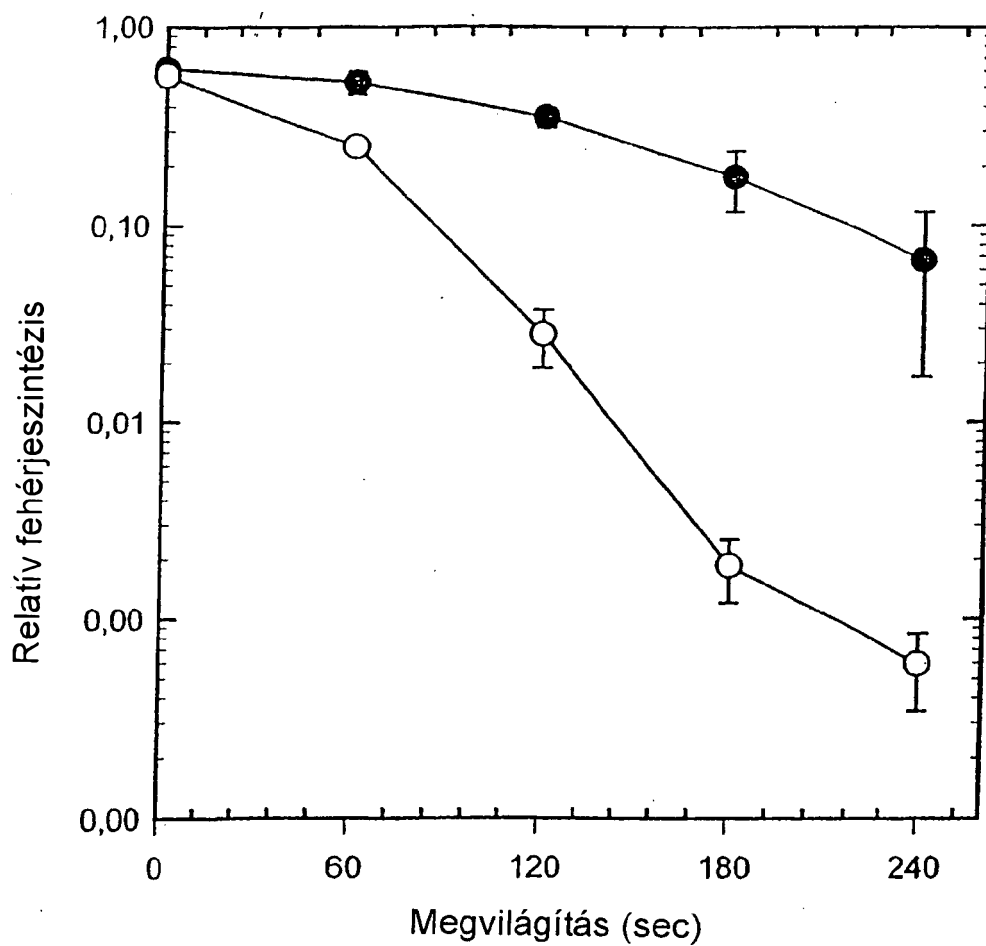
6. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



7. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



8. ábra